

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

Том 23, № 5. С. 999-1200

2021

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

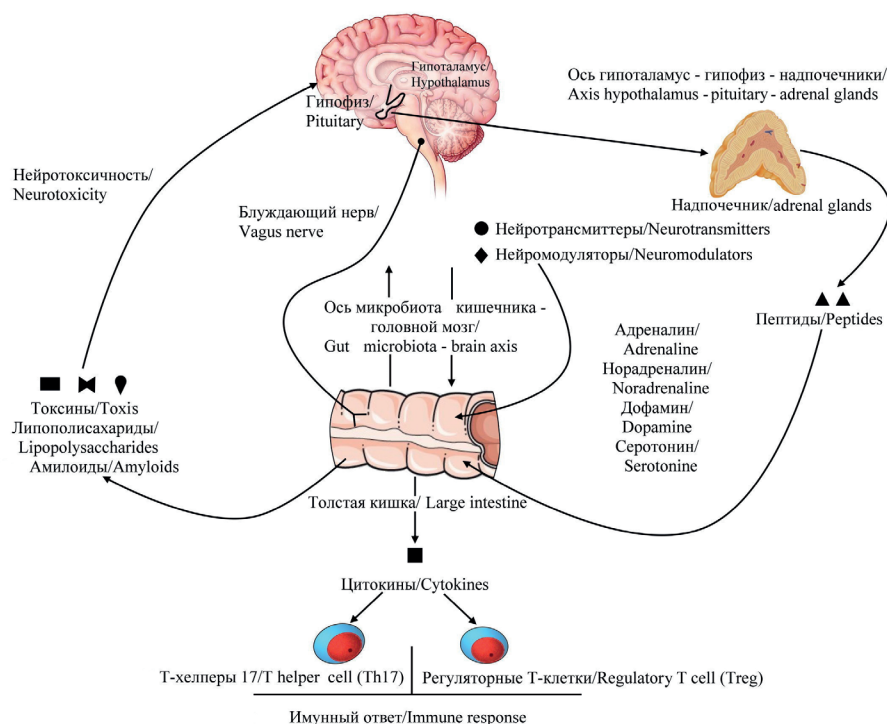


Рисунок 1. Пути влияния микробиоты кишечника на иммунные ответы при старении

Примечание. Между микробиотой кишечника и головным мозгом человека в процессе жизнедеятельности устанавливается двунаправленная нейроэндокринная связь, включающая афферентные и эфферентные нервные пути и гуморальные влияния, осуществляемые через ось «гипоталамус – гипофиз – надпочечники», с участием нейротрансмиттеров и нейромодуляторов. При старении это взаимодействие нарушается, и микробиота начинает активно синтезировать различные токсические вещества, которые оказывают нейродегенеративное действие на мозг, а через эндогенные белковые регуляторы (цитокины) – на Т-клетки организма и иммунный ответ.

Figure 1. Pathways of the influence of gut microbiota on immune responses during aging

Note. A bi-directional neuroendocrine connection is established between the intestinal microbiota and the human brain during vital activity, including afferent and efferent nerve pathways and humoral influences carried out through the hypothalamus – pituitary – adrenal axis, with the participation of neurotransmitters and neuromodulators. With aging, this interaction is disrupted and the microbiota begins to actively synthesize various toxic substances that have a neurodegenerative effect on the brain, and through endogenous protein regulators (cytokines) on the body's T cells and the immune response.

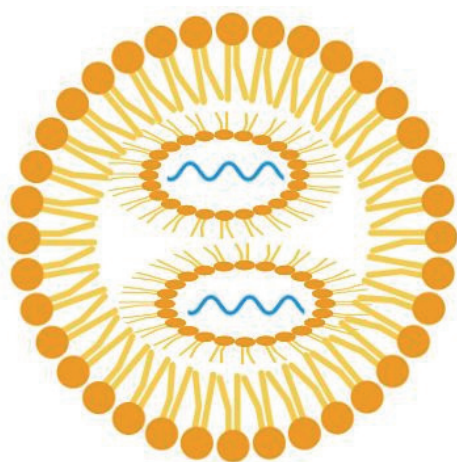


Рисунок 1. Схема структуры липидных наночастиц, содержащих мРНК

Figure 1. Structure of mRNA-containing lipid nanoparticles

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

сентябрь-октябрь

2021, том 23

№ 5

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 18.10.2021 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 25,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 145

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

September-October

2021, volume 23

No. 5

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 18.10.2021. 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

Артеменков А.А.

ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМАЯ ДИСРЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА У ЧЕЛОВЕКА 1005

Благов А.В., Букаева А.А., Макаров В.В., Бочкаева З.В.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ РНК-ВАКЦИН: ЧТО ИЗВЕСТНО НА СЕГОДНЯШНИЙ ДЕНЬ 1017

Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Гриценко В.А.

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО
ФАКТОРА И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ЕГО АКТИВНОГО ЦЕНТРА 1031

Антонов И.И., Мудров В.П., Нелюбин В.Н., Мураев А.А., Иванов С.Ю.

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИММУНОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО
ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ПАРОДОНТИТА 1055

Оригинальные статьи

Ма И, Федоров А.В., Кондратов К.А., Князева А.А., Васютина М.Л., Головкин А.С.

ОРГАНСПЕЦИФИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ВОСПАЛЕНИЯ В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА РЫБАМ
DANIO RERIO 1069

Сорожкина Е.С., Кричевская Г.И., Балацкая Н.В., Куликова И.Г., Андрушин А.Е., Давыдова Г.А., Лисицына Т.А.

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ПРИ БОЛЕЗНИ БЕХЧЕТА, ПРОТЕКАЮЩЕЙ В АССОЦИИ
С УВЕИТОМ И БЕЗ ГЛАЗНЫХ ПОРАЖЕНИЙ 1079

Борщев Ю.Ю., Буровенко И.Ю., Карасева А.Б., Минасян С.М., Процак Е.С., Борщев В.Ю., Семенова Н.Ю., Борщева О.В., Суворов А.Н.,
Галагудза М.М.

ВЛИЯНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЫ НА УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ И УСТОЙЧИВОСТЬ
МИОКАРДА К ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ У КРЫС С СИНДРОМОМ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА 1089

Орлова Р.В., Жукова Н.В., Малкова А.М., Каледина Е.А., Губаль А.Р., Шаройко В.В.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОНЦЕНТРАЦИИ IL-1 β В СЫВОРОТКЕ КРОВИ, СООТНОШЕНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ
И ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ PD-L1 В ТКАНИ ОПУХОЛИ У ПАЦИЕНТОВ
С РАЗЛИЧНЫМИ СОЛИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ 1105

Хасанова Е.М., Ганковская Л.В., Бурмакина В.В.

РОЛЬ МУТАЦИИ ГЕНА ПРОТИВОМИКРОБНОГО ПЕПТИДА DEF126 В ПАТОГЕНЕЗЕ МУЖСКОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО
БЕСПЛОДИЯ 1115

Михальцова Е.Д., Попова Н.Н., Дроков М.Ю., Капранов Н.М., Давыдова Ю.О., Васильева В.А., Дубняк Д.С., Масликова У.В.,
Гальцева И.В., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ПРОФИЛАКТИКИ РТПХ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ КЛЕТЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ
У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК 1125

Шевела Е.Я., Дегтярева В.Г., Сосновская А.В., Воронова Е.В., Кафанова М.Ю., Ращупкин И.М., Останин А.А., Черных Е.Р.

КОРРЕГИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ РАСТВОРИМЫХ ФАКТОРОВ МАКРОФАГОВ M2-ФЕНОТИПА У ДЕТЕЙ С НАРУШЕНИЕМ РЕЧИ 1137

Безрукова Е.В., Воробейчиков Е.В., Конусова В.Г., Соснов А.В., Шамцян М.М., Артюшкин С.А., Симбирцев А.С.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ВИРУСНОГО НАЗОФАРИНГИТА 1151

Краткие сообщения

Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Спичина С.С., Мамус М.А.

ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК НЕЙТРОФИЛАМИ И МОНОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ
РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ: ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО ЦИТРУЛЛИНСОДЕРЖАЩЕГО АУТОАНТИГЕНА 1165

Бородин И.А., Гусякова О.А., Селезнева И.А., Гильмиярова Ф.Н., Ереценко А.А., Балдина О.А., Колотьева Н.А., Борисова О.В.

ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ COVID-19 1171

Антипова А.Ю., Дробышевская В.Г., Хамитова И.В.

СЛУЧАЙ ПАРВОВИРУСНОЙ В19 ИНФЕКЦИИ И ИММУНОДЕФИЦИТНОГО СОСТОЯНИЯ У ПАЦИЕНТА
С СИНДРОМОМ ЖИЛЬБЕРА 1177

Чурина Е.Г., Попова А.В., Уразова О.И., Патышева М.Р., Чумакова С.П., Колобовникова Ю.В., Казакова Е.О.

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ CD80 И HLA-DR НА МОНОЦИТАХ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ 1183

Сизякина Л.П., Андреева И.И., Уразмамбетов Р.Т., Чеботов С.А.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРОВ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА В ПЕРИОД
АДАПТАЦИИ К ОБУЧЕНИЮ В МЕДИЦИНСКОМ ВУЗЕ 1191

Правила для авторов 1197

Авторский указатель 1200

Предметный указатель 1200

CONTENTS

Reviews

Artemenkov A.A.

AGE-DEPENDENT DISREGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE IN HUMANS 1005

Blagov A.V., Bukaeva A.A., Makarov V.V., Bochkaeva Z.V.

SAFETY AND EFFICACY OF RNA VACCINES: STATE OF THE ART 1017

Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A.

IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF GRANULOCYTEMACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR
AND SYNTHETIC PEPTIDES OF HIS ACTIVE CENTER..... 1031

Antonov I.I., Mudrov V.P., Nelyubin V.N., Muraev A.A., Ivanov S.Yu.

CURRENT OPPORTUNITIES AND PROSPECTIVES OF IMMUNOTROPIC THERAPY IN CHRONIC GENERALIZED
PERIODONTITIS..... 1055

Original articles

Ma Yi, Fedorov A.V., Kondratov K.A., Knyazeva A.A., Vasyutina M.L., Golovkin A.S.

ORGAN-SPECIFIC LPS-INDUCED INFLAMMATORY GENE EXPRESSION IN ADULT ZEBRAFISH 1069

Sorozhkina E.S., Krichevskaya G.I., Balatskaya N.V., Kulikova I.G., Andryushin A.E., Davidova G.A., Lisitsyna T.A.

FEATURES OF SYSTEMIC CYTOKINE PRODUCTION IN BEHCET'S DISEASE ASSOCIATED WITH UVEITIS WITHOUT OCULAR
LESIONS..... 1079

Borshchev Yu.Yu., Burovenko I.Yu., Karaseva A.B., Minasyan S.M., Protsak E.S., Borshchev V.Yu., Semenova N.Yu., Borshcheva O.V.,
Suvorov A.N., Galagudza M.M.

EFFECT OF THE QUALITATIVE COMPOSITION OF A HIGH-FAT DIET IN RATS WITH SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE
SYNDROME UPON MYOCARDIAL RESISTANCE TO ISCHEMIC REPERFUSION INJURY AND CYTOKINE LEVELS..... 1089

Orlova R.V., Zhukova N.V., Malkova A.M., Kaledina E.A., Gubal A.R., Sharoiko V.V.

COMPARATIVE ANALYSIS OF IL-1 β BLOOD SERUM CONCENTRATION, NEUTROPHIL-TO-LYMPHOCYTES RATIO
IN PERIPHERAL BLOOD, AND THE LEVELS OF PD-L1 EXPRESSION IN MALIGNANT TISSUES OF THE PATIENTS
WITH VARIOUS SOLID TUMORS..... 1105

Khasanova E.M., Gankovskaya L.V., Burmakina V.V.

ROLE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE DEFB126 MUTATION IN PATHOGENESIS OF MALE IDIOPATHIC INFERTILITY 1115

Mikhaltsova E.D., Popova N.N., Drokov M.Yu., Kapranov N.M., Davydova Yu.O., Vasilieva V.A., Dubnyak D.S., Maslikova U.V.,
Galtseva I.V., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.

IMPACT OF GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE PROPHYLAXIS ON IMMUNE RECONSTITUTION IN PATIENTS AFTER
ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION 1125

Shevela E.Ya., Degtyareva V.G., Sosnovskaya A.V., Voronova E.V., Kafanova M.Yu., Rashchupkin I.M., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

THERAPEUTIC EFFECT OF SOLUBLE FACTORS OF M2 PHENOTYPE MACROPHAGES IN CHILDREN WITH LANGUAGE
IMPAIRMENTS 1137

Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Konusova V.G., Sosunov A.V., Shamtsyan M.M., Artyushkin S.A., Simbirtsev A.S.

EFFECT OF IMMUNE DRUGS TO TREAT ACUTE VIRAL NASOPHARYNGITIS 1151

Short communications

Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Spitsyna S.S., Mamus M.A.

FORMATION OF EXTRACELLULAR TRAPS BY CIRCULATING NEUTROPHILS AND MONOCYTES IN RHEUMATOID
ARTHRITIS PATIENTS: A STUDY OF NEW CITRULLINATED AUTOANTIGEN..... 1165

Borodina I.A., Gussyakova O.A., Selezneva I.A., Gilmiyarova F.N., Ereshchenko A.A., Baldina O.A., Kolotyeva N.A., Borisova O.V.

PROINFLAMMATORY STATUS OF ORAL FLUID IN COVID-19 1171

Antipova A.Yu., Drobyshevskaya V.G., Khamitova I.V.

CASE OF PARVOVIRUS B19 INFECTION AND IMMUNODEFICIENCY IN THE PATIENT WITH GILBERT SYNDROME..... 1177

Churina E.G., Popova A.V., Urazova O.I., Patysheva M.R., Chumakova S.P., Kolobovnikova Yu.V., Kazakova E.O.

EXPRESSION OF CD80 AND HLA-DR MOLECULES ON BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS 1183

Sizyakina L.P., Andreeva I.A., Urazmambetov R.T., Chebotov S.A.

CHARACTERISTICS OF THE PARAMETERS OF THE INNATE AND ACQUIRED IMMUNE RESPONSE DURING THE PERIOD
OF ADAPTATION TO TRAINING AT A MEDICAL UNIVERSITY 1191

Instructions to Authors 1197

Author index 1200

Subject index 1200

ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМАЯ ДИСРЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА У ЧЕЛОВЕКА

Артеменков А.А.

ФГБОУ ВО «Череповецкий государственный университет», г. Череповец, Вологодская обл., Россия

Резюме. В обзоре анализируются данные литературы по вопросу дисрегуляции иммунного ответа при старении организма. Показано, что нарушение врожденного и адаптивного иммунного ответа у лиц пожилого и старческого возраста в условиях распространения новой коронавирусной инфекции является отягощающим фактором течения заболевания и выздоровления. Прослежены нейро-иммуно-эндокринные изменения, возникающие в органах иммунной системы, иммунокомпетентных клетках, молекулах и рецепторных образованиях, участвующих в реализации иммунного ответа организма. Достаточно подробно анализируется дисбаланс оси мозг-кишечник-микробиота, в котором существенную роль отводят изменениям, происходящим в гипоталамо-надпочечниковой системе с участием биогенных нейромедиаторов и нейромодуляторов. Указывается на то, что микробиота кишечника может быть причастна к процессам нейродегенерации за счет токсического действия на мозг через нейро-иммуно-эндокринные и метаболические пути. Представлены данные, говорящие о том, что адреналин, норадреналин, дофамин и серотонин участвуют в дисрегуляции иммунного ответа, что делает этот процесс сходным с изменениями, возникающими в ходе общего адаптационного синдрома и стресс-реакции организма. С другой стороны, в обзоре отмечено, что хронический стресс при старении не только изменяет активность макрофагов, лимфоцитов и дендритных клеток, но и повышает уровень провоспалительных цитокинов в крови, таким образом влияя на проницаемость гематоэнцефалического барьера головного мозга. В статье подчеркивается, что при старении в организме постепенно формируется нейроэндокринный сенсорный путь дисрегуляции иммунного ответа. В этой связи отмечается, что в дисфункции иммунной системы задействованы афферентные нервные окончания и нейроны вагуса, адренергические и пептидергические нервы, влияющие на процессы, происходящие не только в тимусе, но и в головном мозге. Однако очевидно, что формирующийся в высших отделах нервной системы патодинамический «дезадаптирующий контур» также задействован в дисрегуляторных иммунных ответах при старении. Таким образом, в работе сделан вывод о том, что сигнальные сети регуляторных систем организма (нервной, иммунной и эндокринной) тесно взаимосвязаны, на протяжении всей жизни, но при старении и проникновении в организм антигенов это взаимодействие легко нарушается на разных уровнях организации живой материи, и это приводит к дисрегуляции.

Ключевые слова: иммуностарение, стресс, кишечная микробиота, нейроиммуноэндокринные взаимосвязи, иммунный ответ, дисрегуляция

Адрес для переписки:

Артеменков Алексей Александрович
ФГБОУ ВО «Череповецкий государственный университет»
162600, Россия, Вологодская обл., г. Череповец,
ул. Луначарского, 5.
Тел.: 8 (8202) 51-81-25.
E-mail: basis@live.ru

Address for correspondence:

Artemenkov Alexey A.
Cherepovets State University
162600, Russian Federation, Vologda Region, Cherepovets,
Lunacharsky str., 5.
Phone: 7 (8202) 51-81-25.
E-mail: basis@live.ru

Образец цитирования:

А.А. Артеменков «Возраст-зависимая дисрегуляция иммунного ответа у человека» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1005-1016.
doi: 10.15789/1563-0625-ADO-2192
© Артеменков А.А., 2021

For citation:

A.A. Artemenkov "Age-dependent dysregulation of the immune response in humans", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1005-1016. doi: 10.15789/1563-0625-ADO-2192
DOI: 10.15789/1563-0625-ADO-2192

AGE-DEPENDENT DISREGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE IN HUMANS

Artemenkov A.A.

Cherepovets State University, Cherepovets, Vologda Region, Russian Federation

Abstract. The review article analyzes literature data on the issues of immune response dysregulation during aging. It has been shown that impairment of innate and adaptive immune response in elderly and senile people under the conditions of spreading the new coronavirus infection is an aggravating factor in the course of the disease and recovery. Neuro-immuno-endocrine changes occurring in the organs of immune system, immunocompetent cells, molecules and receptor formations involved into the arising immune response have been traced. The imbalance of the brain-intestine-microbiota axis is considered in sufficient details, where a significant role is attributed to the changes occurring in hypothalamic-adrenal system under participation of biogenic neurotransmitters and neuromodulators. It is shown that intestinal microbiota may be involved into the neurodegeneration events, due to toxic effects on the brain *via* the neuro-immuno-endocrine and metabolic pathways. The data are presented, which show that adrenaline, norepinephrine, dopamine and serotonin are involved in the immune response dysregulation, thus making this process similar to the changes that occur during the general adaptation syndrome and stress response of the body. On the other hand, the review notes that chronic stress during aging not only alters the activity of macrophages, lymphocytes and dendritic cells, but also increases the level of proinflammatory cytokines in blood, thereby affecting permeability of the blood-brain barrier. The article emphasizes that with body aging, a neuroendocrine sensory pathway of immune response dysregulation is gradually formed. In this regard, it is noted that the afferent nerve endings and neurons of the vagus, adrenergic and peptidergic nerves are involved into dysfunction of immune system by affecting the processes occurring not only in thymus, but also in the brain. However, it is obvious that the pathodynamic “dysadapting circuit” formed in the higher compartments of nervous system is also involved in dysregulatory immune responses during aging. Hence, the work concludes that the signaling networks of the body’s regulatory systems (nervous, immune and endocrine) are closely interconnected throughout the lifetime, but with aging and penetration of antigens into the body, this interaction is easily disrupted at different levels of organization of living matter, thus leading to dysregulation.

Keywords: immune aging, stress, intestinal microbiota, neuroimmunoendocrine relationships, immune response, dysregulation

Введение

Возникшая в Китае пандемия COVID-19 «высветила» одну из важнейших проблем медицинской иммунологии, которую можно обозначить как возрастную дисрегуляцию иммунного ответа. Действительно, анализ распространенности коронавирусной инфекции по всему миру наглядно показывает, что доля инфицированных и переболевших новой коронавирусной инфекцией людей пожилого и старческого возраста значительно больше, чем лиц юношеского и зрелого возраста. В связи с этим можно предположить, что в организме человека имеются какие-то скрытые механизмы иммунитета, работа которых детерминирована возрастом. Причем эти механизмы существенно влияют на иммунную систему человека и дают ему возможность лучше активировать иммунную защиту в более раннем возрасте, чем в более позднем. Следовательно, есть основание полагать, что физиологическая дисрегуляция иммунной системы является возрастным нарушением способности регуляторных

систем организма человека поддерживать клеточно-гуморальный гомеостаз и, таким образом, снижать надежность физиологических систем при старении. В таких условиях стареющая иммунная система не способна функционировать полноценно и поддерживать врожденный и адаптивный иммунитет. Иными словами, при старении организма в условиях полиморбидности иммунная система способна переходить в состояние дезадаптации [14]. Очевидно и то, что одним из проявлений возраст-ассоциированной патологии является воспалительное старение, при котором в организме отмечается повышенное содержание воспалительных медиаторов и чрезмерная стимуляция иммунной системы экзогенными и эндогенными сигналами патогенности (вирусами, микробиотой желудочно-кишечного тракта) [3]. В связи с этим проблему дисрегуляции иммунного ответа при старении следует рассмотреть с двух сторон. Во-первых, со стороны естественного биологического угасания функций организма, поскольку мы здесь имеем дело

с инволюцией тимуса и формированием «болезней старости», опосредованных деятельностью кишечной флоры, ослабляющей защитные иммунные процессы. Во-вторых, с нейроэндокринными нарушениями, возникающими в организме на этой почве под влиянием многочисленных дезадаптирующих факторов среды, ослабляющих адаптивный иммунный ответ.

Целью данного обзора является анализ и обобщение литературных и собственных данных по вопросу старения иммунной системы и формирования нейроэндокринного сигнального пути дисрегуляции иммунного ответа.

Иммуностарение

Как известно, старение человека — это закономерный генетически детерминированный онтогенетический процесс угасания функций организма, характеризующийся физической и физиологической слабостью, которая сильно влияет на иммунную систему и приводит к ее дисфункции. В настоящее время наиболее распространена такая концепция иммуностарения, которая отражает связанные с возрастом структурные перестройки врожденных и адаптивных иммунных функций. Такого рода изменения иммунологического статуса организма чаще всего связаны с хроническим воспалением, более высокой частотой возникновения инфекций и возникновением хронических заболеваний [19, 30]. В то же время при старении выявляются возрастные изменения и в самих иммунных клетках и молекулах врожденного и адаптивного иммунитета и, как следствие, отмечается нарушение способности к взаимодействию их друг с другом. На основании этого уже можно говорить о возрастной дисрегуляции иммунитета и гемопоэза, развивающегося на фоне инволюции тимуса, ограничивающего выработку в организме Т-клеток и распределение типов Т-лимфоцитов в периферической крови человека [37]. Но наряду с внутренними изменениями врожденных и адаптивных иммунных функций при старении в организме возникают морфологические нарушения в стромальном микроокружении первичных и вторичных лимфоидных органов, что также играет важную роль в возрастной иммунной дисфункции, проявляющейся в снижении способности бороться с инфекцией, снижении иммунной реакции на вакцинацию, повышении заболеваемости раком, возникновении высокой распространенности аутоиммунитета и хронического воспаления [16]. Таким образом, очевидно, что старение иммунной системы проявляется на нескольких уровнях, включающих снижение выработки В- и Т-клеток в костном мозге и тимусе, и снижении функции зрелых лимфоцитов во вторичных лимфоидных тканях. В результате этого

пожилые люди не реагируют на иммунный вызов так активно, как молодые [36]. Иными словами данная концепция иммуностарения отражает возрастные изменения иммунных ответов (клеточных и серологических), влияющих на процесс генерации специфических ответов на антигены. Этим же объясняется наличие хронического воспаления слабой степени в патогенезе многих возрастных заболеваний, таких как атеросклероз, болезнь Альцгеймера, остеопороз и сахарный диабет.

Однако у некоторых людей преклонного возраста мы все же наблюдаем факт того, что дисфункция иммунной системы каким-то образом смягчается, вероятно, за счет генетических или экологических факторов, что позволяет избежать серьезных проблем со здоровьем [21]. Кроме того, сейчас имеются убедительные данные того, что у людей, регулярно занимающихся физическими упражнениями в картине крови наблюдается меньшее количество истощенных (стареющих) Т-клеток и повышенная их пролиферативная способность, низкий уровень воспалительных цитокинов, повышенная фагоцитарная активность нейтрофилов, сниженная воспалительная реакция на бактериальные инфекции и повышение цитотоксической активности НК-клеток. Все это указывает на то, что обычные физические упражнения способны регулировать иммунную систему и отсрочивать наступление иммунного старения [48]. Более того, состояние после физических упражнений можно использовать в качестве модели временной иммуносупрессии, возникающей после физического стресса. На данной модели можно изучать взаимодействие между нервной, эндокринной и иммунной системами, поскольку механизмы, лежащие в основе иммунных изменений, вызванных физическими упражнениями, непосредственно связаны с нейроэндокринными изменениями продукции катехоламинов, кортизола, бета-эндорфинов, стероидов и соматотропина [43]. А. Damiot и соавт. показали, что снижение физической активности во время социального дистанцирования при пандемии COVID-19 ведет к дисфункции иммунной системы у пожилых людей, а, напротив, регулярная физическая активность может стимулировать иммунитет [24]. В то же время известно, что игнорирование занятий физическими упражнениями, особенно в пожилом и старческом возрасте, часто приводит к саркопении — синдрому потери мышечной массы, приводящему к физической слабости и дряхлости. Но пока неясно, является ли дряхлость, саркопения и иммунное старение отдельными процессами или они возникают одновременно и тесно связаны с клеточными механизмами врожденного иммунитета и,

в частности, с дисфункцией нейтрофилов и воспалением. Тем не менее есть данные о том, что снижение миграции нейтрофилов и нарушение регуляции фосфоинозитид-3-киназного пути в нейтрофилах патогенетически способствует развитию саркопении и физической слабости [53]. Итак, возрастные дефекты врожденной иммунной системы непосредственно связаны с активацией нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, дендритных клеток и нарушением путей передачи сигнала, включая Toll-подобные рецепторы (TLR). Поэтому иммунное старение в системе врожденного иммунитета следует рассматривать как нарушение регуляции, а не исключительно как нарушение функции [47].

Предполагается, что немаловажную роль в дисфункции иммунной системы при старении играет тимус — первичный лимфоидный орган, необходимый для созревания и развития Т-лимфоцитов, которые в организме управляют адаптивными иммунными ответами. Но мы знаем, что продукция Т-клеток в тимусе также регулируется во времени из-за его возрастной инволюции. Тем не менее ключевые точки созревания и отбора Т-клеток находятся в корковых и мозговых областях этого органа для распознавания различных патогенов [51]. И все же можно констатировать, что тимус является не единственным органом иммунной системы, участвующим в Т-клеточном ответе на антиген при старении. Из других органов иммунной системы, изменяющихся при старении, следует отметить красный костный мозг, играющий ключевую роль в поддержании иммунологической памяти. Однако влияние старения на выработку эффекторных Т-клеток памяти и плазматических клеток в костном мозге человека до сих пор подробно не изучалось. Но благодаря исследованиям мы теперь можем точно сказать, что экспрессия молекул, участвующих в поддержании иммунологической памяти изменяется с возрастом [40]. В то же время мы видим, что содержание интерлейкина 15 (IL-15), защищающего CD4⁺ и CD28-стареющие Т-клетки, увеличивается, а количество IL-7 — уменьшается. Не исключено, что IL-6, который может действовать синергически с IL-15 также сверхэкспрессируется, тогда как интерферон γ (IFN γ), фактор некроза опухоли (TNF) и активные формы кислорода (ROS) существенно накапливаются в костном мозге в пожилом возрасте. Иными словами, экспрессия IL-15 и IL-6 стимулируется IFN γ и коррелирует с уровнем ROS в мононуклеарных клетках костного мозга. Отсюда следует, что с возрастом воспаление и окислительный стресс являются основным фактором, определяющим выживание иммунных клеток в костном мозге.

И, наконец, нам следует упомянуть о феномене иммунного истощения, который развивается во время иммунного ответа при хронических инфекциях, аутоиммунных и опухолевых заболеваниях и приводит к формированию антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов с особыми свойствами. У таких Т-лимфоцитов в целом снижена продукция цитокинов и пролиферативная активность, а также на их поверхности увеличена экспрессия ингибиторных рецепторов. В итоге у этих клеток изменяется цитотоксическая функция, в частности по-другому происходит образование пула клеток памяти. В итоге Т-лимфоциты с такими свойствами получили название «истощенных» [15].

Таким образом, можно с уверенностью сказать, что иммунное старение — это серия возрастных изменений, происходящих в организме человека и негативно влияющих на иммунную систему, со временем приводящих к повышенной ее уязвимости перед инфекционными заболеваниями. Причем эти изменения влияют на основные компоненты иммунитета, включая клетки адаптивной иммунной системы и молекулы, которые определяют поддержание и функционирование иммунной системы и лимфоидных органов, участвующих в иницировании иммунных ответов [38].

Дисбаланс оси «мозг — кишечник — микробиота»

Рассмотрев некоторые аспекты иммуностарения, перейдем к вопросу о непосредственном влиянии на этот процесс микрофлоры кишечника. Заметим, что еще знаменитый русский биолог, патолог и иммунолог И.И. Мечников в работе «этюды о природе человека» указывал на то, что кишечная флора может наносить серьезные повреждения здоровью, поскольку продукты ее жизнедеятельности (фенол, индол, скатол) способны вызывать хронические отравления. Будучи глубоко убежденным в этом, И.И. Мечников на этот счет пишет следующее: «Предположение мое о роли кишечной флоры в обусловливании старости уже больше не есть гипотеза, как прежде, а научно установленный факт» [6]. Действительно, сейчас имеется много работ, подтверждающих слова Мечникова. Так, в работе рассматривается двунаправленная связь между микробиотой кишечника и головным мозгом человека — так называемая ось (MGB) [44]. В данную ось вовлечены различные афферентные и эфферентные пути, инфекционные агенты, кишечные нейротрансмиттеры, нейромодуляторы, сенсорные волокна блуждающего нерва, цитокины. Все эти связи передают информацию в ЦНС о состоянии кишечника, а ось «гипоталамус — гипофиз — надпочечники» регулирует высвобождение

ние нейрпептидов, влияющих на состав микробиоты кишечника.

В этой связи примечательно, что в последнее время в русскоязычной литературе большое внимание уделяется исследованию связей между микробиотой кишечника и иммунной системой ввиду их совместной эволюции и системного взаимодействия на протяжении всей жизни. Такая совместная ассоциация и нейросетевые связи играют важную роль в модуляции иммунитета. Не исключено, что микробиота кишечника представляет собой ключевой элемент, способный влиять на функции антигена и вызывать защитный иммунный ответ [10]. Однако некоторые авторы указывают на то, что наряду с защитными эффектами микробиота кишечника синтезирует не только полезные для организма биологически активные вещества, но и высвобождает нейротоксины, нейромедиаторы, липополисахариды, амилоиды, оказывающие нейрорхимическое действие на мозг через нейроэндокринные, иммунные и метаболические пути, которые могут негативно влиять на ЦНС и играть значительную роль в индукции нейродегенеративных заболеваний [12]. Следовательно, нарушения вдоль оси «мозг — кишечник — микробиота» могут вносить значительный вклад в патогенез нейродегенеративных расстройств, в том числе болезни Альцгеймера, характеризующейся прогрессирующим снижением когнитивных функций из-за образования бляшек бета-амилоида (Аβ). Можно констатировать, что в настоящее время большое количество работ подтверждает ключевую роль дисбактериоза кишечника в развитии нейродегенерации, поскольку изменение микробиоты кишечника и развитие дисбактериоза вызывает повышение проницаемости кишечного барьера и активацию иммунной системы, ведущую к системному воспалению, которое в свою очередь нарушает деятельность гематоэнцефалического барьера и, в конечном итоге, ведет к нейродегенерации [33]. Действительно, одна из систем, которая начинает тесно взаимодействовать с микробиотой кишечника, — это нейроэндокринная система организма, которая контролирует различные процессы в организме через ось «гипоталамус — гипофиз — надпочечники» (НРА). Это взаимодействие имеет решающее значение, поскольку различные нарушения оси MGB «микробиота — кишечник — мозг» связаны с нарушением регуляции оси НРА «гипоталамус — гипофиз — надпочечники». Следовательно, можно полагать, что в организме существует двунаправленная связь между микробиотой кишечника и регуляторной системой «гипоталамус — гипофиз — надпочечники». Причем эта двусторонняя связь тесно взаимодействует с другими физиоло-

гическими системами, такими как иммунная, вегетативная, кишечный и гематоэнцефалические барьеры [28, 54].

Таким образом, видно, что микробиота кишечника оказывает влияние на иммунную регуляцию и аутоиммунитет, поскольку ее специфические компоненты и метаболиты участвуют в производстве провоспалительных цитокинов и последующем образовании клеток Th17 и регуляторных Т-клеток (Treg), и, таким образом, способствует подавлению иммунитета [31]. Обобщенная схема организации этого процесса представлена на рисунке 1 (см. 2-ю стр. обложки).

К тому же нейротрансмиттеры, такие как адреналин, норадреналин, серотонин и дофамин в организме человека не только регулируют моторику кишечника и усвоение питательных веществ, но и способны влиять на иммунную систему и микробиоту желудочно-кишечного тракта. Т.е. данные биогенные амины являются модуляторами, регулирующими ось MGB за счет двусторонней связи (микробиота — кишечник — мозг) [35, 55].

Стресс и нейроиммуноэндокринные взаимосвязи

Участие нейротрансмиттеров в дисрегуляции иммунного ответа еще раз показывает, что при старении в организме развиваются морфофункциональные изменения сходные с теми, что наблюдаются при стрессе. Поэтому гуморальные защитные системы организма при старении и стрессе включаются в ответную реакцию практически одновременно и регулируются одними и теми же нервно-гуморальными факторами. Одной из групп геропротекторов, регулирующих экспрессию генов и синтез соответствующих белков в организме, являются короткие пептиды (цитогены). В связи с этим считается, что их использование может способствовать нормализации функций единой нейрогуморальной системы у лиц пожилого и старческого возраста [5]. Можно также думать, что при стрессе и физиологическом старении возникают иммунологические нарушения, способствующие развитию когнитивного дефицита в организме. Эти нарушения непосредственно связаны с работой сложного комплекса адаптационных механизмов, включающего образования ЦНС, иммунной и эндокринной систем, которые постоянно обмениваются сигналами в виде нервных импульсов и медиаторов. В свою очередь, головной мозг самостоятельно продуцирует цитокины, которые вместе с другими нейромедиаторами регулируют когнитивные функции. Стресс сопровождается ростом концентрации цитокинов в крови и увеличением проницаемости гематоэнцефалического барьера и, соответственно, проникновением цитокинов и миграции дендритных клеток и лимфоцитов в

паренхиму мозга. Подобные неблагоприятные изменения протекают в головном мозге пожилых людей даже при нормальном физиологическом старении. Поэтому при длительном стрессе и старении организма иммунологические и гуморальные нарушения приводят к гиперактивации и последующему истощению гипоталамо-гипофизано-надпочечниковой оси [9].

Может сложиться впечатление, что иммунная реакция и реакция на стресс эквивалентны и что антигены представляют собой не что иное, как определенные типы стрессоров. С этой позиции считается, что центральным механизмом воспалительной реакции и реакции на стресс является деятельность макрофагов, причем стойкость воспалительных стимулов с течением времени представляет собой биологический фон, благоприятствующий восприимчивости возрастных заболеваний [29]. Как видно из вышесказанного, острые и хронические стрессы действительно могут влиять на иммунную систему за счет секреции гормонов, уровень которых также изменяется с возрастом. Пожилые люди не равны по своей реакции на стрессы от внешних и внутренних факторов по сравнению лицами юношеского возраста. И это, в свою очередь, может повлиять на способность пожилых людей формировать эффективный иммунный ответ [52]. Итак, с одной стороны, мы видим, что старение серьезно ослабляет иммунную систему человека ввиду возникновения множественных изменений во врожденных и адаптивных защитных системах организма, связанных с провоспалительной средой. С другой стороны, острые и хронические стрессы отрицательно влияют на иммунную систему за счет секреции гормонов, содержание которых в крови существенно изменяется с возрастом. Поэтому есть основания полагать, что данные нарушения приводят к изменению реактивности организма пожилых людей и к тому, что они становятся не равны в своих реакциях на стрессоры по сравнению с молодыми людьми, а это, в свою очередь, снижает способность формировать эффективный иммунный ответ [27].

Можно считать уже доказанным, что мозг влияет на иммунную систему через психологический стресс, который подавляет многие функции организма и иммунной системы [50]. Очевидно и то, что развитие депрессии при старении связано с реакцией организма на длительный стресс. А депрессивные состояния, как известно, отрицательно сказываются на работе нервной, эндокринной и иммунной систем. Изменения в этих системах приводят к нарушению нейрогенеза, процессов синаптического ремоделирования и воспалительной активации иммунной системы. А это, в свою очередь, влечет за собой увеличе-

ние концентрации в крови кортизола и провоспалительных цитокинов и увеличению аллостатической нагрузки на организм. Стрессовое увеличение аллостатической нагрузки и снижение концентрации нейротрофического фактора головного мозга в конечном счете приводит к нейродегенерации и необратимым когнитивным нарушениям [39].

Отсюда следует, что психоэмоциональный стресс способен вызвать нарушение регуляции иммунитета и усиление нейровоспалительных сигналов за счет многократной активации нейроэндокринной и вегетативной систем, что способствует развитию тревоги и депрессии. В основе развития тревоги и депрессии лежит вызванная стрессом активация микроглии и передача моноцитов в мозг. Активация нейронов и микроглии мозга усиливает симпатические эффекты на иммунную систему и повышает способность миелиноидных клеток-предшественников красного костного мозга мигрировать по всему телу, включая различные участки ЦНС [45]. Эти факты указывают на то, что иммунные клетки играют непосредственную роль в стресс-реакции, поскольку хронический стресс способствует делению митохондрий в CD4⁺T-клетках, вызывая повышенный синтез ксантина, который действует на мозг и вызывает тревожное состояние [32]. Несколько иные эффекты вызывает окислительный и воспалительный стресс, связанный у пожилых людей с функцией иммунных клеток, активность которых зависит от окислительно-восстановительного процессов, протекающих в этих клетках [17].

Таким образом, резюмируя вышеизложенное можно сказать, что адаптивный ответ организма на психические и физические воздействия среды включает модуляцию трех регуляторных систем: нервной, эндокринной и иммунной. А прочная связь между этими системами необходима для поддержания иммунного гомеостатического баланса, а также для обеспечения здоровья и выживания человека [22].

Нейроэндокринный сенсорный путь дисрегуляции иммунного ответа

В настоящее время фундаментальные исследования в области нейроиммунофизиологии в целях сохранения здоровья человека направлены, прежде всего, на изучение путей обмена информацией между нервной и иммунной системами. Эти перспективные работы могут способствовать установлению нейроэндокринных сенсорных путей дисрегуляции иммунного ответа в организме человека при старении, а также — при инфекционной и соматической патологии. Имеющиеся в исследованиях данные говорят о том, что в ответ на поступление антигенов организм инициирует продукцию цитокинов, рецепторы которых рас-

положены на периферических нейронах и нервных окончаниях вагуса. Иными словами, афферентные нервные окончания и нейроны вагуса могут отвечать на действие цитокинов и, таким образом, эти сигналы передаются в нейроны центральной нервной системы. Т.е. информация о поступлении в организм антигенов и воспалении поступает в головной мозг по афферентным вегетативным путям. В связи с этим выдвинута гипотеза о передаче информации от иммунной системы в высшие отделы ЦНС по вегетативным нервам [4]. Действительно, фрагменты патогенов, цитокинов и других иммунных молекул с участием сенсорных нейронов генерируют иммунорегуляторные ответы через эфферентную передачу сигналов вегетативных нейронов. Функциональная организация данного нейронного контроля основана на принципах рефлекторной регуляции с участием блуждающего и других нервов и реализуется на моделях воспалительных и аутоиммунных заболеваний, характеризующихся дисрегуляцией периферического иммунитета и воспалением [42]. В других исследованиях указывается на то, что взаимодействие нейроэндокринной системы и тимуса осуществляется через нейроэндокринно-иммунные адаптивные системы организма [13]. Так или иначе, присутствие адренергических и пептидергических нервов в тимусе создает условия для воздействия продуцируемых ими нейропептидов. Последние активируют рецепторы на тимотических клетках и таким образом влияют на процессы, происходящие в тимусе (в том числе на созревание Т-лимфоцитов, продукцию цитокинов, гормонов и пептидов). В свою очередь, продуцируемые тимусом пептиды и контролируемые ими цитокины проникают в мозг и воздействуют на его нейроны, что создает основу для поддержания гомеостаза в ответ на любую инфекцию. Но при старении организма, а также при некоторых заболеваниях (инфекционных, аутоиммунных, нейродегенеративных) возникают нарушения процессов взаимодействия в тимусе и ЦНС за счет изменения сигнальных реакций. В связи с этим, взаимодействие нервной и иммунной системы при старении и сопутствующих ему заболеваниях вызывает большой интерес, поскольку многие аспекты этого процесса остаются неясными. Это связано не только со сложностью процесса старения, но и со взаимной зависимостью и взаимной причинностью изменений и заболеваний нервной и иммунной систем. Старение мозга приводит к изменениям в иммунной системе, а старение иммунной системы (старение Т-клеток и инволюция тимуса) в свою очередь негативно сказывается на нервной системе, когнитивных функциях и способствует развитию нейродегенерации [34].

Судя по имеющимся данным, существуют сходные черты иммунологических и нейропатологических процессов при нейродегенеративных заболеваниях. Именно хроническое воспаление, формирующееся в организме с участием клеточных и гуморальных компонентов врожденного и адаптивного иммунного ответа, является основным триггерным процессом развития нейродегенерации [7]. Таким образом, признается тесная функциональная связь между центральной нервной системой и иммунной системой, поскольку определенные компоненты периферической иммунной системы и определенные типы иммунных ответов влияют на модуляцию и прогрессирование болезни Альцгеймера у стареющих людей [20]. Появляется все больше доказательств того, что периферические иммунные клетки участвуют в регуляции нейрогенеза гиппокампа. Итак, очевидно, что микроглиальные и нейрональные нарушения при болезни Альцгеймера опосредуются нарушением передачи сигнала хемокинового лиганда через его рецептор (CX3CL1/CX3CR1), а изменение этого сигнального пути связано с нейрогенезом гиппокампа [25]. Следовательно, мозг и иммунная система постоянно взаимодействуют как при нормальном, так и патологическом функционировании. Иначе говоря, старение человека, обычно сопровождающееся воспалением слабой степени, как в иммунной, так и в центральной нервной системе, способствует развитию нейродегенеративных процессов в мозге стареющего человека [26]. Именно поэтому у пожилых людей часто наблюдается нарушение регуляции иммунитета и снижение когнитивных функций мозга. Это, в свою очередь, происходит потому, что старение повышает чувствительность микроглии к сигналам, вызванным иммунными процессами. В стареющем мозге микроглия реагирует на сигналы иммунной системы, производя большое количество провоспалительных цитокинов, в том числе интерлейкина-1 β (IL-1 β). Поскольку IL-1 β играет центральную роль в воспалительной реакции организма и является ключевым медиатором и модулятором множества биологических функций, то его нерегулируемая продукция несомненно влияет на гиппокамповозависимые системы памяти и процессы синаптической пластичности [41]. И это обстоятельство, по-видимому, существенно влияет на пуринергическую сигнальную систему и нарушает процессы регенерации периферической крови при старении организма. Ведь экспериментальные данные показывают, что аденозинтрифосфат (АТФ) и его производные могут оказывать выраженное влияние на функциональные свойства лейкоцитов посредством ауто- и паракринной регуляции [11].

В конечном итоге мы должны признать, что нейровоспаление — это, прежде всего, реакция ЦНС на нарушенный гомеостаз. Но все же основными реактивными компонентами ЦНС являются клетки микроглии и инфильтрирующие миелоидные клетки, астроциты, олигодендроциты, цитокины и их сигнальные пути, которые участвуют в нарушении иммунной регуляции, связанной с воспалением [46]. Таким образом, ЦНС, в которой циркулирует большое количество переносимых кровью иммунных клеток, оказывается уязвимой для дисрегуляторных сетей цитокинов [18]. Итак, на хронические воспалительные заболевания влияет нарушение регуляции цитокинов, которое вызывает спонтанную инвазию фагоцитов и иммунопатологию ЦНС. Этот повреждающий фактор, стимулирующий колонию гранулоцитов-макрофагов, имеет решающее значение для патогенной дисфункции Т-клеток в доклинических моделях формирования аутоиммунитета. Причем фагоциты, мигрирующие в ЦНС, при этом генерируют активные формы кислорода и вторгаются в другие органы [49].

Но, с нашей точки зрения, дело здесь не может ограничиться нарушением регуляции цитокинов, влияниями макроглии и пуринергическими эффектами на иммунные процессы в организме при старении. Нами показано, что этиопатогенетическим пусковым механизмом нарушения регуляторных процессов в организме человека являются дезадаптирующие факторы среды, которые могут оказывать влияния по двум направлениям: 1) воздействием через рецепторы на гипоталамические нейроны, и в дальнейшем, через гормоны гипофиза (АКТГ и ГТГ), изменять деятельность надпочечников и половых желез; 2) воздействием на холинергические, гамкергические, серотонинергические, дофаминергические, адренергические нейроны головного мозга с высвобождением медиаторов [1]. Кроме того, измененная регуляция функций организма при старении может осуществляться через формирующийся в ЦНС патодинамический «дезадаптирующий контур», в который входят нейроны моторной, сенсорной и ассоциативных зон коры, так как они оказывают сильное влияние на многочисленные висцеральные функции [2]. Таким образом, сформированный в коре больших полушарий и подкорковых образованиях головного мозга патодинамический «дезадаптирующий контур» по нисходящим нервным путям влияет на гипоталамо-гипофизарную систему, а через нее — на гуморальную систему и иммунный ответ организма.

Резюмируя вышесказанное, можно полагать, что механизмы старения проявляют свое неблагоприятное

действие на организм на различных уровнях: молекулярном, клеточном, тканевом и системном. Первичные молекулярные повреждения при старении вызывают клеточный ответ, направленный на компенсацию возникших нарушений, однако сами механизмы восстановления и поддержания иммунного гомеостаза постепенно выходят из строя. Когда количество «ошибок» в регуляторных сетях достигает критического порога, то на системном уровне происходит фазовый переход из состояния здоровья в состояние болезни [8]. Таким образом, очевидно, что роль иммунной системы заключается в защите организма от антигенов. И эта функция развивалась и формировалась в процессе эволюции, поэтому иммунная система несомненно способствует увеличению продолжительности жизни и долголетию. Старение — это постепенное и медленное истощение, вызванное аутоиммунитетом, управляемое вилочковой железой, регулируемое ЦНС и эпифизом. Учитывая тот факт, что вилочковая железа может быть стимулятором старения, ремоделирование иммунной системы, наблюдаемое у пожилых людей и долгожителей, вероятно, не является причиной старения, а является его следствием, что помогает сохранять иммунитет в течение всей жизни [23].

Заключение

Таким образом, возраст-зависимая дисрегуляция иммунного ответа имеет, так сказать, глубокие корни и связана она со спецификой самого процесса биологического старения. Поскольку сам процесс онтогенетического старения человека связан с нарушением в организме структуры и функции, то иммуностарение можно рассматривать как частный случай биологического старения, который сводится к закономерным изменениям, происходящим в иммунной системе. По нашему мнению, этот процесс, так же как и старение организма, происходит на разных уровнях организации организма. На системном уровне нарушается нейро-эндокринно-иммунное взаимодействие между нервной, иммунной и эндокринной системами, что нарушает их согласованную работу. На органном уровне, который образуют органы иммунной системы (тимус, красный костный мозг и лимфоидные органы) происходит ограничение выработки ими иммунокомпетентных В- и Т-клеток. На клеточном уровне появляются дефекты в самих иммунокомпетентных клетках (В- и Т-лимфоцитах, нейтрофилах, моноцитах, макрофагах, дендритных клетках). На рецепторном уровне происходит нарушение путей передачи сигнала в Toll-подобных рецепторах в результате их блокирования (ингибирование) лигандами. С изменениями, про-

исходящими на этом уровне, связан «эффект иммунного истощения», в ходе которого формируются Т-лимфоциты, обладающие сниженной продукцией цитокинов и низкой пролиферативной активностью. И так как на поверхности этих клеток увеличена экспрессия ингибиторных рецепторов, то отсюда на молекулярном уровне возникают эффекты иммунных клеток, которые связаны со способностью индуцирования выработки молекул, участвующих во врожденном и адаптивном иммунитете. Заметим, что «ключевыми» молекулами в этом процессе являются интерфероны и цитокины.

Тем не менее в последнее время иммуноустойчивость все больше стали связывать с кишечными нейротрансмиттерами, нейромодуляторами и токсинами, которые активно синтезируются кишечной флорой, особенно при дисбактериозе. Считается, что развивающаяся в системе «мозг — кишечник — микробиота» дисфункция обычно реализуется через ось «гипоталамус — гипофиз — надпочечники» и ее молекулами-посредниками являются адреналин, норадреналин, серотонин и дофамин. Участие данных нейротрансмиттеров в дисрегуляции иммунного ответа еще раз нам показывает, что при старении в организме возникают изменения сходные с теми, что формируются в ходе стресс-реакции организма. Отсюда следует, что индуцированные стрессом нарушения иммунного ответа связаны с работой общих адаптационных механизмов, включающих структурные образования ЦНС, органы эндокринной и иммунной систем. Также не исключено, что нейроэндокринные и иммунные нарушения вызывают гиперактивацию оси «гипоталамус — гипофиз — надпочечники» и последующее истощение ее деятельности. Этот дисрегуляторный процесс

усугубляет воспалительная реакция, связанная с деятельностью макрофагов. Т.е., с одной стороны, мы в действительности видим, что старение ослабляет иммунную систему, а с другой — острые и хронические стрессы негативно влияют на иммунную систему через гормоны и нейромедиаторы. Иначе говоря, мозг влияет на иммунную систему через стресс-реакцию и увеличенный уровень кортизола и провоспалительных цитокинов в крови. В этой связи можно с большой уверенностью сказать, что в организме в процессе старения и воздействия неблагоприятных факторов внешней среды в условиях полиморбидности формируется нейроэндокринный сенсорный путь дисрегуляции иммунного ответа. Этот факт подтверждается тем, что сенсорные нейроны могут регулировать иммунные ответы через эфферентную передачу сигнала с вегетативных нервов. Также считается доказанным, что присутствие адренергических и пептидергических нервов в тимусе создает условия для активации рецепторов, находящихся на тимотических клетках, и для передачи сигнала для изменения их метаболической активности. Таким образом, можно сделать вывод, что возраст-зависимая дисфункция иммунного ответа происходит в сигнальных сетях двух осей «гипоталамус — гипофиз — надпочечники» и «мозг — кишечник — микробиота» под влиянием сформированного в коре и подкорковых образованиях головного мозга патодинамического «дезатирующего контура». В этот контур включены гамкергические, серотонинергические, дофаминергические и адренергические нейроны мозга, пептиды и гормоны гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, кишечник и его микробиота, способные изменять клеточный и гуморальный иммунный ответ.

Список литературы / References

1. Артеменков А.А. Деадаптивные нарушения регуляции функций при старении // Успехи геронтологии. 2018. Т. 31, № 5. С. 696-706. [Artemenkov A.A. Maladaptive dysregulation of functions during aging. *Uspekhi gerontologii = Advances in Gerontology*, 2018, Vol. 31, no. 5, pp. 696-706. (In Russ.)]
2. Артеменков А.А. Деадаптивный нейропатологический синдром старения кровеносных сосудов // Российский кардиологический журнал. 2019. № 24 (9). С. 33-40. [Artemenkov A.A. Maladaptive neuropathological syndrome of aging of blood vessels. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*, 2019, no. 24 (9), pp. 33-40. (In Russ.)]
3. Артемьева О.В., Ганковская Л.В. Воспалительное старение как основа возраст-ассоциированной патологии // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 419-432. [Artemieva O.V., Gankovskaya L.V. Inflammatory aging as the basis of age-associated pathology. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 419-432. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IAT-1938.
4. Корнева Е.А. Пути взаимодействия нервной и иммунной систем: история и современность, клиническое применение // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 405-418. [Korneva E.A. Ways of interaction of the nervous and immune systems: history and modernity, clinical application. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 405-418. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PON-1974.
5. Кузник Б.И., Чалисова Н.И., Цыбиков Н.Н., Линькова Н.С., Давыдов С.О. Стресс, старение и единая гуморальная защитная система. Эпигенетические механизмы регуляции // Успехи физиологических наук,

2020. Т. 51, № 3. С. 51-68. [Kuznik B.I., Chalisova N.I., Tsybikov N.N., Linkova N.S., Davydov S.O. Stress, aging and a unified humoral defense system. Epigenetic mechanisms of regulation. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk = Advances in Physiological Sciences*, 2020, Vol. 51, no. 3, pp. 51-68. (In Russ.)]

6. Мечников И.И. Записки старого биолога. О том, как нужно жить и когда умирать. М.: Родина, 2020. 512 с. [Mechnikov I.I. Notes of an old biologist. How to live and when to die]. Moscow: Rodina, 2020. 512 p.

7. Нижегородова Д.Б., Левковская А.Н., Зафранская М.М. Иммунологические механизмы нейровоспаления и нейродегенерации // Иммунология, аллергология, инфектология, 2018. № 4. С. 27-42. [Nizhegorodova D.B., Levkovskaya A.N., Zafranskaya M.M. Immunological mechanisms of neuroinflammation and neurodegeneration. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya = Immunology, Allergology, Infectology*, 2018, no. 4, pp. 27-42. (In Russ.)]

8. Прошкина Е.Н., Соловьев И.А., Шапошников М.В., Москалев А.А. Ключевые молекулярные механизмы старения, биомаркеры и потенциальные интервенции // Молекулярная биология, 2020. Т. 54, № 6. С. 883-921. [Proshkina E.N., Soloviev I.A., Shaposhnikov M.V., Moskaev A.A. Key molecular mechanisms of aging, biomarkers and potential interventions. *Molekuljarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2020, Vol. 54, no. 6, pp. 883-921. (In Russ.)]

9. Пухальский А.Л., Шмарина Г.В., Алешкин В.А. Иммунологические нарушения и когнитивный дефицит при стрессе и физиологическом старении. Часть I: патогенез и факторы риска // Вестник РАМН, 2014. № 5-6. С. 14-22. [Pukhalsky A.L., Shmarina G.V., Alyoshkin V.A. Immunological impairments and cognitive deficits during stress and physiological aging. Part I: pathogenesis and risk factors. *Vestnik RAMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2014, no. 5-6, pp. 14-22. (In Russ.)]

10. Романчук Н.П. Здоровая микробиота и натуральное функциональное питание: гуморальный и клеточный иммунитет // Бюллетень науки и практики, 2020. Т. 6, № 9. С. 127-166. [Romanchuk N.P. Healthy microbiota and natural functional nutrition: humoral and cellular immunity. *Byulleten nauki i praktiki = Bulletin of Science and Practice*, 2020, Vol. 6, no. 9, pp. 127-166. (In Russ.)]

11. Сладкова Е.А., Шамрай Е.А., Тищенко А.Ю., Скоркина М.Ю. Функциональная характеристика периферической крови людей зрелого возраста при активации пуринергической сигнальной системы // Журнал медико-биологических исследований, 2019. Т. 7, № 3. С. 272-279. [Sladkova E.A., Shamrai E.A., Tishchenko A.Yu., Skorkina M.Yu. Functional characteristics of peripheral blood of people of mature age upon activation of the purinergic signaling system. *Zhurnal mediko-biologicheskikh issledovaniy = Journal of Biomedical Research*, 2019, Vol. 7, no. 3, pp. 272-279. (In Russ.)]

12. Соболев К.В. Роль микробиоты в нейродегенеративных заболеваниях // Онтогенез, 2018. Т. 49, № 6. С. 333-352. [Sobol K.V. The role of microbiota in neurodegenerative diseases. *Ontogenez = Ontogenesis*, 2018, Vol. 49, no. 6, pp. 333-352. (In Russ.)]

13. Торховская Т.И., Белова О.В., Зимина И.В., Крючкова А.В., Москвина С.Н., Быстрова О.В., Арион В.Я., Сергиенко В.И. Нейропептиды, цитокины и тимотические пептиды как эффекторы взаимодействия тимуса и нейроэндокринной системы // Вестник РАМН, 2015. Т. 70, № 6. С. 727-733. [Tikhovskaya T.I., Belova O.V., Zimina I.V., Kryuchkova A.V., Moskvina S.N., Bystrova O.V., Arion V.Ya., Sergienko V.I. Neuropeptides, cytokines and thymotic peptides as effectors of interaction between the thymus and the neuroendocrine system. *Vestnik RAMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, Vol. 70, no. 6, pp. 727-733. (In Russ.)]

14. Ширинский В.С., Ширинский И.С. 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.S. Polymorbidity, aging of the immune system and systemic sluggish inflammation – a challenge to modern medicine. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 609-624. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-РАО-2042.

15. Южанинова С.В., Сайдакова Е.В. Феномен иммунного истощения // Успехи современной биологии, 2017. Т. 137, № 1. С. 70-83. [Yuzhaninova S.V., Saidakova E.V. The phenomenon of immune exhaustion. *Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Modern Biology*, 2017, Vol. 137, no. 1, pp. 70-83. (In Russ.)]

16. Akha A.A.S. Aging and the immune system: An overview. *J. Immunol. Methods*, 2018, Vol. 463, pp. 21-26.

17. Alonso-Fernández P., de la Fuente M. Role of the immune system in aging and longevity. *Curr. Aging Sci.*, 2011, Vol. 4, no. 2, pp. 78-100.

18. Becher B., Spath S., Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 1, pp. 49-59.

19. Bowen L., Nath A., Smith B. CNS immune reconstitution inflammatory syndrome. *Handb. Clin. Neurol.*, 2018, Vol. 152, pp. 167-176.

20. Cao W., Zheng H. Peripheral immune system in aging and Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.*, 2018, Vol. 13, no. 1, 51. doi: 10.1186/s13024-018-0284-2.

21. Castelo-Branco C., Soveral I. The immune system and aging: a review. *Gynecol. Endocrinol.*, 2014, Vol. 30, no. 1, pp. 16-22. doi: 10.3109/09513590.2013.852531.

22. Cruces J., Venero C., Pereda-Pérez I., de la Fuente M. The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication. *Curr. Pharm. Des.*, 2014, Vol. 20, no. 29, pp. 4608-4628.

23. Csaba G. Immunity and longevity. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2019, Vol. 66, no. 1, pp. 1-17.

24. Damiot A., Pinto A.J., Turner J.E., Gualano B. Immunological implications of physical inactivity among older adults during the COVID-19 pandemic. *Gerontology*, 2020, Vol. 66, no. 5, pp. 431-438.

25. de Miranda A.S., Zhang C.-J., Katsumoto A., Teixeira A.L. Hippocampal adult neurogenesis: does the immune system matter? *J. Neurol. Sci.*, 2017, Vol. 372, pp. 482-495.
26. di Benedetto S., Müller L., Wenger E., Düzel S., Pawelec G. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2017, Vol. 75, pp. 114-128.
27. Fali T., Vallet H., Sauce D. Impact of stress on aged immune system compartments: overview from fundamental to clinical data. *Exp. Gerontol.*, 2018, Vol. 105, pp. 19-26.
28. Farzi A., Fröhlich E.E., Holzer P. Gut microbiota and the neuroendocrine system. *Neurotherapeutics*, 2018, Vol. 15, no. 1, pp. 5-22.
29. Franceschi C., Bonafè M., Valensin S., Olivieri F., de Luca M., Ottaviani E., Benedictis G. De Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, Vol. 908, pp. 244-254.
30. Fuentes E., Fuentes M., Alarcón M., Palomo I. Immune system dysfunction in the elderly. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 2017, Vol. 89, no. 1, pp. 285-299.
31. Haase S., Haghighi A., Wilck N., Müller D.N., Linker R.A. Impacts of microbiome metabolites on immune regulation and autoimmunity. *Immunology*, 2018, Vol. 154, no. 2, pp. 230-238.
32. Hang S., Huh J. The immune-mind connection. *Cell.*, 2019, Vol. 179, no. 4, pp. 803-805.
33. Kowalski K., Mulak A. Brain-gut-microbiota axis in alzheimer's disease. *J. Neurogastroenterol. Motil.*, 2019, Vol. 25, no. 1, pp. 48-60.
34. Liang Z., Zhao Y., Ruan L., Zhu L., Jin K., Zhuge Q., Su D.-M., Zhao Y. Impact of aging immune system on neurodegeneration and potential immunotherapies. *Prog. Neurobiol.*, 2017, Vol. 157, pp. 2-28.
35. Mittal R., Debs L.H., Patel A.P., Nguyen D., Patel K., O'Connor G., Grati M., Mittal J., Yan D., Eshraghi A.A., Deo S.K., Daunert S., Liu X.Z. Neurotransmitters: the critical modulators regulating gut-brain axis. *J. Cell. Physiol.*, 2017, Vol. 232, no. 9, pp. 2359-2372.
36. Montecino-Rodriguez E., Berent-Maoz B., Dorshkind K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 3, pp. 958-965.
37. Müller L., di Benedetto S., Pawelec G. The immune system and its dysregulation with Aging. *Subcell. Biochem.*, 2019, Vol. 91, pp. 21-43.
38. Nikolich-Zugich J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nat. Immunol.*, 2018, Vol. 19, no. 1, pp. 10-19.
39. Ogłodek E., Szota A., Just M., Moś D., Araszkiewicz A. The role of the neuroendocrine and immune systems in the pathogenesis of depression. *Pharmacol. Rep.*, 2014, Vol. 66, no. 5, pp. 776-781.
40. Pangrazzi L., Meryk A., Naismith E., Koziel R., Lair J., Krismer M., Trieb K., Grubeck-Loebenstein B. "Inflamm-aging" influences immune cell survival factors in human bone marrow. *Eur. J. Immunol.*, 2017, Vol. 47, no. 3, pp. 481-492.
41. Patterson S. L. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*. 2015, Vol. 96, (Pt A), pp. 11-18.
42. Pavlov V.A., Chavan S.S., Tracey K.J. Molecular and functional neuroscience in immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 36, pp. 783-812.
43. Pedersen B.K., Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.*, 2000, Vol. 80, no. 3, pp. 1055-1081.
44. Petra A.I., Panagiotidou S., Hatzigelaki E., Stewart J.M., Conti P., Theoharides T.C. Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation. *Clin. Ther.*, 2015, Vol. 37, no. 5, pp. 984-995.
45. Ramirez K., Fornaguera-Trías J., Sheridan J.F. Stress-induced microglia activation and monocyte trafficking to the brain underlie the development of anxiety and depression. *Curr. Top. Behav. Neurosci.*, 2017, Vol. 31, pp. 155-172.
46. Ransohoff R.M., Schafer D., Vincent A., Blachère N.E., Bar-Or A. Neuroinflammation: ways in which the immune system affects the brain. *Neurotherapeutics*, 2015, Vol. 12, no. 4, pp. 896-909.
47. Shaw A.C., Joshi S., Greenwood H., Panda A., Lord J. M. Aging of the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, 2010, Vol. 22, no. 4, pp. 507-513.
48. Simpson R.J., Lowder T.W., Spielmann G., Bigley A.B., LaVoy E.C., Kunz H. Exercise and the aging immune system. *Ageing Res. Rev.*, 2012, Vol. 11, no. 3, pp. 404-420.
49. Spath S., Komuczki J., Hermann M., Pelczar P., Mair F., Schreiner B., Becher B. Invasion and immunopathology in the central nervous system. *Immunity*, 2017, Vol. 46, no. 2, pp. 245-260.
50. Straub R.H., Cutolo M. Psychoneuroimmunology-developments in stress research. *Wien. Med. Wochenschr.*, 2018, Vol. 168, no. 3-4, pp. 76-84.
51. Thapa P., Farber D.L. The role of the thymus in the immune response. *Thorac. Surg. Clin.*, 2019, Vol. 29, no. 2, pp. 123-131.
52. Vallet H., Fali T., Sauce D. Aging of the immune system: from fundamental to clinical data. *Rev. Med. Interne*, 2019, Vol. 40, no. 2, pp. 105-111.
53. Wilson D., Jackson T., Sapey E., Lord J.M. Frailty and sarcopenia: the potential role of an aged immune system. *Ageing Res. Rev.*, 2017, Vol. 36, pp. 1-10.

54. Yirmiya K., Djalovski A., Motsan S., Zagoory-Sharon O., Feldman R. Stress and immune biomarkers interact with parenting behavior to shape anxiety symptoms in trauma-exposed youth. *Psychoneuroendocrinology*, 2018, Vol. 98, pp. 153-160.
55. Zapatera B., Prados A., Gómez-Martínez S., Marcos A. Immunonutrition: methodology and applications. *Nutr. Hosp.*, 2015, Vol. 31, Suppl. 3, pp. 145-154.

Автор:

Артеменков А.А. — к.б.н., доцент, член-корр. РАН, факультет биологии и здоровья человека, ФГБОУ ВО «Череповецкий государственный университет», г. Череповец, Вологодская обл., Россия

Author:

Artemenkov A.A., PhD (Biology), Associate Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Natural Sciences, Faculty of Biology and Human Health, Cherepovets State University, Cherepovets, Vologda Region, Russian Federation

Поступила 23.01.2021

Отправлена на доработку 20.04.2021

Принята к печати 21.04.2021

Received 23.01.2021

Revision received 20.04.2021

Accepted 21.04.2021

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ РНК-ВАКЦИН: ЧТО ИЗВЕСТНО НА СЕГОДНЯШНИЙ ДЕНЬ

Благов А.В., Букаева А.А., Макаров В.В., Бочкаева З.В.

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, Россия

Резюме. Разработку РНК-вакцин от COVID-19, затребовавшую всего несколько месяцев на все фазы клинических испытаний и регистрационные процедуры и увенчавшуюся успешным выводом на рынок, можно назвать одним из главных прорывов фармакологии за последний год. Несмотря на все кажущиеся на первый взгляд неоспоримыми преимущества, с момента открытия в 1993 г. до прошлого года ни одна из разрабатываемых РНК-вакцин не вышла к III фазе клинических испытаний.

Считается, что первый опыт успешного использования вакцин на основе мРНК был еще в 90-х годах прошлого века, когда было обнаружено, что вакцинирование мышей липосомами с мРНК, кодирующей антиген, инициировало формирование иммунного ответа у животных. Однако в те годы метод не нашел применения по причине токсичности используемых липидов. В последующем было предпринято большое количество попыток разработки вакцин от других вирусных инфекций, включая вирус Зика, вирус денге, вирус Эбола, цитомегаловирус, вирус гриппа и т.д. Несмотря на важность профилактики этих заболеваний, разработка вакцинного препарата является довольно длительным процессом, не всегда увенчивающимся успехом. Однако пандемия COVID-19 стала большим стимулом для ускорения процесса разработки мРНК-вакцин.

На момент написания обзора в мире зарегистрированы только две вакцины на основе мРНК, обе для профилактики COVID-19 – BNT162b2 и мРНК-1273. Их эффективность и безопасность продолжают активно изучать до сих пор. Более того, не прошло и года с начала пандемии, как появились новые штаммы коронавируса SARS-CoV-2, эффективность вакцин против которых оказалась ниже, чем против референсного варианта патогена. Учитывая, что в мире с большой скоростью распространяются три новых штамма SARS-CoV-2: «британский», «африканский» и «бразильский», уже известны результаты первых оценок эффективности препаратов против них. Как и предполагалось, основываясь на мутациях этих штаммов, вакцины BNT162b2 и мРНК-1273 сохраняют эффективность против «британского» штамма, однако их защитные свойства сильно ослаблены против «африканского».

В данном обзоре рассмотрены принцип действия и способ доставки в клетки молекул мРНК, описаны некоторые из разработанных ранее, но не зарегистрированных РНК-вакцин и результаты, полученные при их исследовании. Кроме того, в обзоре обсуждаются актуальные на момент написания данные об эффективности и безопасности зарегистрированных для профилактики COVID-19 РНК-вакцин.

Ключевые слова: РНК-вакцина, пандемия, COVID-19, SARS-CoV-2, вакцина, BNT162b2, мРНК-1273, коронавирус

Адрес для переписки:

Бочкаева Занда Владимировна
ФГБУ «Центр стратегического планирования и
управления медико-биологическими рисками здоровью»
ФМБА России
119435, Россия, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 1.
Тел.: 8 (495) 540-61-74 (доб. 1134).
E-mail: ZBochkaeva@cspmtz.ru

Address for correspondence:

Bochkaeva Zanda V.
Center for Strategic Planning and Management of Biomedical
Health Risks, Federal Medical Biological Agency
119435, Russian Federation, Moscow, Pogodinskaya str.,
10, bldg 1.
Phone: 7 (495) 540-61-74 (acc. 1134).
E-mail: ZBochkaeva@cspmtz.ru

Образец цитирования:

А.В. Благов, А.А. Букаева, В.В. Макаров, З.В. Бочкаева
«Эффективность и безопасность РНК-вакцин:
что известно на сегодняшний день» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1017-1030.
doi: 10.15789/1563-0625-SAE-2320
© Благов А.В. и соавт., 2021

For citation:

A.V. Blagov, A.A. Bukaeva, V.V. Makarov, Z.V. Bochkaeva
“Safety and efficacy of RNA vaccines: State of the art”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1017-1030.
doi: 10.15789/1563-0625-SAE-2320
DOI: 10.15789/1563-0625-SAE-2320

SAFETY AND EFFICACY OF RNA VACCINES: STATE OF THE ART

Blagov A.V., Bukaeva A.A., Makarov V.V., Bochkaeva Z.V.

Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Abstract. This review describes principles of action and the method of delivery of mRNA molecules into cells, as well as some of developed RNA vaccines and the results obtained in their study, though they have not been authorized for use yet. In addition, the review discusses efficacy and safety proved for RNA vaccines registered for COVID-19 prevention at the time of writing. The development, clinical trials and market launch of RNA vaccines for mass immunization in a few months can be considered one of the major breakthroughs in pharmacology over the past year. Despite of all seemingly indisputable advantages, none of RNA vaccines had reached Phase III of clinical trials since the moment of its discovery in 1993 until last year. The first experience of the successful use of mRNA vaccines was back in the 90s of the last century, when vaccination of mice with liposomes encoding an antigen-encoding mRNA was found to initiate specific immune response in mice. However, in these years, the method did not find application, due to the toxicity of lipids used. Subsequently, a large number of attempts have been made to develop vaccines against other viral infections, including Zika virus, Dengue virus, Ebola virus, cytomegalovirus, influenza virus and others. Despite the importance for preventing the spread of these diseases, the development of a vaccine preparation is a rather lengthy process, and final success is not guaranteed. However, the COVID-19 pandemic has become speeded the development of mRNA vaccines up.

At the time of writing the review, two mRNA-based vaccines have been registered only in the world, both, BNT162b2 and mRNA-1273, were against COVID-19. Their effectiveness and safety are still actively studied. Moreover, it took less than a year for new strains of SARS-CoV-2 to appear, and the efficiency of vaccines against them was found to be lower than against the reference pathogen variant. Considering that the three new strains of SARS-CoV-2, “British”, “African” and “Brazilian”, are rapidly spreading in the world, the first results of efficiency evaluation of vaccines against them have already been published. One may expect that, considering mutations in these strains, the BNT162b2 and mRNA-1273 vaccines will remain effective against the “British” strain, but their protective properties are greatly weakened against the “African” variant.

Keywords: RNA vaccine, pandemic, COVID-19, SARS-CoV-2, vaccine, BNT162b2, mRNA-1273, coronavirus

Введение

Иммунизация на данный момент считается одной из самых эффективных мер по контролю и профилактике инфекционных заболеваний. При разработке вакцин очень важны не только эффективность и безопасность, но и простота производства и способ транспортировки до пункта вакцинации, так как именно от них зависят доступность профилактического препарата населению и скорость формирования популяционного иммунитета.

В 1993 году впервые вышла публикация об успешном опыте стимуляции клеточного иммунитета у мышей при помощи вакцинирования липосомами с молекулами мРНК, кодирующими нуклеопротеины вируса гриппа. Эксперименты показали эффективность использования мРНК для стимуляции иммунного ответа на закодированный в ней антиген, но липиды, использованные для доставки молекул РНК в клетки, были слишком токсичны для применения на лю-

дях [22]. Проблема доставки была главным «камнем преткновения» в развитии генной терапии: молекулы нуклеиновых кислот, особенно РНК, быстро разрушаются нуклеазами в биологических жидкостях и, будучи заряженными, сами не способны проникать в клетки сквозь фосфолипидный бислой клеточной мембраны [16, 45]. В связи с этим разработка РНК-вакцин была на некоторое время приостановлена, пока не было показано успешное использование липидных наночастиц (ЛНЧ). Липидные наночастицы представляют собой синтетический аналог клеточной мембраны. Сначала их использовали для решения проблемы доставки и биодоступности малорастворимых терапевтических молекул, позднее с их помощью научились доставлять малые интерферирующие РНК, а затем и более крупные молекулы РНК [40]. Используемые на сегодняшний день ЛНЧ представляют собой смесь липидов, включающую положительно заряженные и полиэтиленгликоль (ПЭГ)-содержащие липиды, которые в определенных условиях при смешивании

с молекулами нуклеиновых кислот собираются в систему ЛНЧ, содержащих олигонуклеотиды (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). При попадании в биологическую жидкость наночастицы защищают нуклеиновые кислоты от деградации и доставляют их непосредственно в клетки, поскольку способны сливаться с клеточной мембраной, высвобождая содержимое в цитоплазму [11].

Как и для любой вакцины, основной целью вакцинации мРНК является создание длительного защитного иммунитета против патогена, что достигается при помощи экспрессии антигена с мРНК, которая при попадании в клетку распознается и считывается клеточным трансляционным аппаратом. Использование РНК, а не ДНК, для вакцинирования сильно упрощает и ускоряет процесс синтеза антигена: поскольку транскрипция ДНК возбудителя не требуется, синтез белка начинается сразу, как только мРНК попадает в клетку. Важным преимуществом является также то, что РНК-вакцины не требуют адъюванта: фрагмент РНК вирусного генома, содержащий консервативные патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП), при попадании в цитоплазму распознается паттерн-распознающими рецепторами (ППР) как эндосомальными (толл-подобные рецепторы, ТПР) так и цитоплазматическими (РНК-активируемые протеинкиназы, хеликаза MDA5, белок RIG-I, 2'-5'-олигоденилатсинтаза и др.), что индуцирует синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов [3, 20] (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки). Провоспалительные факторы, помимо других эффектов, активируют клетки иммунной системы, включая дендритные, трансформируя их в антигенпрезентирующие клетки, которые представляют пептиды антигена, кодируемого мРНК-вакциной, на своей поверхности в соединении с молекулами главного комплекса гистосовместимости, стимулируя адаптивный иммунный ответ. Таким образом, РНК, вызывая врожденный иммунный ответ и инициируя провоспалительное состояние, выполняет также функцию естественного адъюванта [14, 34, 39].

РНК-вакцины: состояние проблемы до пандемии COVID-19

Традиционные и самореплицирующиеся РНК-вакцины

Вакцины на основе мРНК относятся к генным вакцинам, к которым также можно отнести плазмидные ДНК-вакцины и более широко известные векторные вакцины. Главным отличием генных вакцин является то, что антиген не представлен нативным или рекомбинантным белком, а закодирован в гене. Это создает преимущество по сравнению с белковыми и инактивированными вакцинами, поскольку позволяет получить

большее количество антигена за счет многократной трансляции белка с одной молекулы мРНК [23]. Однако при разработке РНК-вакцин следует учитывать нестабильность молекул РНК и необходимость распознавания их трансляционным аппаратом клеток человека. Для этого РНК патогена модифицируют: в качестве изменений структуры РНК на концевые участки молекулы добавляют 5'-кэп и 3'-полиадениловый «хвост», также вводят нетранслируемые области, оптимизируют кодоны и модифицируют нуклеозиды [5, 21, 23, 37].

Существует два типа мРНК-вакцин: традиционная и самореплицирующаяся (ср-мРНК). В первом случае трансляция белка идет только с матрицы исходной мРНК, во втором — в последовательность мРНК добавляют участок генома альфавируса, кодирующий неструктурные белки, которые позволяют исходной мРНК самореплицироваться (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки). Таким образом, из исходной молекулы РНК образуется много промежуточных РНК, с которых экспрессируется иммуногенный белок, что позволяет получить большее количество антигена и, соответственно, вызвать более сильный иммунный ответ. С другой стороны, дополнительно экспрессирующиеся белки альфавируса могут стать причиной неспецифического усиления воспалительного ответа, что может привести к росту побочных реакций на введение вакцины [37].

Плюсы и минусы РНК-вакцин

Главным преимуществом РНК-вакцин является скорость их разработки и производства. Матричную РНК легко получить, если известна последовательность гена, кодирующего антиген: по матрице ДНК путем транскрипции *in vitro* синтезируют мРНК и с помощью ДНКаз очищают ее от использованной дезоксирибонуклеиновой кислоты [37]. Хотя основным путем производства плазмидной ДНК на сегодняшний день является наработка плазмид в бактериальной культуре *E. coli*, появляются новые эффективные методы бесклеточного синтеза кольцевой ДНК [47]. Минимизация использования живых бактериальных культур и вирусов в производстве вакцин позволяет снизить риски контаминации и сделать производство еще более быстрым и безопасным [37].

Дополнительным преимуществом РНК-вакцин в сравнении с некоторыми другими типами вакцин (например субъединичными и инактивированными) является их способность активировать цитотоксический иммунный ответ, который отвечает за разрушение инфицированных вирусом клеток. В таких вакцинах критически важными этапами являются доставка генов внутрь клеток и их экспрессия, в случае неправильного функционирования данных процессов презен-

тация антигена Т-лимфоцитам не происходит и, как следствие, не развивается Т-клеточный адаптивный иммунный ответ.

Нестабильность РНК является следствием иммуногенности: как было сказано выше, мРНК патогена распознается внутриклеточными ПРР, рецепторами врожденного иммунитета, нормальной функцией которых является защита от внутриклеточных патогенов [29]. Однако дополнительная стимуляция может являться как недостатком из-за описанной выше опасности деградации молекулы и развития слишком сильной воспалительной реакции [32], так и преимуществом по причине того, что непосредственно мРНК может выполнять роль адъюванта и усиливать иммунный ответ на введение вакцины [29]. Нестабильность РНК отражается также на условиях хранения мРНК-вакцин (от -80°C до -20°C), что существенно усложняет транспортировку ввиду необходимости поддержания условий холодовой цепи [37], хотя применение липидных наночастиц позволяет повысить термостабильность мРНК-вакцин, что, возможно, смягчит требования по хранению и транспортировке мРНК-вакцин [8].

На сегодняшний день мРНК можно рассматривать в качестве удобной универсальной платформы для быстрой разработки вакцин против разных патогенов. Новые вакцины могут отличаться только последовательностью целевого антигена, а состав, схема производства и способ введения могут оставаться прежними. Отсутствие живого вируса в составе препарата также делает мРНК-вакцины безопасными ввиду отсутствия риска интеграции генетического материала возбудителя в геном клетки и длительной персистенции антигена [37].

Примеры РНК-вакцин, разработанных до пандемии COVID-19

Вакцины на основе мРНК приобрели широкую известность во время пандемии COVID-19 из-за необходимости быстрого создания профилактического средства в условиях роста численности инфицированных SARS-CoV-2. Тем не менее разработки мРНК-вакцин против различных патогенов велись еще задолго до наступления текущей пандемии. И, несмотря на то, что большая часть данных разработок находится на стадии испытаний на животных моделях, есть несколько вакцин, для которых были инициированы или даже проведены первые испытания на людях (табл. 1). Так, вакцины от вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), гриппа, респираторного синцитиального вируса (РСВ) и бешенства прошли первую фазу клинических испытаний, а для вакцины от цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции уже был объявлен набор добровольцев на вторую

фазу клинических исследований [26]. Для вакцин от РСВ, ЦМВ и бешенства был показан сильный гуморальный ответ [1, 2, 19, 26], кроме того, для вакцин против ЦМВ и ВИЧ также наблюдали усиленный CD4^{+} и CD8^{+} Т-клеточный ответ [17, 19, 22, 30]. Практически во всех случаях наблюдали высокую эффективность РНК-вакцин: к примеру, для вакцины от гриппа эффективность составила от 78% до 87% [7, 31, 46, 54], для вакцины от бешенства — 100% (табл. 1) [1]. Однако для получения окончательно достоверных результатов по эффективности требуется проведение второй и третьей фаз клинических испытаний на более крупных выборках пациентов. Стоит отметить, что ни в одном из случаев тяжелые побочные эффекты выявлены не были, за исключением повышенной реактогенности вакцины от бешенства при введении увеличенной дозы [1]. В данной ситуации, возможно, целесообразным является применение самореплицирующихся РНК-вакцин, что позволит достичь тех же результатов по экспрессии целевого антигена при введении существенно меньшего количества РНК.

Интересно, что использование не упакованных в липидную оболочку мРНК в составе вакцины не приводит к возникновению побочных эффектов, что, вероятно, связано со специфическими модификациями, которым подвергаются молекулы РНК для эффективной доставки. Тем не менее на сегодняшний день оптимальным способом доставки РНК считается ее упаковка в наночастицы, поскольку инкапсуляция в липидную оболочку наиболее эффективно повышает стабильность нуклеиновой кислоты. При недостаточном иммунном ответе возможным решением является применение бустерной вакцинации, что было показано в исследовании на животных вакцины от вируса Конго-крымской геморрагической лихорадки (ВККГЛ) [15]. Доминирование же определенных ветвей иммунитета, возможно, связано либо с преобладающим типом иммунного ответа на конкретный патоген (например лейшмании являются внутриклеточными паразитами и поэтому вызывают преимущественно клеточный иммунный ответ [13]), либо с репертуаром рецепторов и антител, которые связываются с эпитопами, закодированными во вводимой мРНК (например вакцина от лихорадки денге была создана на основе последовательностей, кодирующих иммунодоминантные CD8^{+} Т-клеточные эпитопы [35, 48, 52]).

Уже на основе представленных данных было понятно, что вакцины на основе мРНК имеют высокие перспективы занять устойчивую нишу

на рынке иммунологических препаратов, если следующие фазы испытаний окажутся столь же успешными, как и исследования на животных и клеточных культурах. Как видно из таблицы 1, эффективность вакцин составляет от 50% до 100%, побочные эффекты, выявленные в I фазе клинических исследований, были легкой и средней тяжести и сопоставимы с побочными эффектами для вакцин на основе других платформ

против данных заболеваний. В то же время стоит внимательно подходить к подбору дозы препарата, что было продемонстрировано на примере повышенной реактогенности вакцины от бешенства, связанной, вероятно, с увеличенным количеством мРНК, которая является сильным иммуногенным фактором.

ТАБЛИЦА 1. мРНК-ВАКЦИНЫ, РАЗРАБОТАННЫЕ ПРОТИВ РАЗНЫХ ПАТОГЕНОВ В ПЕРИОД ДО ПАНДЕМИИ COVID-19
TABLE 1. mRNA VACCINES DEVELOPED BEFORE COVID-19 PANDEMIC

Патоген Pathogen	Платформа доставки Platform	Иммунный ответ Immune response	Эффективность Efficacy	Побочные эффекты Side effect	Тип исследования Type of trial
ВККГЛ* CCHFV*	мРНК mRNA	IgG CD4⁺Т-лимфоциты CD8⁺Т-лимфоциты IgG CD4 ⁺ T lymphocytes CD8 ⁺ T lymphocytes	100% при бустерной вакцинации, 50% при однократном введении 100% after booster dose, 50% after single dose	Нет данных Data not available	Исследования на животных [15] Preclinical studies [15]
Вирус Зика Zika virus	Липидные наночастицы Lipid nanoparticles	Общий IgG Нейтрализующие антитела CD4⁺Т-лимфоциты IgG, including neutralizing antibodies CD4 ⁺ T lymphocytes	100% для мышей, 80% – для макаков-резусов 100% in mice 80% in rhesus macaque monkeys	Нет данных Data not available	Исследования на животных [28] Preclinical studies [28]
Вирус денге Dengue virus	Липидные наночастицы Lipid nanoparticles	CD8⁺Т-лимфоциты CD8 ⁺ T lymphocytes	72%	Нет данных Data not available	Исследования на животных [35, 48, 52] Preclinical studies [35, 48, 52]
		IgG Нейтрализующие антитела CD4⁺Т-лимфоциты CD8⁺Т-лимфоциты IgG, including neutralizing antibodies CD4 ⁺ T lymphocytes CD8 ⁺ T lymphocytes	100%		
		IgG Нейтрализующие антитела CD4⁺Т-лимфоциты CD8⁺Т-лимфоциты IgG, including neutralizing antibodies CD4 ⁺ T lymphocytes CD8 ⁺ T lymphocytes	Нет данных Data not available		
Вирус Эбола Ebola virus	Липидные наночастицы Lipid nanoparticles	IgG Нейтрализующие антитела IgG, including neutralizing antibodies	100%	Нет данных Data not available	Исследования на животных [25] Preclinical studies [25]

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

Патоген Pathogen	Платформа доставки Platform	Иммунный ответ Immune response	Эффективность Efficacy	Побочные эффекты Side effect	Тип исследования Type of trial
ВИЧ** HIV**	мРНК mRNA	CD4 ⁺ Т-лимфоциты CD8 ⁺ Т-лимфоциты CD4 ⁺ T lymphocytes CD8 ⁺ T lymphocytes	Нет данных Data not available	Нет данных Data not available	Исследования на клетках и на животных [17] Preclinical studies [17]
		CD4 ⁺ Т-лимфоциты CD8 ⁺ Т-лимфоциты CD4 ⁺ T lymphocytes CD8 ⁺ T lymphocytes	Нет данных Data not available	Легкой степени тяжести Mild side effects	Фаза I клинических испытаний [22] Phase I of clinical trials [22]
	Липидные наночастицы Lipid nanoparticles	IgG Нейтрализующие антитела IgG, including neutralizing antibodies	Нет данных Data not available	Нет данных Data not available	Исследования на животных [30] Preclinical studies [30]
Вирус гриппа Influenza virus	ср-мРНК self-replicating mRNA	CD8 ⁺ Т-лимфоциты CD8 ⁺ T lymphocytes	Нет данных Data not available	Нет данных Data not available	Исследования на животных [46] Preclinical studies [46]
	Липидные наночастицы Lipid nanoparticles	IgG CD4 ⁺ Т-лимфоциты IgG CD4 ⁺ T lymphocytes	Нет данных Data not available	Нет данных Data not available	Исследования на животных [31] Preclinical studies [31]
	Липидные наночастицы Lipid nanoparticles	IgG Нейтрализующие антитела CD4 ⁺ Т-лимфоциты CD8 ⁺ Т-лимфоциты (в доклинических исследованиях) IgG, including neutralizing antibodies CD4 ⁺ T lymphocytes CD8 ⁺ T lymphocytes (in preclinical studies)	От 78% до 87% в клинических исследованиях From 78% to 87% in phase I of clinical trial	Боль в месте инъекции, миалгия, головная боль, усталость и симптомы озноба / простуды, эритема Pain after injection, myalgia, headache, tiredness, chills and flu-like symptoms, erythema	Исследования на животных и фаза I клинических испытаний [7] Preclinical studies and phase I of clinical trial [7]
	Липидные наночастицы, конъюгированные маннозой Mannose-conjugated lipid nanoparticles	IgG CD4 ⁺ Т-лимфоциты (Th1) IgG CD4 ⁺ T lymphocytes (Th1)	100%	Нет данных Data not available	Исследования на животных [54] Preclinical studies [54]

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Патоген Pathogen	Платформа доставки Platform	Иммунный ответ Immune response	Эффективность Efficacy	Побочные эффекты Side effect	Тип исследования Type of trial
Вирус ВЭЛ*** VEEV***	ср-мРНК self-replicating mRNA	IgG CD4⁺Т-лимфоциты CD8⁺Т-лимфоциты IgG CD4 ⁺ T lymphocytes CD8 ⁺ T lymphocytes	100%	Нет данных Data not available	Исследования на животных [36] Preclinical studies [36]
Лейшмания Leishmaniasis	мРНК mRNA	CD4⁺Т-лимфоциты (Th1) CD8⁺Т-лимфоциты CD4 ⁺ T lymphocytes (Th1) CD8 ⁺ T lymphocytes	Нет данных Data not available	Нет данных Data not available	Исследования на животных [22] Preclinical studies [22]
ЦМВ**** CMV****	Липидные наночастицы Lipid nanoparticles	IgG Нейтрализующие антитела CD4⁺Т-лимфоциты CD8⁺Т-лимфоциты IgG, including neutralizing antibodies CD4 ⁺ T lymphocytes CD8 ⁺ T lymphocytes	Нет данных Data not available	Нет данных Data not available	Исследования на животных [19] Preclinical studies [19]
ЦМВ**** CMV****	Липидные наночастицы Lipid nanoparticles	Нейтрализующие антитела Neutralizing antibodies	Нет данных Data not available	Головная боль, усталость, миалгия и озноб Headache, tiredness, myalgia and chills	Фаза I клинических испытаний [26] Phase I of clinical trial [26]
РСВ***** RSV*****	мРНК mRNA	IgG	Нет данных Data not available	Нет No	Фаза I клинических испытаний [2] Phase I of clinical trial [2]
Вирус бешенства Rabies virus	Липидные наночастицы Lipid nanoparticles	IgG Нейтрализующие антитела IgG, including neutralizing antibodies	100%	Высокая реактогенность при дозе от 5 мкг, головокружение, тахикардия High immune response after 5 µg dose	Фаза I клинических испытаний [1] Phase I of clinical trial [1]

Примечание. * – вирус Конго-крымской геморрагической лихорадки, ** – вирус иммунодефицита человека, *** – вирус Венесуэльского энцефалита лошадей, **** – цитомегаловирус, ***** – респираторный синцитиальный вирус.

Note. *, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus; **, Human Immunodeficiency Virus; ***, Venezuelan Equine Encephalitis Virus; ****, Cytomegalovirus; *****, Respiratory Syncytial Virus.

Зарегистрированные РНК-вакцины (от COVID-19)

Пандемия COVID-19 дала мощный толчок развитию РНК-вакцин. В условиях экстренной необходимости создания эффективного сред-

ства для профилактики заболевания технология получения РНК-вакцин представляется особенно перспективной, поскольку она позволяет не только быстро создать новую вакцину, но и при

необходимости относительно быстро адаптировать уже существующую вакцину к появляющимся новым вариантам вируса. Первые в мире зарегистрированные РНК-вакцины — это вакцины от коронавирусной инфекции: BNT162b2, разработанная компаниями Pfizer и BioNTech, и мРНК-1273, разработанная компанией Moderna, специализирующейся на разработке лекарственных средств на основе РНК. Рандомизированные плацебо-контролируемые клинические испытания фазы III показали, что эффективности вакцин после получения двух доз с интервалом в 21 день составляют 96% для BNT162b2 и 94,1% для мРНК-1273, причем обе вакцины показали 100%-ную эффективность в защите от тяжелого течения заболевания COVID-19 [6, 33] (табл. 2). Во второй половине ноября 2020 г. с разницей в несколько дней разработчики обеих вакцин объявили предварительные результаты III фазы клинических испытаний и позже получили разрешение Управления по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA — Food and Drug Authority) и Европейского агентства лекарственных средств (EMA — European Medicines Agency) на использование вакцин для гражданского насе-

ления в связи с чрезвычайным положением [42, 43]. В конце декабря 2020 г. вакцина BNT162b2 была добавлена Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в список лекарственных средств, допустимых для использования в условиях чрезвычайной ситуации, что означает, что вакцина прошла все необходимые проверки по безопасности и эффективности по стандартам организации. Кроме BNT162b2 в этот список в феврале 2021 г. была добавлена только вакцина ChAdOx1 [50].

Безопасность вакцин BNT162b2 и мРНК-1273

Учитывая, что известны случаи, когда SARS-CoV-2 инициировал развитие аутоиммунных заболеваний (АИЗ), были опасения, что вакцины для профилактики коронавирусной инфекции могут также спровоцировать выработку аутоантител и развитие аутоиммунной патологии [18]. Однако, согласно официальным отчетам и публикациям, несмотря на высокую реактогенность РНК и возможное влияние вируса на иммунную систему организма, связи между РНК-вакцинами и развитием АИЗ пока не обнаружено. Вакцинирование пациентов с АИЗ всегда требует тщательной оценки риска и поль-

ТАБЛИЦА 2. СРАВНЕНИЕ ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫХ мРНК-ВАКЦИН

TABLE 2. REGISTERED mRNA VACCINES AGAINST COVID-19

	BNT162b2	мРНК-1273 mRNA-1273
Эффективность после 2 вакцинаций Efficacy after 2 booster dose	96%	94,5%
Доставка Platform	ЛНЧ Lipid nanoparticles	ЛНЧ Lipid nanoparticles
Антиген Antigen	Нуклеозид-модифицированная мРНК, кодирующая S-белок mRNA of S protein with modified nucleosides	мРНК, кодирующая S-белок mRNA of S protein
Липиды Lipids	Смесь липидов, включая ПЭГ-содержащие липиды и холестерин Lipids, including PEG-modified lipids and cholesterol	Смесь липидов, включая ПЭГ-содержащие липиды и холестерин Lipids, including PEG-modified lipids and cholesterol
Условия хранения Storage	от -80 °C до -60 °C from -80 °C to -60 °C	от -25 °C до -15 °C, возможно от 2 °C до 8 °C до 30 дней from -25 °C to -15 °C, from +2 °C to +8 °C up to 30 days

зы в каждом конкретном случае, поэтому обычно данную группу пациентов не включают в клинические испытания новых лекарственных препаратов. Однако в фазу III клинических испытаний РНК-вакцины BNT162b2 были включены несколько пациентов с ревматоидным артритом (0,3% среди испытуемых и 0,3% в группе, получившей плацебо), и было отмечено, что заболевание не влияет на эффективность и безопасность исследуемой РНК-вакцины [33]. Что касается другой РНК-вакцины, мРНК-1273, в отчете FDA среди возможных системных побочных эффектов, вызванных вакцинацией, указано развитие ревматоидного артрита на 14-й день у людей с гипотиреозом [42]. В целом риски иммунизации РНК-вакцинами для людей с аутоиммунными заболеваниями могут быть рассмотрены, так же как и риски иммунизации другими нецельновирионными вакцинами.

Тем не менее стоит отметить, что в отчетах о клинических испытаниях описаны случаи развития аллергических реакций различной тяжести в местах введения вакцин в течение 1–2-х суток после вакцинации. Так, в исследовании вакцины BNT162b2 у порядка 6–7% испытуемых наблюдали отек и/или зуд после введения как первой, так и второй дозы вакцины [33]. Схожие по характеру и частоте возникновения побочные эффекты наблюдали и в исследовании мРНК-1273 при введении первой дозы вакцины. При этом после введения второй дозы мРНК-1273 доля испытуемых с аллергическими реакциями в местах вакцинации возросла более чем вдвое [6]. Позднее для мРНК-1273 были описаны случаи развития отложенных кожных аллергических реакций: K.G. Blumenthal и соавторы описали 12 случаев развития бляшкообразной сыпи разной степени выраженности спустя несколько суток после введения вакцины. В биоптатах кожи из очагов аллергической реакции были обнаружены периваскулярные и перифолликулярные лимфоцитарные инфильтраты с небольшими включениями эозинофилов и тучных клеток [9]. На данный момент официальные контролирующие органы стран, где проводится массовая иммунизация, пока советуют не торопиться с вакцинацией BNT162b2 и мРНК-1273 людям с тяжелыми формами аллергий в анамнезе или имеющим опыт аллергических реакций на какую-либо другую вакцинацию.

Интересные результаты были получены при исследовании вакцины BNT162b2 на группе людей, уже переболевших COVID-19: увеличение титра антител у таких пациентов наблюдалось только после введения первой дозы вакцины, а после второй дозы титр не менялся. При этом у

не переболевших ранее испытуемых титр антител нарастал как после первой, так и после второй вакцинации. Исследователи предлагают несколько возможных объяснений такому явлению: 1) после первой вакцинации выработалось достаточное количество антител, и защитные механизмы организма предотвращают слишком сильный иммунный ответ; 2) после инфекции у переболевших выработался иммунный ответ на некоторые фосфолипиды, который был реактивирован при введении первой дозы вакцины с ЛНЧ, вследствие чего при втором введении ЛНЧ были разрушены и мРНК не была доставлена в клетки. Последнюю гипотезу начали активно развивать в связи со сходством клинических картин тяжелого течения COVID-19 и системной красной волчанки [41]: у пациентов описывают случаи венозной тромбоэмболии и формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек (нетоза) при нормальной концентрации факторов свертывания. Возможным объяснением этого феномена может являться выработка антител к различным типам фосфолипидов (аФЛ-АТ). Подобные явления были ранее описаны для некоторых других вирусных инфекций, включая ВИЧ, гепатит С, вирус Эпштейна–Барр [44], а недавние исследования показали, что антитела к различным типам фосфолипидов образуются у более чем 50% госпитализированных пациентов с тяжелым течением COVID-19. В небольшом количестве аФЛ-АТ не приводят к развитию патогенных реакций, однако избыточное количество таких антител инициирует нетоз – антимикробный защитный механизм нейтрофилов, сопровождающийся повышением тромбообразования. Случаи нетоза были описаны у пациентов с тяжелым течением COVID-19 [4, 55]. Учитывая, что до конца прошлого года ни одна широко используемая вакцина не содержала ЛНЧ, возможное формирование неспецифического иммунного ответа на фосфолипиды, применяемые для «упаковки» РНК-вакцин, требует более тщательного исследования.

Эффективность вакцин BNT162b2 и мРНК-1273 против распространяющихся штаммов вируса SARS-CoV-2

Следующим важным вопросом является эффективность существующих РНК-вакцин против наиболее распространенных циркулирующих в мире штаммов вируса SARS-CoV-2. С декабря 2020 г. и по настоящее время в мире обнаружены три новых высокотрансмиссивных варианта вируса SARS-CoV-2: так называемые британский (B.1.1.7), африканский (B.1.351) и бразильский (P.1) штаммы [10, 53]. Все три варианта харак-

ТАБЛИЦА 3. НЕЗАРЕГИСТРИРОВАННЫЕ РНК-ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ SARS-CoV-2, ИСПЫТЫВАЕМЫЕ НА ЛЮДЯХ [49]

TABLE 3. mRNA VACCINES AGAINST COVID-19 STUDIED IN CLINICAL TRIALS [49]

Название Name	Фирма-разработчик Company	мРНК mRNA	Доставка Platform	Фаза клинических испытаний Phase of clinical trial
CVnCoV	CureVac	Немодифицированная мРНК, кодирующая S-белок mRNA of S protein	ЛНЧ Lipid nanoparticles	Фаза III Phase III
LUNAR-COV19	Arcturus/Duke-NUS	мРНК, кодирующая S-белок mRNA of S protein	ЛНЧ Lipid nanoparticles	Фаза II Phase II
LNP-nCoVsaRNA	Imperial College London	Самоамплифицирующаяся РНК, кодирующая S-белок Self-replicating mRNA of S protein	ЛНЧ Lipid nanoparticles	Фаза I Phase I
Нет No name yet	Walvax Biotech	Нет информации Data is not available	Нет информации Data is not available	Фаза I Phase I
Нет No name yet	Shulan (Hangzhou) Hospital + Center for Disease Control and Prevention of Guangxi Zhuang Autonomous Region	Нет информации Data is not available	Нет информации Data is not available	Фаза I Phase I
ChulaCov19	Chulalongkorn University	Нет информации Data is not available	Нет информации Data is not available	Фаза I Phase I
PTX-COVID19-B	Providence Therapeutics	Нет информации Data is not available	Нет информации Data is not available	Фаза I Phase I
CoV2 SAM	GlaxoSmithKline	Самоамплифицирующаяся РНК, кодирующая S-белок Self-replicating mRNA of S protein	ЛНЧ Lipid nanoparticles	Фаза I Phase I

теризуются различными мутациями и более высокой, чем у референсного штамма, вирулентностью. Причины появления мутаций и эффект этих изменений на тяжесть заболевания пока изучаются. В январе было показано, что широко используемая в мире РНК-вакцина BNT162b2 продолжает быть высокоэффективной против

нового штамма B.1.1.7. Однако дальнейшая проверка показала, что против штамма B.1.351 вакцина гораздо менее эффективна. При оценке нейтрализующей способности 15 образцов плазмы, полученных у вакцинированных BNT162b2 участников, против нескольких клонированных вариантов S-белка было установлено, что вакци-

на BNT162b2 более чем в 3 раза хуже нейтрализует S-белок «африканского» варианта вируса [38]. Схожие результаты были показаны и для вакцины мРНК-1273: плазму нескольких испытуемых, участвовавших в фазе I клинических испытаний и показавших высокий титр нейтрализующих антител, использовали для проверки эффективности вакцины против штаммов B.1.1.7 и B.1.351. Плазма продолжала эффективно нейтрализовать псевдовirus, содержащие S-белок с мутациями, характерными для «британского» штамма, но в среднем в 2,7 раза хуже нейтрализовала псевдовirus с мутациями, обнаруженными в рецептор-связывающем домене у «африканского» штамма [51]. Эффективность обеих вакцин против «бразильского» штамма P.1 пока неизвестна, но, учитывая, что мутации в рецептор-связывающих доменах «бразильского» и «африканского» штаммов схожи (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки), можно предположить, что низкий уровень эффективности вакцин можно ожидать и против «бразильского» штамма. Разработчики обеих вакцин уже приступили к исследованиям для создания эффективных против «африканского» штамма профилактических препаратов.

Помимо вышеописанных зарегистрированных, на 2 марта 2021 г. на различных стадиях клинических испытаний находятся еще 7 РНК-вакцин для профилактики коронавирусной инфекции, все они предполагают внутримышечное введение. Из них лишь одна вакцина исследуется в фазе III – это вакцина CVnCoV, разработанная немецкой биофармацевтической компанией CureVac (табл. 3) [49]. На сегодняшний день никаких данных об эффективности и безопасности данного препарата нет, но известно, что в качестве матрицы используется немодифицированная мРНК, кодирующая S-белок вируса SARS-CoV-2, вакцину можно будет хранить постоянно при температуре 5 °C и до 24 ч при комнатной температуре, а иммунный ответ, наблюдавшийся

у испытуемых в фазе I клинических испытаний, был сравним с иммунным ответом переболевших COVID-19 пациентов [12].

Выводы

Вакцины на основе РНК являются довольно молодой, но многообещающей медицинской технологией. Быстрая разработка, простота производства и высокая эффективность дают РНК-вакцинам большое преимущество по сравнению с цельновирионными и векторными препаратами для иммунизации. А возможность оперативно изменять и выводить на рынок для массовой иммунизации вакцины с учетом вновь появляющихся мутаций вирусных патогенов открывает перспективу для контроля распространенных сезонных вирусных инфекций, которые создают большую нагрузку на медицинские учреждения во многих странах в весенний и осенний периоды. Основная неопределенность на сегодняшний день связана с безопасностью РНК-вакцин: до начала пандемии ни для одной из РНК-вакцин не были проведены клинические испытания фазы III, а имеющиеся результаты проведенных по всему миру обширных клинических испытаний вакцин для профилактики COVID-19 пока не позволяют сделать вывод как о возможных отложенных эффектах вакцинирования, так и о безопасности вакцины для людей с аутоиммунными заболеваниями. Кроме того, описанные наблюдения о выработке аФЛ у больных с COVID-19 и их возможном влиянии на эффективность вакцинирования препаратом BNT162b2 указывают на то, что не все механизмы и побочные эффекты учтены при использовании РНК-вакцины. Однако, учитывая чрезвычайность ситуации, тяжесть заболевания COVID-19 и быстрое распространение инфекции, РНК-вакцины без сомнения стали спасением для многих стран, приступивших к немедленному вакцинированию населения.

Список литературы / References

1. Aldrich C., Leroux-Roels I., Huang K.B., Bica M.A., Loeliger E., Schoenborn-Kellenberger O., Walz L., Leroux-Roels G., von Sonnenburg F., Oostvogels L. Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers: A phase 1 trial. *Vaccine*, 2021, Vol. 39, no. 8, pp. 1310-1318.
2. Aliprantis A.O., Shaw C.A., Griffin P., Farinola N., Railkar R.A., Cao X., Liu W., Sachs J.R., Swenson C.J., Lee H., Cox K.S., Spellman D.S., Winstead C.J., Smolenov I., Lai E., Zaks T., Espeseth A.S., Panther L.A. phase 1, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and immunogenicity of an mRNA-based RSV prefusion F protein vaccine in healthy younger and older adults. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2020. doi: 10.1080/21645515.2020.1829899.
3. Amarante-Mendes G.P., Adjemian S., Branco L.M., Zanetti L.C., Weinlich R., Bortoluci K.R. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2379. doi: 10.3389/fimmu.2018.02379.

4. Amezcua-Guerra L.M., Rojas-Velasco G., Brianza-Padilla M., Vázquez-Rangel A., Márquez-Velasco R., Baranda-Tovar F., Springall R., Gonzalez-Pacheco H., Juárez-Vicuña Y., Tavera-Alonso C., Sanchez-Muñoz F., Hernández-Salas M. Presence of antiphospholipid antibodies in COVID-19: case series study. *Ann. Rheum. Dis.*, 2020. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-218100.
5. Andries O., Mc Cafferty S., de Smedt S.C., Weiss R., Sanders N.N., Kitada T. N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J. Control. Release*, 2015, Vol. 217, pp. 337-344.
6. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., Diemert D., Spector S.A., Roupheal N., Creech C.B., McGettigan J., Khetan S., Segall N., Solis J., Brosz A., Fierro C., Schwartz H., Neuzil K., Corey L., Gilbert P., Janes H., Follmann D., Marovich M., Mascola J., Polakowski L., Ledgerwood J., Graham B.S., Bennett H., Pajon R., Knightly C., Leav B., Deng W., Zhou H., Han S., Ivarsson M., Miller J., Zaks T., COVE Study Group. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2021, Vol. 384, no. 5, pp. 403-416.
7. Bahl K., Senn J.J., Yuzhakov O., Bulychiev A., Brito L.A., Hassett K.J., Laska M.E., Smith M., Almarsson Ö., Thompson J., Ribeiro A.M., Watson M., Zaks T., Ciaramella G. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses. *Mol. Ther.*, 2017, Vol. 25, no. 6, pp. 1316-1327.
8. Ball R.L., Bajaj P., Whitehead K.A. Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of pH, temperature, and lyophilization. *Int. J. Nanomed.*, 2017, Vol. 12, pp. 305-315.
9. Blumenthal K.G., Freeman E.E., Saff R.R., Robinson L.B., Wolfson A.R., Foreman R.K., Hashimoto D., Banerji A., Li L., Anvari S., Shenoy E.S. Delayed large local reactions to mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.*, 2021. doi: 10.1056/NEJMc2102131.
10. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Science Brief: Emerging SARS-CoV-2 variants. Updated January 28, 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-brief-emerging-variants.html>.
11. Cullis P.R., Hope M.J. Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies. *Mol. Ther.*, 2017, Vol. 25, no. 7, pp. 1467-1475.
12. CureVac's mRNA-based vaccine candidate against COVID-19. Available at: <https://www.curevac.com/en/covid-19>.
13. Duthie M.S., van Hoeven N., MacMillen Z., Picone A., Mohamath R., Erasmus J., Hsu F.-C., Stinchcomb D.T., Reed S.G. Heterologous immunization with defined rna and subunit vaccines enhances T Cell responses that protect against leishmania donovani. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2420. doi: 10.3389/fimmu.2018.02420.
14. Edwards D.K., Jasny E., Yoon H., Horscroft N., Schanen B., Geter T., Fotin-Mleczek M., Petsch B., Wittman V. Adjuvant effects of a sequence-engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response. *J. Transl. Med.*, 2017, Vol. 15, no. 1, 1. doi: 10.1186/s12967-016-1111-6.
15. Farzani A.T., Földes K., Ergünay K., Gurdal H., Bastug A., Ozkul A. Immunological analysis of a CCHFV mRNA vaccine candidate in mouse models. *Vaccines (Basel)*, 2019, Vol. 7, no. 3, 115. doi: 10.3390/vaccines7030115.
16. Gonçalves G.A.R., Paiva R.M.A. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein*, 2017, Vol. 15, no. 3, pp. 369-375.
17. Guardo A.C., Joe P.T., Miralles L., Bargalló M.E., Mothe B., Krasniqi A., Heirman C., García F., Thielemans K., Brander C., Aerts J.L., Plana M., iHIVARNA consortium. Preclinical evaluation of an mRNA HIV vaccine combining rationally selected antigenic sequences and adjuvant signals (HTI-TriMix). *AIDS*, 2017, Vol. 31, no. 3, pp. 321-332.
18. Halpert G., Shoenfeld Y. SARS-CoV-2, the autoimmune virus. *Autoimmun. Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 12, 102695. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102695.
19. John S., Yuzhakov O., Woods A., Deterling J., Hassett K., Shaw C.A., Ciaramella G. Multi-antigenic human cytomegalovirus mRNA vaccines that elicit potent humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine*, 2018, Vol. 36, no. 12, pp. 1689-1699.
20. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 5, pp. 373-384.
21. Kudla G., Lipinski L., Caffin F., Helwak A., Zylicz M. High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells. *PLoS Biol.*, 2006, Vol. 4, no. 6, e180. doi: 10.1371/journal.pbio.0040180.
22. Leal L., Guardo A.C., Morón-López S., Salgado M., Mothe B., Heirman C., Pannus P., Vanham G., van den Ham H.J., Gruters R., Andeweg A., van Meirvenne S., Pich J., Arnaiz J.A., Gatell J.M., Brander C., Thielemans K., Martínez-Picado J., Plana M., García F., iHIVARNA consortium. Phase I clinical trial of an intranodally administered mRNA-based therapeutic vaccine against HIV-1 infection. *AIDS*, 2018, Vol. 32, no. 17, pp. 2533-2545.
23. Liu M.A. A comparison of plasmid DNA and mRNA as vaccine technologies. *Vaccines (Basel)*, 2019, Vol. 7, no. 2, 37. doi: 10.3390/vaccines7020037.
24. Martinon F., Krishnan S., Lenzen G., Magné R., Gomard E., Guillet J.G., Lévy J.P., Meulien P. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo* by liposome-entrapped mRNA. *Eur. J. Immunol.*, 1993, Vol. 23, no. 7, pp. 1719-1722.
25. Meyer M., Huang E., Yuzhakov O., Ramanathan P., Ciaramella G., Bukreyev A. Modified mRNA-based vaccines elicit robust immune responses and protect guinea pigs from ebola virus disease. *J. Infect. Dis.*, 2018, Vol. 217, no. 3, pp. 451-455.

26. Moderna announces additional positive phase 1 data from Cytomegalovirus (CMV) vaccine (mRNA-1647) and first participant dosed in phase 2 study. Available at: <https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-announces-additional-positive-phase-1-data>.
27. Moderna Inc. Moderna COVID-19 Vaccine Update. January 25, 2021. Available at: <https://investors.modernatx.com/static-files/1f770088-5909-457b-af99-7ff2454ba28a>.
28. Pardi N., Hogan M.J., Pelc R.S., Muramatsu H., Andersen H., DeMaso C.R., Dowd K.A., Sutherland L.L., Scearce R.M., Parks R., Wagner W., Granados A., Greenhouse J., Walker M., Willis E., Yu J.-S., McGee C.E., Sempowski G.D., Mui B.L., Tam Y.K., Huang Y.-J., Vanlandingham D., Holmes V.M., Balachandran H., Sahu S., Lifton M., Higgs S., Hensley S.E., Madden T.D., Hope M.J., Karikó K., Santra S., Graham B.S., Lewis M.G., Pierson T.C., Haynes B.F., Weissman D. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, 2017, Vol. 543, no. 7644, pp. 248-251.
29. Pardi N., Hogan M.J., Porter F.W., Weissman D. mRNA vaccines – a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov*, 2018, Vol. 17, no. 4, pp. 261-279.
30. Pardi N., LaBranche C.C., Ferrari G., Cain D.W., Tombácz I., Parks R.J., Muramatsu H., Mui B.L., Tam Y.K., Karikó K., Polacino P., Barbosa C.J., Madden T.D., Hope M.J., Haynes B.F., Montefiori D.C., Hu S.-L., Weissman D. Characterization of HIV-1 nucleoside-modified mRNA vaccines in rabbits and rhesus macaques. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2019, Vol. 15, pp. 36-47.
31. Pardi N., Parkhouse K., Kirkpatrick E., McMahon M., Zost S.J., Mui B.L., Tam Y.K., Karikó K., Barbosa C.J., Madden T.D., Hope M.J., Krammer F., Hensley S.E., Weissman D. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies. *Nat. Commun*, 2018, Vol. 9, no. 1, 3361. doi: 10.1038/s41467-018-05482-0.
32. Park K.S., Sun X., Aikins M.E., Moon J.J. Non-viral COVID-19 vaccine delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2021, Vol. 169, pp. 137-151.
33. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Perez J.L., Pérez Marc G., Moreira E.D., Zerbini C., Bailey R., Swanson K.A., Roychoudhury S., Koury K., Li P., Kalina W.V., Cooper D., Frenck R.W. Jr, Hammitt L.L., Türeci Ö., Nell H., Schaefer A., Ünal S., Tresnan D.B., Mather S., Dormitzer P.R., Şahin U., Jansen K.U., Gruber W.C., C4591001 Clinical Trial Group. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 383, no. 27, pp. 2603-2615.
34. Roers A., Hiller B., Hornung V. Recognition of endogenous nucleic acids by the innate immune system. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 4, pp. 739-754.
35. Roth C., Cantaert T., Colas C., Prot M., Casadémont I., Levillayer L., Thalmensi J., Langlade-Demoyen P., Gerke C., Bahl K., Ciaramella G., Simon-Lorière E., Sakuntabhai A. A modified mRNA Vaccine Targeting Immunodominant NS Eitopes Protects Against Dengue Virus Infection in HLA Class I Transgenic Mice. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1424. doi: 10.3389/fimmu.2019.01424.
36. Samsa M.M., Dupuy L.C., Beard C.W., Six C.M., Schmaljohn C.S., Mason P.W., Geall A.J., Ulmer J.B., Yu D. Self-Amplifying RNA Vaccines for Venezuelan Equine Encephalitis Virus Induce Robust Protective Immunogenicity in Mice. *Mol. Ther.*, 2019, Vol. 27, no. 4, pp. 850-865.
37. Sandbrink J.B., Shattock R.J. RNA Vaccines: A Suitable Platform for Tackling Emerging Pandemics? *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 608460. doi: 10.3389/fimmu.2020.608460
38. Tada T., Dcosta B.M., Samanovic-Golden M., Herati R.S., Cornelius A., Mulligan M.J., Landau N.R. Neutralization of viruses with European, South African, and United States SARS-CoV-2 variant spike proteins by convalescent sera and BNT162b2 mRNA vaccine-elicited antibodies. *bioRxiv*, 2021. doi: 10.1101/2021.02.05.430003
39. Tan X., Sun L., Chen J., Chen Z.J. Detection of Microbial Infections Through Innate Immune Sensing of Nucleic Acids. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2018, Vol. 72, pp. 447-478.
40. Torrecilla J., Rodríguez-Gascón A., Solinís M.Á., del Pozo-Rodríguez A. Lipid nanoparticles as carriers for RNAi against viral infections: current status and future perspectives. *Biomed Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 161794. doi: 10.1155/2014/161794
41. Tung M.L., Tan B., Cherian R., Chandra B. Anti-phospholipid syndrome and COVID-19 thrombosis: connecting the dots. *Rheumatol. Adv. Pract.*, 2021, Vol. 5, no. 1, rkaa081. doi: 10.1093/rap/rkaa081.
42. U.S. Food and Drug Administration. Moderna COVID-19 vaccine. Briefing document. Vaccines and related biological products advisory committee meeting, December 17, 2020. Available at: <https://www.fda.gov/media/144434/download>.
43. U.S. Food and Drug Administration. Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine. Briefing document. Vaccines and related biological products advisory committee meeting, December 10, 2020. Available at: <https://www.fda.gov/media/144245/download>.
44. Uthman I.W., Gharavi A.E. Viral infections and antiphospholipid antibodies. *Semin. Arthritis Rheum*, 2002, Vol. 31, no. 4, pp. 256-263.
45. Verma I.M., Somia N. Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature*, 1997, Vol. 389, no. 6648, pp. 239-242.
46. Vogel A.B., Lambert L., Kinnear E., Busse D., Erbar S., Reuter K.C., Wicke L., Perkovic M., Beissert T., Haas H., Reece S.T., Sahin U., Tregoning J.S. Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Mol. Ther.*, 2018, Vol. 26, no. 2, pp. 446-455.

47. Walters A.A., Kinnear E., Shattock R.J., McDonald J.U., Caproni L.J., Porter N., Tregoning J.S. Comparative analysis of enzymatically produced novel linear DNA constructs with plasmids for use as DNA vaccines. *Gene Ther.*, 2014, Vol. 21, no. 7, pp. 645-652.
48. Wollner C.J., Richner M., Hassert M.A., Pinto A.K., Brien J.D., Richner J.M. A mRNA-LNP vaccine against Dengue Virus elicits robust, serotype-specific immunity. *bioRxiv*, 2021. doi.org/10.1101/2021.01.05.425517.
49. World Health Organization (WHO). Draft landscape and tracker of COVID-19 candidate vaccines. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>.
50. World Health Organization (WHO). Status of COVID-19 Vaccines within WHO EUL/PQ evaluation process. Guidance Document. Geneva, Switzerland, March 01, 2021. Available at: https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/Status_COVID_VAX_01March2021.pdf.
51. Wu K., Werner A.P., Koch M., Choi A., Narayanan E., Stewart-Jones G.B.E., Colpitts T., Bennett H., Boyoglu-Barnum S., Shi W., Moliva J.I., Sullivan N.J., Graham B.S., Carfi A., Corbett K.S., Seder R.A., Edwards D.K. Serum Neutralizing Activity Elicited by mRNA-1273 Vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2021. doi: 10.1056/NEJMc2102179.
52. Zhang M., Sun J., Li M., Jin X. Modified mRNA-LNP vaccines confer protection against experimental DENV-2 Infection in Mice. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2020, Vol. 18, pp. 702-712.
53. Zhou D., Dejnirattisai W., Supasa P., Liu C., Mentzer A.J., Ginn H.M., Zhao Y., Duyvesteyn H.M.E., Tuekprakhon A., Nutalai R., Wang B., Paesen G.C., Lopez-Camacho C., Slon-Campos J., Hallis B., Coombes N., Bewley K., Charlton S., Walter T.S., Skelly D., Lumley S.F., Dold C., Levin R., Dong T., Pollard A.J., Knight J.C., Crook D., Lambe T., Clutterbuck E., Bibi S., Flaxman A., Bittaye M., Belij-Rammerstorfer S., Gilbert S., James W., Carroll M.W., Klenerman P., Barnes E., Dunachie S.J., Fry E.E., Mongkolsapaya J., Ren J., Stuart D.I., Screaton G.R. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell*, 2021. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.037.
54. Zhuang X., Qi Y., Wang M., Yu N., Nan F., Zhang H., Tian M., Li C., Lu H., Jin N. mRNA Vaccines encoding the HA protein of influenza A H1N1 virus delivered by cationic lipid nanoparticles induce protective immune responses in mice. *Vaccines (Basel)*, 2020, Vol. 8, no. 1, 123. doi: 10.3390/vaccines8010123.
55. Zuo Y., Estes S.K., Ali R.A., Gandhi A.A., Yalavarthi S., Shi H., Sule G., Gockman K., Madison J.A., Zuo M., Yadav V., Wang J., Woodard W., Lezak S.P., Lugogo N.L., Smith S.A., Morrissey J.H., Kanthi Y., Knight J.S. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci. Transl. Med.*, 2020, Vol. 12, no. 570, eabd3876. doi: 10.1126/scitranslmed.abd3876.

Авторы:

Благов А.В. — аналитик отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, Россия

Букаева А.А. — аналитик отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, Россия

Макаров В.В. — начальник отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, Россия

Бочкаева З.В. — аналитик отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, Россия

Authors:

Blagov A.V., Analyst, Department of Analysis and Prognosis of Biomedical Health Risks, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Bukaeva A.A., Analyst, Department of Analysis and Prognosis of Biomedical Health Risks, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Makarov V.V., Head, Department of Analysis and Prognosis of Biomedical Health Risks, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Bochkaeva Z.V., Analyst, Department of Analysis and Prognosis of Biomedical Health Risks, Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Поступила 30.03.2021

Отправлена на доработку 26.04.2021

Принята к печати 28.04.2021

Received 30.03.2021

Revision received 26.04.2021

Accepted 28.04.2021

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ЕГО АКТИВНОГО ЦЕНТРА

Зурочка А.В.^{1,2}, Зурочка В.А.^{1,2}, Добрынина М.А.¹, Гриценко В.А.³

¹ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

² ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский
университет), г. Челябинск, Россия

³ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук
ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии
наук» г. Оренбург, Россия

Резюме. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ; англ. GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) относится к группе ростовых цитокинов (гемопоэтинов), регулирующих пролиферацию и дифференциацию клеток миелоидного диферона. В последнее время накопилось много новых данных, указывающих на наличие у ГМ-КСФ и синтетических пептидов его активного центра ряда неизвестных ранее биологических эффектов, что открывает новые перспективы для их широкого клинического использования.

В обзоре изложены современные представления о структуре, функциях и механизмах действия ГМ-КСФ и рассмотрена структура его рецептора. Охарактеризованы клетки-продуценты ГМ-КСФ и представлены клетки-мишени (эффекторные клетки), отвечающие на воздействие этого цитокина. Описаны известные внутриклеточные механизмы передачи сигнала при взаимодействии ГМ-КСФ с рецептором. Охарактеризованы основные плеiotропные эффекты данного цитокина как фактора гемопоэза и иммуностимулирующего средства. Отражены известные и недавно обнаруженные иммунобиологические эффекты данного цитокина, его рекомбинантных форм и синтетических аналогов его активного центра.

Охарактеризовано участие ГМ-КСФ в гемопоэзе и дифференцировке миелоидных клеток, влияние данного цитокина на функциональную активность иммунокомпетентных (лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки) и тканевых клеток. Изучено влияние ГМ-КСФ на развитие и течение инфекционно-воспалительных процессов, роль его в создании комбинированных вакцин. Представлены материалы по клиническому использованию ГМ-КСФ и его рекомбинантных форм в гематологии, иммунологии, онкологии, репродуктологии и при лечении системных аутоиммунных процессов и заболеваний инфекционной природы.

Адрес для переписки:

Добрынина Мария Александровна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (982) 340-40-00.
E-mail: mzurochka@mail.ru

Address for correspondence:

Dobrynina Maria A.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian
Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (982) 340-40-00.
E-mail: mzurochka@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина,
В.А. Гриценко «Иммунобиологические
свойства гранулоцитарно-макрофагального
колониестимулирующего фактора и синтетических
пептидов его активного центра» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1031-1054.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2216
© Зурочка А.В. и соавт., 2021

For citation:

A.V. Zurochka, V.A. Zurochka, M.A. Dobrynina,
V.A. Gritsenko "Immunobiological properties of granulocyte-
macrophage colony-stimulating factor and synthetic peptides
of his active center", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5,
pp. 1031-1054.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2216
DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2216

Авторами обобщены недавно обнаруженные иммунобиологические свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, свидетельствующие о наличии у них иммуотропных и гемopoэтических эффектов, а также антимикробной активности в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, вирусов и репарационного потенциала (влияние на скорость заживления раневого процесса), не характерных для цельной молекулы ГМ-КСФ. Проанализированы перспективы клинического применения синтетического аналога ГМ-КСФ (пептид ZP2) и возможности создания на его основе новых косметических средств и лекарственных препаратов, обладающих комбинированными иммуностимулирующими, антимикробными и репарационными свойствами.

Обзор расширяет взгляд на возможности цитокинотерапии при лечении различных заболеваний человека инфекционной и неинфекционной природы и ориентирован на широкий круг специалистов, работающих в области аллергологии и иммунологии, инфектологии и репарационной медицины.

Ключевые слова: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, синтетический пептид активного центра, рецептор ГМ-КСФ, иммунобиологические эффекты, терапия

IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR AND SYNTHETIC PEPTIDES OF HIS ACTIVE CENTER

Zurochka A.V.^{a, b}, Zurochka V.A.^{a, b}, Dobrynina M.A.^a, Gritsenko V.A.^c

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

^b South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

^c Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Abstract. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) belongs to the group of growth cytokines (hematopoietins) that regulate proliferation and differentiation of myeloid lineage cells. Recently, a lot of new data have accumulated, indicating the presence of a number of previously unknown biological effects in GM-CSF and synthetic peptides of its active center, which open up new prospects for their wide clinical use.

The review outlines current understanding of the structure, functions, and mechanisms of GM-CSF action and concerns the structure of its receptor. The GM-CSF producer cells are characterized, as well as target cells (effector cells) responding to this cytokine are also presented. The known mechanisms of intracellular signaling involved into the GM-CSF/receptor interaction are described. The main pleiotropic effects of this cytokine as a factor of hematopoiesis and an immunostimulating agent are characterized. The previously known and recently found immunobiological effects of this cytokine, its recombinant forms and synthetic analogues of its active center are discussed.

Participation of GM-CSF in hematopoiesis and differentiation of myeloid cells, the effects of this cytokine on the functional activity of immunocompetent populations (lymphocytes, macrophages, neutrophils, dendritic cells) and tissue cells were characterized. The influence of GM-CSF on the development and course of infectious and inflammatory processes, its role in the creation of combined vaccines is reviewed. Clinical data on usage of GM-CSF and its recombinant forms in hematology, immunology, oncology, reproductive medicine and in the treatment of systemic autoimmune processes and infectious diseases are presented.

The recently discovered immunobiological properties of synthetic peptides derived from active center of GM-CSF are summarized, indicating that they exhibit immunotropic and hematopoietic effects, as well as antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, viruses, and tissue repair (effect on the rate of wound healing), which is not typical to the whole GM-CSF molecule. We discuss the prospects for clinical applications of synthetic GM-CSF analogue (ZP2 peptide), and an opportunity of creating new cosmetics and pharmaceuticals with combined immunostimulating, antimicrobial and reparative properties on its basis.

The review expands the view on potential usage of cytokine therapy in the treatment of various infectious and non-infectious diseases in humans, and is addressing a wide range of specialists working in the field of allergology and immunology, infectology and regenerative medicine.

Keywords: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, synthetic peptide of the active center, GM-CSF-receptor, immunobiological effects, therapy

Работа выполнена по теме Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, и теме Плана НИР ОФИЦ УрО РАН (ИКВС УрО РАН), № гос. регистрации 116021510075.

В организме человека функционирует система цитокинов, состоящая из большого количества разнообразных регуляторных (информационных) молекул, которые условно можно объединить в несколько групп медиаторов: интерлейкины (IL), хемокины, интерфероны (IFN), семейство факторов некроза опухоли и факторы роста (гемопоэтических и негемопоэтических клеток). К группе ростовых цитокинов (гемопоэтинов), регулирующих пролиферацию и дифференциацию клеток миелоидного диферона, принадлежит достаточно давно открытый и относительно хорошо изученный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ; англ. GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) [21, 22, 47, 59, 163]. Вместе с тем в последнее время накопилось много новых данных, указывающих на наличие у ГМ-КСФ и синтетических пептидов его активного центра ряда неизвестных ранее биологических эффектов, что отрывает новые перспективы для их широкого клинического использования.

В настоящем обзоре охарактеризованы известные и недавно обнаруженные иммунобиологические свойства ГМ-КСФ, его рекомбинантных форм и синтетических аналогов активного центра этого цитокина, а также рассмотрены возможные области и примеры их терапевтического применения.

Общая характеристика ГМ-КСФ

ГМ-КСФ относится к семейству цитокинов – колониестимулирующих факторов (КСФ), выделенных и описанных в начале 70-х годов XX века. К этой же группе сигнальных молекул, помимо ГМ-КСФ, относятся гранулоцитарный и макрофагальный колониестимулирующие факторы (Г-КСФ/G-CSF и М-КСФ/M-CSF соответственно), сходные, но функционально не тождественные между собой цитокины [21, 22, 59, 119, 163].

ГМ-КСФ сначала был получен из культур клеток мышей, а потом выделен от человека и крыс,

причем по аминокислотному составу мышинный и человеческий фактор имеют достаточно выраженные отличия. Структура ГМ-КСФ человека была расшифрована в 1985 г., а строение ГМ-КСФ крыс охарактеризовано в 1994 г. [65, 100, 163].

Мономерная форма человеческого ГМ-КСФ с молекулярным весом 22 кДа состоит из последовательности 127 аминокислот с двумя сайтами гликозилирования (в зависимости от чего его молекулярная масса может варьировать в диапазоне 14-35 кДа). У человека синтез ГМ-КСФ кодируется геном, расположенным на 5-й хромосоме в группе связанных генов локуса q23-q31, детерминирующих экспрессию интерлейкинов 3, 4, 5 (эозинофильный колониестимулирующий фактор), 11, 13 и ряд других цитокинов (фактор стволовой клетки – SCF, лейкемия запрещающий фактор, эритропоэтин – ЕРО и тромбопоэтин – ТРО), большинство из которых также обладают гемопоэтической активностью. Частичные делеции этого участка хромосомы связаны с 5q-синдромом и приводят к развитию острой миелоидной лейкемии (AML), хотя AML не всегда воспроизводится удалением 5q31 [34, 143]. В то же время дефекты генов G-CSF, M-CSF, ЕРО и ТРО сопровождаются выраженным сокращением суммы клеток, которые обычно стимулируются каждым из этих цитокинов, тогда как удаление гена GM-CSF только уменьшает функции нейтрофилов без значительного воздействия на общее количество клеток [31, 34, 68, 143].

ГМ-КСФ продуцируют различные клетки макроорганизма, в том числе нейтрофилы, макрофаги, эозинофилы, мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, фибро- и остеобласты, тучные и дендритные клетки, эндотелиальные клетки и кератиноциты, клетки Панета, хелперные Т-лимфоциты (Th1 и Th17), особая популяция В-лимфоцитов (IRA-В-активаторные В-клетки врожденного иммунитета), а также клетки некоторых типов опухолей. Экспрессия данного фактора усиливается под действием медиаторов воспаления (интерлейкины 1, 4, 6 и фактор некроза опухолей-альфа – TNF α), но может быть ингибирована рядом цитокинов (интерлейкины 4 и 10, интерферон-гамма) [3, 21, 22, 31, 34, 114]. В то же время D.K. Blanchard et al. [28] в опытах *in vitro* показали, что ГМ-КСФ вырабатывается моноцитами и большими зернисты-

ми (гранулярными) лимфоцитами с маркерами CD2⁺, CD16⁺ и HLA-DR⁺, причем его экспрессия наступает в течение 24 часов после стимуляции клеток-предшественников, а в культуральной жидкости данный цитокин регистрируется со 2-го по 7-й день.

С другой стороны, многие клетки макроорганизма несут на своей поверхности рецепторы к ГМ-КСФ (GM-CSFR), через взаимодействие с которыми реализуются регуляторная функция и биологические эффекты данного фактора.

Столь широкий пул клеток, синтезирующих ГМ-КСФ, а также наличие на многих типах клеток макроорганизма рецепторов к данному цитокину косвенно указывают на поливалентную активность данного гемопоэтина. При этом основными клетками-мишенями для ГМ-КСФ являются мультипотентные клетки-предшественники миелоидного ряда, а также гранулоциты, эозинофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, NKT- и NK-клетки (натуральные киллеры), в отношении которых указанный фактор выступает в качестве активатора их пролиферации и дифференцировки. Кроме того, к стимуляции ГМ-КСФ восприимчивы лимфоциты и эндотелиальные клетки, несущие на своих мембранах GM-CSFR. Следует отметить, что значительная часть биологических эффектов ГМ-КСФ носит локальный характер и связана, в частности, с дифференцировкой гранулоцитов, быстрым увеличением макрофагов в микроглии, трансформацией моноцитов в тканевые макрофаги (альвеолярные макрофаги, клетки Купфера в печени и др.), активацией дендритных клеток (DC), терминальным созреванием Т-лимфоцитов (прежде всего Th1) и др. [3, 44, 60, 63, 69, 118, 164, 171].

Таким образом, ГМ-КСФ фактически совмещает в себе два функциональных вектора, один из которых направлен на пролиферацию эффекторных клеток-мишеней, другой — на их дифференцировку. При этом в передаче сигнальной информации ключевую роль играет рецептор ГМ-КСФ (GM-CSFR), который экспрессируется большим количеством разнообразных, в том числе иммунокомпетентных, клеток.

Рецептор ГМ-КСФ и его взаимодействие с цитокином

GM-CSFR — гетеродимер, сформированный из 2 субъединиц: α (GM-CSFR α или CD116 с м.м. 60-80 кДа) и β (GM-CSFR β с или CD131 с м.м. 120-140 кДа), существующих в нескольких изоформах и имеющих отношение к комплексу рецепторов IL-3 и IL-5 [46, 67]. В ряде работ обсуждается значение не основных, а «дополнительных» изоформ обоих субъединиц рецепто-

ра, полученных на альтернативных mRNA, но их функции пока неизвестны [46, 102, 130].

Обе субъединицы GM-CSFR — трансмембранные гликопротеины типа I — структурно характеризуются присутствием модулей соответствия рецептора цитокину и включают два домена фибронектина типа III (у рецептора к Г-КСФ таких участков 3). GM-CSFR α связывается со своим лигандом с низкой аффинностью (KD = 0,2-100 нмоль), но при выраженной близости с субъединицей GM-CSFR β с степень его связывания с цитокином значительно увеличивается — до KD = 100 нмоль [71, 72]. Для GM-CSFR α описаны восемь конформационных вариантов, но только два изомера биологически важны для его трансдукционного эффекта — α 1- и α 2-изоформы, которые содержат трансмембранные и цитоплазматические области, богатые серином и пролином. Важность GM-CSFR α доказана фактом, что полное удаление его цитоплазматической области приводит к торможению роста и дифференцировки клеток. GM-CSFR β с — конститутивная субъединица рецептора, представленная на поверхности многих групп клеток [110].

Так же как рецепторы интерлейкинов 3 и 5 (IL-3R и IL-5R), GM-CSFR экспрессируется на поверхности гемопоэтических клеток в относительно небольшом количестве — 100-1000 молекул на клетку [72]. GM-CSFR обнаруживается на клетках-предшественниках миелоидного ряда и на таких зрелых клетках, как нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки, мегакариоциты, Т-лимфоциты, клетки сосудистого эндотелия, эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта и др. Сигналы ГМ-КСФ транслируются через передатчик сигнала и активатор транскрипции STAT5 (из семейства транскрипционных факторов — Signal Transducers and Activators of Transcription — STAT, состоящего из семи разных белков) при помощи Янус-киназы 2 (JAK2), входящей в состав немногочисленного семейства ферментов JANUS-киназ (JAK), представленного всего 4 белками — нерецепторными тирозинкиназами [25, 60, 111, 136].

При этом ГМ-КСФ в состоянии связать GM-CSFR β с даже в отсутствие GM-CSFR α , но для внутриклеточной трансдукции сигнала требуется гетеродимеризация с обеими субъединицами рецептора. Активация GM-CSFR следует общим правилам работы цитокиновых рецепторов, а именно — в результате активации происходит димеризация и трансфосфорилирование остатков тирозина в цитоплазматическом отделе рецептора. У GM-CSFR нет внутренней активности тирозинкиназы, поэтому для трансфосфорилирования GM-CSFR β с требуется ассоциация

двух β -цепей рецептора с JAK2 вблизи цитоплазматической зоны [39, 144]. Кристаллографические исследования показали, что GM-CSFR β фактически гомодимер, но его цитоплазматические области вполне отделены (120 Å), что делает трансфосфорилирование достаточно проблематичной реакцией [39, 72, 111].

Недавно описана уникальная третичная структура комплекса GM-CSF/GM-CSFR, соответствующая скоординированной додекаэдрной структуре, которая необходима для активации рецептора. Ассоциация между GM-CSF и GM-CSFR включает три места взаимодействия. Первый локус — взаимодействие между GM-CSF и GM-CSFR α , второй — между GM-CSF и областями двух различных молекул GM-CSFR β , и третий — стабилизирующее место, сформированное между GM-CSFR α и дуэтом GM-GM-CSFR β . Эти комбинации способствуют образованию более высокого додекаэдр-комплекса, составленного двумя гексамерными структурами, связанными четвертым местом взаимодействия. Антитела и мутации, направленные к последнему локусу, значительно уменьшают трансдукцию сигнала GM-CSF, вызывая потерю додекаэдрного комплекса. Эти взаимодействия, которые наблюдаются только у GM-CSFR, объясняют особенности трансфосфорилирования в системе GM-CSF/GM-CSFR, где JAK2, связанная с бета-цепью рецептора, перемещает сложную додекаэдрную структуру из двух GM-GM-CSFR β на более близкое расстояние 10Å, обеспечивающее трансфосфорилирование и активацию последующих сигнальных путей [71, 104].

Таким образом, трансдукция ГМ-КСФ подобна активации рецепторов интерферонами и рядом других цитокинов. Связывание ГМ-КСФ с его рецептором(ами) приводит, с одной стороны, к индукции активаторов транскрипции STAT5, которые мигрируют к ядру и связывают определенные элементы ДНК, направляя транскрипцию конкретных генов, ответственных за клеточную пролиферацию и дифференцировку, а с другой стороны — к активации группы антиапоптотических белков семейства Bcl-2 с четырьмя ВН-доменами (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 и др.), блокирующих действие проапоптотических белков этого же семейства (Bax, Bak) и, тем самым, предотвращающих индукцию апоптоза клеток по митохондриальному пути. Кроме того, в этот процесс могут вовлекаться и другие регуляторные молекулы, имеющие отношение к контролю за апоптозом, в частности протеинкиназа С и ядерный фактор транскрипции NF- κ B (nuclear factor kappa B) [42, 110].

Указанные молекулярные механизмы лежат в основе многих биологических эффектов ГМ-КСФ, прежде всего связанных с влиянием данного цитокина и его рекомбинантных аналогов на клетки иммунной системы.

ГМ-КСФ и клетки иммунной системы

Анализируя роль ГМ-КСФ в иммунной системе макроорганизма, следует отметить, что главной физиологической функцией этого цитокина является регуляция пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников миелоидного ряда, а также их созревания [82, 101]. Его важное значение для гемопоэза подтверждается блокадой развития гемопоэтических клеток-предшественников (*in vitro*) антителами к белку ГМ-КСФ [3]. Стволовые гемопоэтические клетки, реагируя на ГМ-КСФ, запускают размножение и дифференцировку гранулоцитов/макрофагов [41, 52].

Будучи включенным в систему цитокиновой регуляции иммунной системы, ГМ-КСФ взаимодействует с нейтрофилами, стимулируя у них выработку молекул адгезии и IgGFcR, активируя дополнительные рецепторы на клетках и модулируя их ответ на хемотаксические факторы и фагоцитоз, увеличивая синтез лейкотриена B₄, арахидоновой кислоты и выброс супероксид аниона, а также пролонгируя срок жизни фагоцитов и, что интересно, усиливая у них экспрессию молекул МНС-II, участвующих в ответе Т-лимфоцитов на суперантигены [57, 120]. Экспериментально установлено, что в активацию нейтрофилов (и макрофагов) посредством воздействия на них GM-CSF (и TNF α) вовлекались NaDPH-оксидазы (в частности NOX2) и регуляторный белок p47phox, а максимум эффекта регистрировался через 20 минут [50].

ГМ-КСФ увеличивает функциональную активность (окислительный метаболизм, цитотоксичность, антитело-зависимый фагоцитоз и др.) нейтрофилов, моноцитов и макрофагов [24, 60]. Под действием данного цитокина в этих клетках увеличивается синтез NF- κ B и экспрессия Толл-подобных рецепторов (TLR): TLR2 и TLR4 в нейтрофилах и TLR2 в моноцитах. Кроме того, GM-CSF вызывает продукцию IL-12 и TNF α и увеличивает секрецию моноцитами хемотаксических белков MCP-1 (macrophage chemotactic protein-1), являющихся мощными хемоаттрактантами для нейтрофилов и моноцитов [124, 156].

ГМ-КСФ — один из самых мощных хемотаксических и хемокинетических агентов для человеческих нейтрофилов. Вызванный им хемотаксис не сильно зависит от времени экспозиции и специфически нейтрализуется антителами к нему или его рецептору. Средняя действующая

концентрация цитокина (EC_{50}) составляет 0,9 пикомолей; максимальный эффект вызывает доза 7 пикомолей. ГМ-КСФ быстро вызывает полимеризацию F-актина и образование местных контактных колец в нейтрофилах, предшествующих клеточной миграции — хемотаксису. Рядом авторов показано, что ГМ-КСФ, как Г-КСФ и TNF, может активировать нейтрофилы, вызывая деполимеризацию актина через активацию внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (ERK) и/или p38 MAPK — митоген-активируемой протеинкиназы [50, 97]. Хемотаксис, индуцируемый ГМ-КСФ, реализуется также через сигнальные интермедиаторные молекулы, в частности — серин/треонин рибосомальную p70 S6-киназу и ее активность [63].

ГМ-КСФ играет важную роль в созревании и активации миелоидных и плазматоидных дендритных клеток (DC — Dendritic Cells), хотя для последних, по-видимому, более значимым регулятором является IL-3 [160]. Совместно с $IFN\alpha$ ГМ-КСФ вызывает генерацию дендритных клеток из моноцитов периферической крови [38]. Известно, макрофаги могут трансформироваться в DC при сочетанном действии на них GM-CSF и IL-4. При этом ГМ-КСФ участвует на всех стадиях развития дендритных клеток, которые под действием этого цитокина приобретают выраженную способность к антиген-презентации [115]. Недавно описано, что в специфическом сигналинге ГМ-КСФ у моноцитов и стимуляции образования/созревания DC принимают участие тирозин киназы семейства генов Src и SRC-подобный белок-адаптер SLAP1 (Src-Like-Adapter Protein 1) [105]. Другими авторами показано, что гемопоэтические факторы (ГМ-КСФ и IL-3) в фактор-зависимых лейкоэмических клетках действуют через IRES (internal ribosome entry site) опосредованную трансляцию С-Мус через фосфатидилинозитол-3-киназу [93].

Фактически ГМ-КСФ можно рассматривать в качестве важного регулятора миелоидных дендритных клеток, активация которых ассоциирована с выраженной дифференцировкой Т-лимфоцитов типа Th1. Человеческие моноциты, их предшественники, макрофаги и DC относятся к клеткам, которые в процессе созревания при воздействии ГМ-КСФ увеличивают экспрессию маркеров антигенного представления МНС (major histocompatibility complex) I и II классов, а также костимулирующих молекул CD80, CD86 и CD40, тем самым усиливая иммунную реакцию, в том числе против бактериальных антигенов [82, 112]. Кроме того, вследствие активации ГМ-КСФ пролиферации и дифференцировки дендритных клеток, а также стимуляции NK-клеток и усиления

их цитотоксичности, данный цитокин участвует в реализации протективного противоопухолевого иммунитета [3, 140].

ГМ-КСФ через транскрипционную систему STAT5/JAK2 (описана выше) стимулирует выработку интерферонового регуляторного фактора 5 (IRF5), активирующего макрофаги и участвующего совместно с NF- κ B в регуляции (индукция/торможение) синтеза ряда цитокинов, в частности $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ и IL-10 [96]. Кроме того, в макрофагах, костномозгового происхождения, ГМ-КСФ вызывает экспрессию моноцит-хемоаттрактанта-протеина (MCP) 1; матрикс-металлопротеиназы (MMP-12) и аргиназы-1, которые, как известно, участвуют в регуляции ангиогенеза [87].

Альвеолярные/бронхиальные макрофаги и альвеолоциты/пневмоциты, несущие на своей поверхности рецепторы к ГМ-КСФ, также подвержены регуляторному воздействию данного цитокина, который активирует структурные и функциональные процессы репарации паренхимы легких, например, при пневмонии и других повреждениях легочной ткани [77]. Различные факторы могут стимулировать выброс альвеолярными макрофагами цитокина $TNF\alpha$, который активирует продукцию ГМ-КСФ эпителиальными клетками легких, в результате чего начинается ускоренное увеличение числа альвеолярных клеток и трансдифференцировка пневмоцитов II типа (имеющих значительное количество рецепторов GM-CSFR α и GM-CSFR β c) в пневмоциты типа I (респираторные), что обеспечивает быструю реставрацию альвеолярного барьера и восстановление газообменной функции легких [36, 77].

Трудно переоценить значение ГМ-КСФ в развитии воспалительного процесса, поскольку данный ростовой фактор способствует активации и пролонгированному выживанию моноцитов, макрофагов и нейтрофилов, увеличивает пул провоспалительных цитокинов, выделяемых этими клетками, и содействует фагоцитозу и освобождению/клиренсу поврежденных тканей от инфекционных агентов [70, 155]. Макрофаги более эффективно стимулируются вторичными стимулами, такими как липополисахарид (LPS), некоторыми интерлейкинами и $IFN\gamma$, когда они преактивированы ГМ-КСФ. В опытах *in vivo* показано, что внутрибрюшинное введение ГМ-КСФ вызывает сильную миграцию человеческих макрофагов, а человеческие и крысиные моноциты показывают более высокий провоспалительный ответ, когда они предварительно активируются этим цитокином, а затем повторно стимулируются LPS [74, 142].

Кроме того, провоспалительная роль ГМ-КСФ, в том числе при развитии антимикробного иммунного ответа, опосредуется через стимуляцию экспрессии трансактиваторов и ключевых молекул класса II главного комплекса гистосовместимости (ГКГС), увеличение маркеров зрелых клеток — CD86 и CD40, а его протективная роль при микробной агрессии в значительной степени связана с усилением бактерицидности полиморфноядерных нейтрофилов и макрофагов [3, 82, 97, 101].

Безусловно, в иерархии цитокинов ГМ-КСФ следует рассматривать, прежде всего, как фактор роста и дифференцировки клеток гемопоэза, с чем связано его широкое клиническое использование.

ГМ-КСФ и его рекомбинантные аналоги как факторы гемопоэза

В терапевтической практике используются, как правило, не нативные молекулы ГМ-КСФ, а рекомбинантные аналоги цитокина (rhGM-CSF) [102], входящие в состав ряда лекарственных препаратов: sargramostim или Leukine® (препарат фирмы Bayer Health Care, США), molgramostim или Leucomax® (препарат фирмы Sandoz, Швейцария) и regramostim (Лаборатория Lenospharma, Китай). Sargramostim содержит rhGM-CSF (с мол. массой 15,5-19,5 кДа) — гликозилированный пептид, полученный из модифицированной генно-инженерным путем культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Его аминокислотная последовательность соответствует таковой человеческого ГМ-КСФ (127 остатков аминокислот), за исключением лейцина вместо пролина в 23-м положении и различных гликозилированных окончаний. Степень гликозилирования затрагивает биологическую активность, антигенность, токсичность и фармакокинетику rhGM-CSF. Molgramostim включает в себя высокоочищенный rhGM-CSF (с мол. массой 14,45 кДа), полученный с помощью *Escherichia coli*, несущей плазмиду с геном ГМ-КСФ человека; по аминокислотной последовательности идентичен человеческому цитокину, но в положении 100 изолейцин. Regramostim представлен гликопротеином rhGM-CSF из 127 аминокислот (с мол. массой 21-34 кДа), синтезированным рекомбинантно-измененными клетками яичника китайского хомячка.

Данные соединения/препараты предназначены в первую очередь для борьбы с нейтропенией и сопутствующими ей осложнениями, в том числе в виде развития инфекции, за счет стимуляции фагоцитарных клеток [24, 59]. При этом Sargramostim — единственный фактор роста, одобренный в США для лечения пожилых людей с

острым миелоидным лейкозом (AML) после проведения химиотерапии, чтобы сократить время восстановления нейтрофилов и уменьшить заболеваемость опасными для жизни инфекциями [24, 102]. Sargramostim рекомендован в США для восстановления клеток миелоидного ряда после аллогенной и сингенной пересадок костного мозга или пересадки стволовых клеток периферической крови. Кроме того, Sargramostim также одобрен для мобилизации стволовых клеток периферической крови при неудачных случаях пересадки костного мозга и задержке восстановления кроветворения [62, 102].

Показано, что к ГМ-КСФ чувствительны моноциты, миелоцитарные и промиелоцитарные лейкемические клеточные линии, в том числе при некоторых вариантах миелопролиферативных расстройств (MPD — Myeloproliferative Disorder (MPD)) [63].

Фармакокинетика и фармакодинамика rhGM-CSF

Наиболее полные данные о динамике в макроорганизме рекомбинантных форм ГМ-КСФ получены при использовании препарата Sargramostim. Когда Sargramostim вводили пациентам внутривенно в течение 2 часов, то пик концентрации GM-CSF наблюдался в образцах крови, полученных во время или немедленно после завершения введения препарата, а средней период полужизни препарата достигал приблизительно 60 минут, хотя незначительные концентрации данного соединения можно было обнаружить в крови даже через 6 ч от начала его введения. При подкожной инъекции Sargramostim'a здоровым волонтерам ГМ-КСФ обнаруживался в сыворотке крови уже через 15 минут после введения, пиковый его уровень регистрировался на 3 часах, средняя продолжительность полужизни препарата составляла около 162 минут, а следы препарата обнаруживались максимум в течение 6 часов [24, 102].

Парентеральное введение rhGM-CSF изменяет кинетику миелоидных клеток-предшественников в костном мозгу, ускоряя их вход в клеточный цикл и уменьшая его продолжительность. Эти эффекты обратимы — они отменяются при прекращении введения препарата, причем количество мобилизованных клеток-предшественников, которые появляются в периферической крови при использовании ГМ-КСФ, в 10 раз меньше, чем после введения Г-КСФ [85, 98].

Применение rhGM-CSF при лейкопении и в комплексной противоопухолевой терапии

Введение rhGM-CSF приводит к незначительному увеличению числа периферических нейтрофилов и циркулирующих моноцитов, и считается

в настоящее время второй линией лечения пациентов с тяжелой нейтропенией. Использование в терапии rhGM-CSF сопровождается умеренным увеличением числа циркулирующих эозинофилов и базофилов, что сочетается с активацией фагоцитарной функции нейтрофилов. Однако некоторые авторы считают, что терапевтический эффект применения rhGM-CSF для устранения лейкопении может быть завышен [3, 24, 45].

Рекомбинантные ГМ-КСФ и Г-КСФ (в частности Filgrastim и Pegfilgrastim, которые одобрены FDA для профилактики вызванной химиотерапией нейтропении [24, 40, 114]) сочетано применяются при лечении заболеваний крови и опухолевых процессов, а также для изоляции предшественников из периферической крови для трансплантации [101]. Смесь генетически созданных белков сохраняет функции обоих компонентов. Однако следует учитывать, что при остром миелоидном лейкозе ГМ-КСФ может вызывать активацию пролиферативного процесса [3].

В сочетании с эритропоэтином ГМ-КСФ применяется при лечении миелодиспластического синдрома, который характеризуется клональной или панцитопенией [3]. Поскольку ГМ-КСФ стимулирует миелопоэз, то rhGM-CSF используется в комплексных схемах противоопухолевой химиотерапии, в частности лимфом, защищая пациента от инфекций [3]. Наличие у ГМ-КСФ радиопротекторного эффекта определяет целесообразность его использования при комплексном лечении онкобольных, когда им проводится лучевая терапия [1, 117, 119].

Однако следует учитывать, что при применении рекомбинантных форм человеческого ГМ-КСФ как лечебных средств могут развиваться побочные явления — снижение альбумина в плазме, задержка жидкости, синдром «просачивания» капилляров, уменьшение протромбинового времени и др. [3].

ГМ-КСФ и онкопатология

Присутствие рецептора GM-CSFR на опухолевых клетках делает их восприимчивыми к стимуляции ГМ-КСФ. Закрепление цитокина на рецепторах особенно значимо для трансдукции сигнала в клетках опухоли, в которых субъединично-связанный белок GM-CSFR α продуцируется в большом количестве [159].

В связи с этим не исключается возможность, что клетки опухоли могут быть стимулированы ГМ-КСФ, так как в условиях *in vitro* они быстро растут при его воздействии. Однако *in vivo* этот эффект может быть нивелирован в результате присутствия в тканях других клеток, несущих GM-CSFR, взаимодействующих с этим цитокином и связывающих его. С другой стороны, рост

опухоли может быть индуцирован/стимулирован другими факторами роста, например, М-КСФ как продукта опухоли-ассоциированных макрофагов, секретирующих противовоспалительные цитокины, которые, в свою очередь, связаны с естественными условиями роста тканей, миграцией и распространением множества раковых образований [73, 96].

Еще один аспект роли ГМ-КСФ в процессе развития опухолей может быть обусловлен его влиянием на функционирование миелоидзависимых супрессорных клеток (MDSC — myeloid-derived suppressor cells), которые располагаются в островках незрелых гранулоцитарных и моноцитарных клеток, несут на своей поверхности рецепторы к данному цитокину, но не экспрессируют маркеры, связанные с дифференцированными моноцитами, макрофагами или дендритными клетками (DC). Дело в том, что MDSC определяют иммунодепрессивный эффект иммунных реакций против рака [89]. Хотя механизм подавления опухолевого роста не совсем ясен, но он был сильно связан с местным присутствием MDSC и M2 M0 у мышей и людей [89, 173]. У людей фенотип M0 может быть дифференцирован или к провоспалительному M1 M0, или к противовоспалительному M2 M0. Макрофагальные клетки M1 M0 секретируют IL-12^{high}, IL-23^{high}, IL-10^{low} и имеют высокую антибактериальную и противоопухолевую активность, тогда как M2 M0, секретируют IL-12^{low}, IL-23^{low}, IL-10^{high} и связаны с репарацией/реконструкцией ткани, ростом опухоли и иммунорегуляцией/иммуносупрессией [145]. Очевидно, ГМ-КСФ, сам или опосредованно, векторизует дифференцировку фенотипа клеток по 1 варианту.

Здесь же следует упомянуть еще об одной точке приложения ГМ-КСФ в онкологическом процессе. Известно, что взаимодействие между клетками опухоли и сенсорными нейронами является частью патофизиологического процесса индукции болевого синдрома при раке [51, 151]. Интенсивная боль в костях, возникающая у пациентов с миелодиспластическим синдромом, как побочный эффект при их лечении rhGM-CSF может быть вызвана двухсторонним межклеточным взаимодействием ГМ-КСФ с рецепторами GM-CSFR α , которые имеются как на клетках опухоли, так и нейронах [161]. Кстати, рецептор GM-CSFR α представлен на нервах поджелудочной железы и в больших гипертрофических нервах, расположенных близко к опухолям у больных карциномой поджелудочной железы [141]. Наличие GM-CSFR на нервных волокнах может способствовать развитию боли, вызванной опу-

холью, через путь JAK/STAT3 и ERK1/2 при участии как ГМ-КСФ, так и Г-КСФ [141, 161].

Необходимо отметить, что при нарушении структуры и регуляции генов, ответственных за синтез цитокинов, в частности генов ГМ-КСФ, М-КСФ и IL-3, расположенных на пятой хромосоме, которые могут вовлекаться в процесс при ее абберации у больных острым миелолейкозом, не исключается возможность появления стимуляторов пролиферации опухолей. В опухолевых клетках при остром миелолейкозе в 11 из 22 случаев находят М-РНК ГМ-КСФ [3].

В связи с известным иммуностимулирующим действием ГМ-КСФ и доступностью его рекомбинантных форм, уже относительно давно применяемых в клинической практике, перспективным представляется введение данного цитокина в состав вакцин для людей, что пока реализовано при конструировании только противоопухолевых вакцин [138, 139, 140, 146, 167].

Недавние клинические данные показали, что стимуляция организма с помощью ГМ-КСФ, так или иначе введенного в вакцину, может увеличивать иммунную реакцию на опухоли. Первая индивидуально на заказ сделанная и одобренная FDA вакцина против опухолей (Sipuleucel-T; Provenge®) дополнительно, помимо ключевого антигена рака простаты, включала ГМ-КСФ, который был призван активировать *in vivo* дендритные клетки (DC), в свою очередь, обеспечивающие стимуляцию Т-цитотоксических клеток, разрушающих онкотрансформированные клетки предстательной железы [79].

Другой подход к созданию противоопухолевых вакцин (например, G-Vax) базируется на использовании генетически модифицированных аутологических, аллогенных или ксеногенных опухолевых клеток, несущих гены продукции ГМ-КСФ, который относится к мощнейшим иммуностимуляторам, влияющим на антигенную презентацию DC и макрофагов, а также координирующим функционирование В- и Т-лимфоцитов и НК [4]. При этом трансфекцию опухолевых клеток можно обеспечить путем введения с помощью генной пушки экспрессионных плазмид, нанесенных на золотые частицы, или с использованием вирусных векторов, не способных к репликации, таких как ретро- и аденовирусы, вирусы Семлики, Форест и Сендай [5]. Вакцины на основе аутологических клеток, модифицированных ГМ-КСФ, способствуют развитию Т-клеточного иммунитета, инфильтрации Т-лимфоцитами основной опухоли и ее метастазов. Так, при введении аутологичной вакцины G-Vax активировался специфический Т-клеточный иммунитет как у больных меланомой, так и пациентов с немелкоклеточным

раком легкого, а аллогенные вакцины, продуцирующие ГМ-КСФ, в испытаниях I/II фаз показали позитивные результаты и у больных раком простаты, и у пациентов с удаленной аденокарциномой поджелудочной железы [5]. Кроме того, предлагается аутологичные опухолевые клетки трансфицировать, совместно с геном ГМ-КСФ, и иными генами, в частности геном CD40L (рецептор CD40, обеспечивающий взаимодействие активированного Т-лимфоцита с антиген-презентирующей клеткой – АПК), генами p53 «дикого» типа и костимулирующей молекулы B7-1, а также генетической конструкцией, кодирующей антисмысловую последовательность гена трансформирующего фактора роста, в частности TGF-β2, что приводит к инактивации данного фактора, который является сильным системным иммуносупрессором, выделяемым опухолью и подавляющим активность DC в презентации антигена, миграции в дренирующие лимфатические узлы и стимуляции опухоль-специфичных Т-лимфоцитов [5, 123].

Еще один подход к созданию противоопухолевых вакцин, который в настоящее время проходит клинические испытания III фазы при лечении рака легких, предполагает совместное введение генов ГМ-КСФ и IL-12 в аллогенные раковые клетки [30, 81]. Этот вид терапии может быть также эффективным против рака ободочной и прямой кишки, метастатической карциномы клетки почечного эпителия и аденокарциномы поджелудочной железы [61, 107, 149]. Кроме того, описано применение с положительным результатом (депрессия опухоли) комплексной вакцины, содержащей опухолевые клетки, включающие ген ГМ-КСФ; липосомальный МИС-1 пептид; антиидиотипические антитела к CD3, Magl-3 пептидам и мутантные по p53 дендритные клетки [76].

Поиск путей создания эффективных противоопухолевых вакцин с использованием ГМ-КСФ продолжается. Некоторые противоопухолевые вакцины, в частности приготовленные из смывов с клеточных линий опухолей или лизированных опухолевых клеток (в том числе вирусных онколизатов), либо пока проходят экспериментальный этап разработки/проверки, либо ограниченные пилотные испытания. Так, при введении крысам ДНК, кодирующих опухолевые белки, с растворимыми формами ГМ-КСФ или IL-12 (в качестве адъювантов) отмечена продукция специфических цитотоксичных Т-лимфоцитов [3]. Экспериментально показан сильный ответ против опухоли в виде стимуляции выброса МНС I молекул и повышенной цитостатической активности CD8 Т-клеток после

введения вакцины, при изготовлении которой в качестве модифицирующего вектора использовались аденовирусы, несущие ген синтеза ГМ-КСФ и р16 ген-супрессор опухоли [166]. Кроме того, применение терапевтических вакцин с плазмидами, кодирующими ГМ-КСФ и антигены опухоли, увеличивает антигенность противоопухолевого ответа IgG антител, а также уровень IFN γ и производство IL-6 [54, 153]. Другой интересной стратегией, находящейся все еще в экспериментальной фазе разработки, является использование онколизата аденовируса, несущего гены IL-12 и ГМ-КСФ, в комплексе с радиотерапией для подавления развития первичной гепатокарциномы у мышей [91].

ГМ-КСФ при других заболеваниях и состояниях

Описана спонтанная продукция ГМ-КСФ В-лимфоцитами человека, трансформированными вирусом Эпштейна–Барр, а также известно, что цитомегаловирусная инфекция снижает продукцию ГМ-КСФ сосудистыми эндотелиальными клетками [3].

Интересная особенность действия ГМ-КСФ на макроорганизм выявлена у больных с синдромом Фелти (ревматоидный артрит, спленомегалия и гранулоцитопения, нередко в сочетании с анемией и тромбоцитопенией), которые получали рекомбинантный аналог цитокина (rhGM-CSF) и испытывали усиление симптоматики артрита [75]. Аналогичное ухудшение состояния наблюдалось у пациентов с ревматоидным артритом (РА), когда им назначали rhGM-CSF после химиотерапии [49]. Увеличение признаков активности РА после введения ГМ-КСФ было воспроизведено в экспериментальных моделях [27, 37]. В то же время установлено, что введение препарата Mavrimumab (человеческие моноклональные антитела к GM-CSFR α), вызывало быстрый и значительный ответ, проявляющийся в снижении активности РА [35].

ГМ-КСФ не только имеет отношение к развитию РА, в том числе при синдроме Фелти, но и связан с патогенезом некоторых аутоиммунных процессов, сердечно-сосудистых заболеваний и нарушений обмена веществ [35, 147]. В частности, местное введение ГМ-КСФ в живот мышам приводит к аутоиммунному гастриту [26]. Имеются данные о том, что у дендритных клеток, активированных ГМ-КСФ, при попадании с периферии в ткань центральной нервной системы формируется фенотип, который связан с патогенезом аутоиммунного энцефаломиелита [78]. С другой стороны, локаутные по ГМ-КСФ мыши менее склонны к развитию экспериментального аллергического энцефалита, миокардита и ар-

трита, вызванного введением коллагена [44, 68, 69]. В то же время ГМ-КСФ требуется для ответа дендритных клеток (DC) на IL-6 и IL-23, для пролиферации Th17 и способен трансформировать аутонеприкосновенность клеток/ткани, увеличивая IL-6-чувствительность и выживание премированных антигеном CD4 Т-клеток, что может усиливать аутоиммунную реакцию макроорганизма [26, 147].

Интересен тот факт, что ГМ-КСФ определяется в жировой ткани, но его роль пока остается не совсем ясной. Локаутные по данному цитокину мыши более жирны, ненасытны, содержат больше липидов в брыжеечных адипоцитах, меньшее количество M0 клеток, сниженную транскрипцию провоспалительных цитокинов и проявляют увеличенное периферийное потребление глюкозы, особенно когда получают диету с высоким содержанием жира [90]. До 50% лимфоцитов печени представлены iNKT-клетками (инвариантные естественные киллеры), чьи взаимоотношения с ГМ-КСФ и чье влияние на метаболизм еще не исследовано [56]. С другой стороны, найденная в человеческих жировых прослойках и атеросклеротических бляшках, продукция М-КСФ в CD68 M0 заставляет задуматься о взаимоотношениях этого цитокина и ГМ-КСФ в детерминации гетерогенности M0 при атеросклеротических повреждениях [32]. Известный антагонизм между данными цитокинами, возможно, имеет отношение к функциональной поляризации фенотипов M2 и M1 M0 при нарушениях обмена веществ и разнообразных воспалительных заболеваниях [125, 135]. Дело в том, что М-КСФ придает импульс макрофагов M0 к формированию фенотипа M2 IRF4 (регуляторный фактор интерферона 4 или MUM1-белок), вероятно, уравнивая провоспалительный эффект, связанный с увеличением продукции IL-12, IL-6 и IL-23, которые активируются в ответ на GM-CSF-стимуляцию M0 [77, 96].

Показано, что миграция макрофагов M0 в зону глубокой ишемии миокарда связана с его повреждением, тогда как лечение anti-GM-CSF антителами уменьшает объем поврежденной ткани после инфаркта [88]. Вместе с тем, на модели мозговой ишемии установлено, что ГМ-КСФ способствует сопутствующему росту артерий и уменьшению гипоксии мозга [152]. В экспериментах *in vivo* продемонстрирована способность ГМ-КСФ в сочетании с трансформирующим ростовым фактором TGF- β 1 вызывать ангиогенез в модели с перевязкой бедренной артерии [87], а в опытах *in vitro* в режиме моноприменения ГМ-КСФ — дифференцировку человеческих CD34⁺ гемопоэтических клеток-предшественников в

дендритные клетки с признаками внутриэпидермальных макрофагов — клеток Лангерганса [118].

GM-CSF-дефицитные мыши КО более восприимчивы к некоторым инфекциям и воспалению кишечника, чем мыши дикого типа [55]. Учитывая важную роль ГМ-КСФ в поддержании функциональной активности механизмов врожденного иммунитета кишечника, в том числе за счет рекрутирования кишечных DC, отсутствие/снижение данного цитокина может иметь отношение к развитию иммунодефицита, связанного с болезнью Крона [80]. Мутации во внутриклеточном рецепторе распознавания образов NOD2, также известном как белок воспалительного заболевания кишечника 1, выявлены у пациентов с болезнью Крона, у которых наблюдалась нормальная секреция TNF α , но сниженная продукция ГМ-КСФ [33]. Многоцентровые рандомизированные клинические исследования продемонстрировали, что подкожное введение ГМ-КСФ способно инициировать манифестацию болезни Крона [94, 162].

На макроуровне ГМ-КСФ играет важную роль при развитии патологии органов дыхательной системы [171], а также в поддержании легочного гомеостаза, в том числе путем влияния на функциональную активность эпителия легких и альвеолярных макрофагов. Последнее убедительно продемонстрировано в опытах на обычных мышах и трансгенных животных с гиперпродукцией ГМ-КСФ клетками легочного эпителия, которых помещали в атмосферу с 95% кислорода [127]. Через 6 дней все «дикие» животные погибли, а 70% мутантных мышей жили даже после 10 дней эксперимента. Авторы считают, что протективный эффект ГМ-КСФ реализовывался за счет сохранения барьера в результате снижения апоптоза эпителиальных клеток.

Другая дыхательная патология, при которой секреция ГМ-КСФ имеет клиническую релевантность, — это альвеолярный протеиноз легких (PAP — Pulmonary alveolar proteinosis), характеризующийся накоплением в альвеолах белково-липидного вещества (сурфактанта), умеренно прогрессирующей одышкой, отклонениями в иммунном статусе с вторичным повреждением AM0 [109]. При этом гиперпродукцию сурфактанта связывают с патологическим влиянием ГМ-КСФ, поскольку у пациентов с PAP часто выявляются аутоантитела против данного цитокина и обеих цепей его рецептора GM-CSFR — α и β c [109], а ингаляции с rhGM-CSF эффективно купировали проявления заболевания, что было показано в доклинических испытаниях [92, 157].

Влияние ГМ-КСФ на функциональное состояние полиморфноядерных лейкоцитов мо-

жет быть использовано для управления апоптозом этих клеток и, соответственно, регуляции процесса воспаления, причем при избыточном проявлении воспалительной реакции, очевидно, целесообразно терапевтическое применение антител к данному цитокину [3]. Роль ГМ-КСФ и TNF α была изучена у больных с различными хроническими воспалительными заболеваниями и показано, что эти цитокины влияют на функцию циркулирующих нейтрофилов и характер воспаления в тканях [128, 171].

Имеются клинические и экспериментальные данные о положительном эффекте ГМ-КСФ при его использовании в терапии иммунодефицитных состояний и ассоциированных с ними осложнений. Так, показано, что введение ГМ-КСФ усиливает *in vivo* антибактериальную активность нейтрофилов против *S. aureus* у детей с ВИЧ-инфекцией [133]. Применение ГМ-КСФ при пересадке гемопоэтических стволовых клеток пациентам снижает уровень заболеваемости бактериальными инфекциями и уменьшает связанное с ними время госпитализации больных [126]. Введение ГМ-КСФ защищает мышей от летальной пневмококковой пневмонии и инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis* [29, 106, 150]. Исследования в условиях *in vitro* продемонстрировали, что человеческие макрофаги M0, стимулированные ГМ-КСФ, увеличивают антимикробный ответ против микобактерий туберкулеза [48]. Мыши КО (дефектные по ГМ-КСФ) высоко чувствительны к микобактериальным инфекциям, которые вызывают интрабронхиальные и внутриальвеолярные повреждения без формирования гранулем, обычно выявляемые у контрольных мышей дикого типа [43]. ГМ-КСФ защищает альвеолярную структуру и регулирует раннее рекрутирование макрофагов M0 и DC, которые помогают управлять ростом микобактерий посредством формирования гранулем [154]. Мыши с геноактивацией ГМ-КСФ проявляют меньшую склонность к манифестации скрытого туберкулеза и избегают заражения высокотоксичным штаммом *M. tuberculosis* [58].

Выявлена противовоспалительная активность ГМ-КСФ в отношении эндотелиальных клеток при хронической венозной недостаточности [158].

В то же время получены неоднозначные результаты применения ГМ-КСФ при лечении сепсиса [84]. Так, введение данного цитокина пациентам не обеспечивало достижения благоприятного исхода заболевания: хотя ГМ-КСФ незначительно увеличивал число циркулирующих нейтрофилов у младенцев, но не снижал показатели летальности новорожденных при сепси-

се [108]. Кроме того, установлено, что продукция/уровень GM-CSF отрицательно коррелировали с выживанием при септическом шоке [113]. Обнаружено, что чрезвычайно большие дозы GM-КСФ могут оказывать негативное влияние на больных с обширными повреждениями, а также повышенным уровнем цитокинов и других провоспалительных триггеров, которые не локализованы в очагах инфекции и могут приводить к гибели/снижению количества Т-лимфоцитов и M0 клеток, слепоте и серьезным повреждениям различных тканей [64, 99].

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* выявлено, что GM-КСФ стимулирует микробицидные потенции нейтрофилов и макрофагов M0 и способен предотвращать эффект иммунодепрессанта дексаметазона, эффективно усиливая иммунный ответ против гиф *Aspergillus fumigatus* [132]. Предварительная инкубация нейтрофилов с GM-КСФ увеличивала их фунгицидную активность против *Candida glabrata* и *Histoplasma capsulatum* [24, 95, 122]. Но, несмотря на это, пока отсутствуют убедительные результаты клинических исследований, которые были бы сосредоточены на анализе эффектов GM-КСФ при лечении агрессивных грибковых болезней.

Выше, в разделе 5, показана эффективность и перспективность использования GM-КСФ при создании противоопухолевых вакцин. Здесь же мы отметим, что в настоящее время в экспериментальных исследованиях и преклинических испытаниях дается оценка целесообразности включения этого цитокина в состав вакцин для профилактики ряда инфекционных заболеваний, в том числе туберкулеза, бешенства и др. Так, вакцины, использующие плазмиды, кодирующие микобактериальные антигены и GM-КСФ, или основанные на рекомбинантном BCG, несущем ген данного цитокина, показали эффективность в экспериментальных моделях туберкулеза, которую авторы связывают с увеличением числа APC, повышением продукции IL-12, IFN γ , антител и усилением иммунного ответа, что обеспечивало лучшую защиту от генерализации инфекции [53, 121, 134, 165, 174]. Введение рекомбинантного вируса бешенства с геном GM-КСФ предотвращало развитие экспериментального бешенства после заражения вирусом дикого типа [168]. Подобный вариант вакцины против нейротоксина *Clostridium botulinum* также оказался достаточно эффективным [103].

Продолжаются исследования по оценке перспективного потенциала GM-КСФ при создании комбинированных вакцин и терапевтических препаратов для профилактики и лечения туберкулеза, аспергиллеза, кандидоза, периодонтита,

болезни Крона, сепсиса, ВИЧ, гриппа и многих других заболеваний инфекционной природы [47, 66, 68, 69, 163].

GM-КСФ играет важную роль в реализации репродуктивной функции женского организма с большим количеством точек приложения. Сегодня экспериментальными и клиническими исследованиями установлено, что GM-КСФ участвует в созревании фолликулов и высвобождении гистамина во время овуляции [169], синтезируется эпителиоцитами и децидуальными клетками эндометрия, особенно интенсивно в середине менструального цикла, и готовит матку к имплантации зародыша [172], вовлечен в естественный хэтчинг (истончение и разрыв блестящей оболочки поздней бластоцисты-эмбриона), усиливает толерантность материнского организма к плоду во время беременности на ранних ее сроках [116], способствует программированию правильного развития плацентарных структур и прогрессированию беременности [86, 170]. С другой стороны, дефицит GM-КСФ и/или его дисбаланс в ансамбле про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1, IFN γ , TNF α , TNF β , LIF, IL-4, IL-6 и др.) ассоциируются с неблагоприятным течением процесса гестации, развитием гестозов (преэклампсии) и патологии плаценты, невынашиванием беременности, в том числе привычным [83, 129, 131]. Столь широкий диапазон функциональных эффектов GM-КСФ на формирование и развитие беременности используется в клинической практике для повышения фертильности женского организма. В частности, данный цитокин успешно применяется при лечении женщин с однократными и множественными прерываниями беременности в анамнезе, а также при осуществлении экстракорпорального оплодотворения путем его добавления в среду культивирования (EmbryoGene) эмбрионов [137, 148, 170].

Представленный выше материал свидетельствует о включенности GM-КСФ в регуляцию многих физиологических и патологических процессов в макроорганизме, что позволяет уже сегодня использовать данный цитокин или его рекомбинантные аналоги в клинической практике, в частности онкологии, инфектологии и репродуктологии. Вместе с тем широкому внедрению GM-КСФ препятствуют, прежде всего, трудности и высокая стоимость его получения в больших объемах, а также опасность контаминации нативного сырья вирусами и бактериями, что заставляет вести поиск/разработку новых более эффективных технологий производства данного цитокина. Одним из перспективных путей решения этой задачи является синтез активного центра GM-КСФ.

Иммунобиологические свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ

ГМ-КСФ относится к так называемым «ранним» цитокинам, т. е. участвующим в инициации начальных этапов многих, в том числе патологических, процессов, что позволяет эффективно его использовать в регуляции различных реакций макроорганизма [102, 163]. Однако цельная молекула ГМ-КСФ не обладает достаточной селективностью действия, вовлекая, помимо специфических рецепторов, связанных с пролиферацией клеток, другие рецепторы, чья «активация» способна существенно модифицировать ответ полипотентных клеток в сторону снижения или увеличения колониеобразования.

В 90-х годах XX века коллективом авторов была определена аминокислотная последовательность активного центра молекулы ГМ-КСФ и затем синтезирована группа аналогичных ему пептидов, из которой был отобран один из них, позднее получивший сокращенное название ZP2, с химической формулой — THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO, очевидно, наиболее точно воспроизводящий его структуру и обладающий рядом свойств, характерных для цельной молекулы данного цитокина [6, 7, 8].

Следует отметить, что получение синтетического низкомолекулярного пептида, являющегося аналогом фрагмента молекулы ГМ-КСФ, процесс значительно менее дорогостоящий, чем получение нативного цитокина из стимулированных фитогемагглютинином лейкоцитов костного мозга. В то же время чистота получаемого целевого продукта неизмеримо выше, даже по сравнению с производством рекомбинантных форм ГМ-КСФ, что определяется особенностями технологии контролируемого синтеза пептидов.

Как показали результаты специальных исследований с использованием двух моделей (культивирование в диффузионных камерах *in vivo* и культивирование *in vitro* в агарозных культурах на планшетах), данный пептид оказывает на кластеро- и колониеобразование клеток крови действие, практически идентичное цельной молекуле ГМ-КСФ [7].

В дальнейшем этими же авторами было показано, что указанный синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ — ZP2 обладает комплексом иммунобиологических эффектов, одновременно проявляя иммуностимулирующую, антибактериальную и репаративную активность [11, 13, 14, 15].

В частности, синтетический пептид ZP2 способен стимулировать пролиферацию лимфоцитов в РБТЛ, усиливать дифференцировку ство-

ловых гемопоэтических клеток в гранулоциты, активировать хемотаксис и хемокинез гранулоцитов и моноцитов периферической крови [15, 19]. Кроме того, в опытах *in vitro* установлено, что контакт пептида ZP2 с нейтрофилами периферической крови человека вызывает у них повышенную продукцию широкого спектра цитокинов, включая G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, IFN γ , IL-17A, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, TNF α , IL-8, MIP-1 β [10].

В экспериментах *in vitro* установлено, что синтетический пептид ZP2 в широком диапазоне концентраций (10-300 мкг/мл) тормозит рост и размножение грамположительных (стафилококки) и грамотрицательных бактерий (энтеробактерии), оказывает преимущественно ингибирующее действие на биопленкообразование музейных и клинических штаммов стафилококков и энтеробактерий [4, 12, 16, 20], а в условиях *in vivo* у больных с дисбактериозом влагалища восстанавливает нормальную микрофлору, подавляя зазвигание потенциально патогенной микрофлоры в данном биотопе [9].

В модельных экспериментах и клинических наблюдениях у синтетического пептида ZP2 выявлены выраженные репаративные свойства, о чем свидетельствовало вдвое ускоренное заживление ран у лабораторных животных [14, 18] и у женщин после электроэксцизии шейки матки после оперативного вмешательства при интраэпителиальной дисплазии [2, 9]. Кроме того, его использование показало высокую эффективность в этиопатогенетической терапии больных хронической вирусной инфекцией, ассоциированной с вирусом Эпштейна—Барр [17], а также в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита [23].

Помимо прочего, в опытах *in vitro* обнаружено, что данный пептид способен усиливать эффекты других биологически активных веществ, в том числе катионных белков (в частности тромбодесины, лейкоцелесин — интерцел), лизоцима и вещества выделенного из супернатантов стволовых клеток с фенотипом CD34⁺CD45^{dim} [18, 19].

В настоящее время синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ входит в состав нескольких косметических средств [9] и может послужить основой для создания лекарственных, в том числе комбинированных, препаратов, обладающих поливалентным действием.

Заключение

Таким образом, ГМ-КСФ, относясь к разряду факторов роста, является мультипотентным цитокином, обладающим выраженным плеiotропным действием, в сферу которого включены как

клетки иммунной системы, так и клетки других тканей и органов, что определяет его широкое применение в клинической практике. В настоящее время чаще используются не нативные, а рекомбинантные формы ГМ-КСФ.

Однако применение указанных лекарственных средств, помимо ожидаемого позитивного эффекта, в некоторых случаях сопряжено с развитием нежелательных осложнений, что может быть связано со спецификой реакции макроорганизма либо на функционально достаточно «агрессивный» ГМ-КСФ (активация системного воспаления и аутоиммунных процессов, нарушения реологических свойств и системы гемостаза крови и др.), либо на тот «балласт», который присутствует в препаратах в силу особенностей самой молекулы данного цитокина (ее модификация, аллергогенность ее частей и др.) или тех-

нологии производства (недостаточная очистка, стабилизаторы и др.).

Большинства этих недостатков лишен синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ, в частности ZP2 [13, 16, 15, 17]. Будучи полученным в условиях управляемого синтеза и имеющий молекулярную массу в 10 раз меньшую, чем нативный ГМ-КСФ, данный аналог его активного центра не только проявляет типичное для указанного цитокина действие по стимуляции роста и дифференцировке клеток миелоидного дифферона, но и обладает рядом дополнительных вышеописанных иммунобиологических эффектов. Указанные особенности синтетического пептида ZP2 делают его перспективным кандидатом для создания не только эффективных косметических средств, но и новых лекарственных препаратов с комбинированными свойствами.

Список литературы / References

1. Аклев А.В., Тряпицын Г.А., Симбирцев А.С., Аклев А.А., Пряхин Е.А., Зурочка А.В. Влияние синтетического пептида активного центра GM-CSF на восстановление гемопоэза у мышей C57BL/6 после фракционированного облучения // Радиационная биология. Радиоэкология, 2014. Т. 4, №2. С. 117-126. [Aklev A.V., Tryapitsyn G.A., Simbirtsev A.S., Aklev A.A., Pryakhin E.A., Zurochka A.V. Effect of a synthetic peptide of the active center GM-CSF on the restoration of hematopoiesis in C57BL/6 mice after fractionated irradiation. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*, 2014, Vol. 4, no. 2, pp. 117-126. (In Russ.)]
2. Гольцова И.А., Зуева Е.Б., Зурочка А.В. Цитологические и антибактериальные эффекты ГМ-КСФ при репаративно-пластических процессах шейки матки после хирургического лечения // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 2 (1). С. 29-32. [Goltsova I.A., Zueva E.B., Zurochka A.V. Cytological and antibacterial effects of GM-CSF in reparative-plastic processes of the cervix after surgical treatment. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 2 (1), pp. 29-32. (In Russ.)]
3. Грачева Л.А. Цитокины в онкогематологии. М.: Алтус, 1996. 168 с. [Gracheva L.A. *Citokines in oncohematology*. Moscow: Altus, 1996. 168 p.]
4. Гриценко В.А., Зурочка В.А., Зурочка А.В., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Курлаев П.П. Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на формирование биопленок клиническими изолятами стафилококков // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2015. № 4. 11 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/VAG-2015-4.pdf>. [Gritsenko V.A., Zurochka V.A., Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Tyapaeva Ya.V., Belozertseva Yu.P., Kurlaev P.P. Effect of a synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on biofilm formation by clinical isolates of staphylococci. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2015, no. 4. 11 p. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/VAG-2015-4.pdf>.]
5. Дюкалова М.Б. Противоопухолевые вакцины на основе опухолевых клеток и их производных // Российский биотерапевтический журнал, 2012. Т. 11, № 4. С. 3-8. [Dyukalova M.B. Antitumor vaccines based on tumor cells and their derivatives. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2012, Vol. 11, no. 4, pp. 3-8. (In Russ.)]
6. Жемчугов В.Е., Майоров В.А., Зурочка А.В., Яровинский Б.Г., Штивельбанд М.И., Румянцев А.Г., Чукичев А.В., Ерохин В.П. Синтетический полипептид, способ получения и средство для культивирования на его основе. Патент РФ № 2061699. Бюллетень, 1996. № 16. [Zhemchugov V.E., Mayorov V.A., Zurochka A.V., Yarovinsky B.G., Shtivelband M.I., Rumyantsev A.G., Chukichev A.V., Erokhin V.P. Synthetic polypeptide, method of production and means for cultivation based on it. RF patent No. 2061699. *Bulletin*, 1996. No. 16].

7. Жемчугов В.Е., Румянцев А.Г., Владимирская Е.Б., Кондрашин Ю.И., Зурочка А.В. Стимулятор роста костно-мозговых клеток человека. Патент РФ № 2136308. Бюллетень, 1999. № 25. [Zhemchugov V.E., Rumyantsev A.G., Vladimirskaia E.B., Kondrashin Yu.I., Zurochka A.V. Human bone marrow cell growth stimulant. RF patent No. 2136308. Bulletin, 1999. No. 25].
8. Жемчугов В.Е. Как мы делали химические вакцины. Записки о современных охотниках за микробами. М.: Наука, 2004. 349 с. [Zhemchugov V.E. How We Made Chemical Vaccines. Notes about Modern Microbial Hunters]. Moscow: Nauka, 2004. 349 p.
9. Зуева Е.Б., Гольцова И.А., Зурочка А.В., Зурочка В.А., Мякишев К.И., Зайнетдинова Л.Ф. Изучение влияния АЦЕГРАМ-спрея (синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ) на характер регенеративно-пластических процессов шейки матки и микрофлору влагалища после процедуры-иссечения аномальной ткани шейки у женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), №2 (1). С. 287-290. [Zueva E.B., Goltsova I.A., Zurochka A.V., Zurochka V.A., Myakishev K.I., Zainetdinova L.F. Study of the effect of ACEGRAM-spray (synthetic peptide of the active center of GM-CSF) on the nature of regenerative-plastic processes of the cervix and the vaginal microflora after the procedure for excision of abnormal cervical tissue in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 2 (1), pp. 287-290. (In Russ.)]
10. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Дукарт В.В., Черкасов С.В., Гриценко В.А. Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2015. № 4. 11 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/ZAV-2015-4.pdf>. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Dukart V.V., Cherkasov S.V., Gritsenko V.A. Effect of a synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on cytokine production by neutrophils in human peripheral blood. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2015, no. 4. 11 p. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/ZAV-2015-4.pdf>.
11. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Гриценко В.А. Исследование различной биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и их комбинаций с другими биологически активными веществами // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17 Спец. вып. С. 266. [Zurochka V.A., Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Gritsenko V.A. Investigation of various biological activity of synthetic peptides of the active center of GM-CSF and their combinations with other biologically active substances. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17. Special Iss. P. 266. (In Russ.)]
12. Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г., Аргунова Е.Г., Субботин А.М., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Антибактериальные свойства синтетических пептидов активного центра GM-CSF // Цитокины и воспаление, 2010. Т. 9, № 4. С. 32-34. [Zurochka A.V., Sukhovey Yu.G., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Petrov S.A., Unger I.G., Kostolomova E.G., Argunova E.G., Subbotin A.M., Kolobov A.A., Simbirtsev A.S. Antibacterial properties of synthetic peptides of the active center of GM-CSF. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2010, Vol. 9, no. 4, pp. 32-34. (In Russ.)]
13. Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г. Способ повышения бактерицидной активности. Патент РФ № 2448725. Бюллетень, 2012. № 12. [Zurochka A.V., Sukhovey Yu.G., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Petrov S.A., Unger I.G., Kostolomova E.G. A method for increasing bactericidal activity. Patent RF № 2448725. Bulletin, 2012. No. 12].
14. Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г. Способ повышения репаративной активности. Патент РФ № 2455020. Бюллетень, 2012. № 19. [Zurochka A.V., Sukhovey Yu.G., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Petrov S.A., Unger I.G., Kostolomova E.G. A way to increase reparative activity. RF patent No. 2455020. Bulletin, 2012. No. 19].
15. Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г. Способ повышения пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови. Патент РФ № 2465001. Бюллетень, 2012. № 30. [Zurochka A.V., Sukhovey Yu.G., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Petrov S.A., Unger I.G., Kostolomova E.G. A method for increasing the proliferative activity of peripheral blood lymphocytes. RF Patent No. 2465001. Bulletin, 2012. No. 30].
16. Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зурочка А.В., Гриценко В.А. Особенности влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на рост грамположительных кокков *in vitro* // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2015. № 1. 10 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-1/Articles/VAZ-2015-1.pdf>. [Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Gritsenko V.A. Features of the effect of a synthetic peptide of the active center of GM-CSF on the growth of gram-positive cocci *in vitro*. *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2015, no. 1. 10 p. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-1/Articles/VAZ-2015-1.pdf>.
17. Зурочка В.А., Забков О.И., Добрынина М.А., Гриценко В.А., Давыдова Е.В., Чукичев А.В., Забокрицкий Н.А., Сарапульцев А.П., Зурочка А.В. Иммунологические критерии эффективности комплекс-

ной этиопатогенетической терапии у больных хронической вирусной инфекцией, ассоциированной с вирусом Эпштейна-Бар // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 2. С. 338-346. [Zurochka V.A., Zabkov O.I., Dobrynina M.A., Gritsenko V.A., Davydova E.V., Chukichev A.V., Zabokritskii N.A., Sarapultsev A.P., Zurochka A.V. Clinical diagnostic criteria of efficiency for combined etiopathogenetic therapy in patients with chronic Epstein-Barr virus infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 2, pp. 338-346. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-CDC-1141.

18. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Сравнительные эффекты клеток фенотипа CD34⁺CD45^{dim} и синтетических пептидов активного центра GM-CSF на процессы репарации кожной раны в эксперимент // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 4 С. 21-25. [Zurochka V.A., Zurochka A.V., Kostolomova E.G., Sukhovey Yu.G., Kolobov A.A., Simbirtsev A.S. Comparative effects of cells of the CD34⁺ CD45^{dim} phenotype and synthetic peptides of the active center of GM-CSF on processes repair of skin wounds in the experiment. *Tsitokiny i vospaleniye = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 4, pp. 21-25.

19. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Гриценко В.А. Оценка влияния различных комбинаций синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и биологически-активных веществ (дефенсинов, лизоцима, интерцида и супернатантов клеток CD34⁺) на антибактериальные, иммуностропные и репаративные свойств // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 2 (1). С. 239-240. [Zurochka V.A., Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Gritsenko V.A. Evaluation of the effect of various combinations of synthetic peptides of the active center of GM-CSF and biologically active substances (defensins, lysozyme, intercid and CD34⁺ cell supernatants) on antibacterial, immunotropic and reparative properties. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 2 (1), pp. 239-240. (In Russ.)]

20. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Дукардт В.В., Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Черешнев В.А. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2016. № 2. 30 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Dukardt V.V., Gritsenko V.A., Tyapaeva Ya.V., Chereshev V.A. The phenomenon of a unique combination of immunobiological properties in a synthetic analogue of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Byulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2016, no. 2, 30 p. [Electronic resource]. Access mode: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>.

21. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines]. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.

22. Козлов В.А., Борисов А.Г., Смирнова С.В., Савченко А.А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: руководство для врачей. Новосибирск: Наука, 2009. 274 с. [Kozlov V.A., Borisov A.G., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Practical aspects of diagnosis and treatment of immune disorders: a guide for physicians]. Novosibirsk: Nauka, 2009. 274 p.

23. Саркисян Н.Г., Катаева Н.Н., Тузанкина И.А., Меликян С.Г., Зурочка В.А., Зурочка А.В. Оценка эффективности спрея на основе синтетического пептида в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтит // Инфекция и иммунитет, 2019. Т. 9, № 3-4. С. 549-558. [Sarkisian N.G., Kataeva N.N., Tuzankina I.A., Melikyan S.G., Zurochka V.A., Zurochka A.V. Assessing efficiency of synthetic peptide-containing spray in combination therapy of chronic generalized periodontitis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, Vol. 9, no. 3-4, pp. 549-558. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-549-558.

24. Armitage J.O. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 1998, Vol. 92, no. 12, pp. 4491-4508.

25. Banerjee S., Biehl A., Gadina M., Hasni S., Schwartz D.M. JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects. *Drugs*, 2017, Vol. 77, no. 5, pp. 521-546.

26. Biondo M., Nasa Z., Marshall A., Toh B.H., Alderuccio F. Local transgenic expression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor initiates autoimmunity. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 3, pp. 2090-2099.

27. Bischof R.J., Zafiroopoulos D., Hamilton J.A., Campbell I.K. Exacerbation of acute inflammatory arthritis by the colony-stimulating factors CSF-1 and granulocyte macrophage (GM)-CSF: evidence of macrophage infiltration and local proliferation. *Clin. Exp. Immunol.*, 2000, no. 119, pp. 361-367.

28. Blanchard D.K., Michelini-Norris M.B., Pearson C.A., McMillen S., Djeu J.Y. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) by monocytes and large granular lymphocytes stimulated with Mycobacterium avium-M. intracellulare: activation of bactericidal activity by GM-CSF. *Infect. Immun.*, 1991, Vol. 59, no. 7, pp. 2396-2402.

29. Bo L., Wang F., Zhu J., Li J., Deng X. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Crit. Care*, 2011, Vol. 15, no. 1, R58. doi: 10.1186/cc10031.

30. Bradbury P.A., Shepherd F.A. Immunotherapy for lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 2008, no. 3, pp. 164-170.

31. Bradley T.R., Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1966, no. 44, pp. 287-299.
32. Brochériou I., Maouche S., Durand H., Braunersreuther V., le Naour G., Gratchev A., Koskas F., Mach F., Kzhyshkowska J., Ninio E. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2011, Vol. 214, no. 2, pp. 316-324.
33. Brosbøl-Ravnborg A., Hvas C.L., Agnholt J., Dahlerup J.F., Vind I. Toll-like receptor-induced granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion is impaired in Crohn's disease by nucleotide oligomerization domain 2-dependent and -independent pathways. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009, Vol. 155, no. 3, pp. 487-495.
34. Burgess A.W., Camakaris J., Metcalf D. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *J. Biol. Chem.*, 1977, Vol. 252, no. 6, pp. 1998-2003.
35. Burmester G.R., Weinblatt M.E., McInnes I.B., Porter D., Barbarash O., Vatutin M., Szombati I., Esfandiari E., Sleeman M.A., Kane C.D., Cavet G., Wang B., Godwood A., Magrini F., EARTH Study Group. Efficacy and safety of mavrilimumab in subjects with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, Vol. 72, no. 9, pp. 1445-1452.
36. Cakarova L., Marsh L.M., Wilhelm J., Mayer K., Grimminger F., Seeger W., Lohmeyer J., Herold S. Macrophage tumor necrosis factor- α induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2009, Vol. 180, no. 6, pp. 521-532.
37. Campbell I.K., Bendele A., Smith D.A., Hamilton J.A. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor exacerbates collagen induced arthritis in mice. *Ann. Rheum. Dis.*, 1997, Vol. 56, no. 6, pp. 364-368.
38. Carbonneil C., Aouba A., Burgard M., Cardinaud S., Rouzioux C., Langlade-Demoyen P., Weiss L. Dendritic cells generated in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN- α are potent inducers of HIV-specific CD8 T-cells. *AIDS*, 2003, Vol. 17, no. 12, pp. 1731-1740.
39. Carr P.D., Gustin S.E., Church A.P., Murphy J.M., Ford S.C., Mann D.A., Woltring D.M., Walker I., Ollis D.L., Young I.G. Structure of the complete extracellular domain of the common subunit of the human GM-CSF, IL-3, and IL-5 receptors reveals a novel dimer configuration. *Cell*, 2001, Vol. 104, no. 2, pp. 291-300.
40. Castagnola E., Dufour C. Role of G-CSF and GM-CSF in the management of infections in preterm newborns: an update. *Early Hum. Dev.*, 2014, Vol. 90, no. 2, pp. 15-17.
41. Chen J., Cárcamo J.M., Golde D.W. The α subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor interacts with c-Kit and inhibits c-Kit signaling. *J. Biol. Chem.*, 2006, Vol. 281, no. 31, pp. 22421-22426.
42. Choi J.K., Kim K.H., Park H., Park S.R., Choi B.H. Granulocyte macrophage colony stimulating factor shows anti-apoptotic activity in neural progenitor cells via Jak / STAT5-Bcl-2 pathway. *Apoptosis*, 2011, Vol. 16, no. 2, pp. 127-134.
43. Chroneos Z.C., Midde K., Sever-Chroneos Z., Jagannath C. Pulmonary surfactant and tuberculosis. *Tuberculosis*, 2009, Vol. 89, Suppl. 1, pp. 10-14.
44. Conti L., Gessani S. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. *Immunobiology*, 2008, Vol. 213, no. 9-10, pp. 859-870.
45. Crawford J., Armitage J., Balducci L., Bennett C., Blayney D.W., Cataland S.R., Dale D.C., Demetri G.D., Erba H.P., Foran J., Freifeld A.G., Goemann M., Heaney M.L., Htoy S., Hudock S., Kloth D.D., Kuter D.J., Lyman G.H., Michaud L.B., Miyata S.C., Tallman M.S., Vadhan-Raj S., Westervelt P., Wong M.K., National Comprehensive Cancer Network. Myeloid growth factors. *J. Natl Comp. Canc. Netw.*, 2009, Vol. 7, no. 1, pp. 64-83.
46. Crosier K.E., Wong G.G., Mathey-Prevot B., Nathan D.G., Sieff C.A. A functional isoform of the human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor has an unusual cytoplasmic domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1991, Vol. 88, pp. 7744-7748.
47. Cruz A.F., Santelises M.A., Espinosa O.R., Espinosa D.M., Castillo B.M., Payan J.B., Pando R.H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. *Med. Oncol.*, 2014, Vol. 31, no. 1, pp. 774-788.
48. Denis M., Ghadirian E. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor restricts growth of tubercle bacilli in human macrophages. *Immunol. Lett.*, 1990, Vol. 24, no. 3, pp. 203-206.
49. de Vries E.G., Willemse P.H., Biesma B. Flare-up of rheumatoid arthritis during GM-CSF treatment after chemotherapy. *Lancet*, 1991, Vol. 338, no. 8765, pp. 517-518.
50. Dewas C., Dang P.M., Gougerot-Pocidalo M.A., El-Benna J. TNF- α induces phosphorylation of p47 (phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 8, pp. 4392-4398.
51. Ding D.X., Rivas C.I., Heaney M.L., Raines M.A., Vera J.C., Golde D.W. The α subunit of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor signals for glucose transport via a phosphorylation in dependent pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1994, Vol. 91, no. 7, pp. 2537-2541.
52. Domen J., Weissman I.L. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signalling the other. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 7, pp. 1707-1718.
53. Dou J., Tang Q., Yu F., Yang H., Zhao F., Weiguo X., Jing W., Weihua H., Kai H., Chunsheng L., Xiang F.H., Yaqing W. Investigation of immunogenic effect of the BCG priming and Ag85A- GM-CSF boosting in Balb/c mice model. *Immunobiology*, 2010, Vol. 215, no. 2, pp. 133-142.

54. Dranoff G., Crawford A.D., Sadelain M., Ream B., Rashid A., Bronson R.T., Dickersin G.R., Bachurski C.J., Mark E.L., Whitsett J.A. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science*, 1994, Vol. 264, no. 5159, pp. 713-716.
55. Egea L., Hirata Y., Kagnoff M.F. GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2010, Vol. 4, no. 6, pp. 723-731.
56. Exley M.A., Koziel M.J. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology*, 2004, Vol. 40, no. 5, pp. 1033-1040.
57. Fanger N.A., Liu C., Guyre P.M., Wardwell K., O'Neil J., Guo T.L., Christian T.P., Mudzinski S.P., Gosselin E.J. Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. *Blood*, 1997, Vol. 89, no. 11, pp. 4128-4135.
58. Francisco-Cruz A., Mata-Espinosa D., Estrada-Parra S., Xing Z., Herna'ndez-Pando R. Immunotherapeutic effects of recombinant adenovirus encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2013, Vol. 171, no. 3, pp. 283-297.
59. Freyer G., Ligneau B., Trillet-Lenoir V. Colony-stimulating factors in the prevention of solid tumors induced by chemotherapy in patients with febrile neutropenia. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1998, Vol. 10, no. 1, pp. 3-9.
60. Fukuzawa H., Sawada M., Kayahara T., Morita-Fujisawa Y., Suzuki K., Seno H., Takaishi S., Chiba T. Identification of GM-CSF in Paneth cells using single-cell RT-PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, Vol. 312, no. 4, pp. 897-902.
61. Garcia J.A., Mekhail T., Elson P., Wood L., Bukowski R.M., Dreicer R., Rini B.I. Phase I/II trial of subcutaneous interleukin-2, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon- α in patients with metastatic renal cell carcinoma. *BJU Int.*, 2012, Vol. 109, no. 1, pp. 63-69.
62. Giralt S., Costa L., Schriber J., DiPersio J., Maziarz R., McCarty J., Haughnessy P., Snyder E., Bensinger W., Copelan E., Hosing C., Negrin R., Bo Petersen F., Rondelli D., Soiffer R., Leathe H., Pazzalia A., Devine S. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2014, Vol. 20, no. 3, pp. 295-308.
63. Gomez-Cambronero J., Horn J., Paul C.C., Baumann M.A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 12, pp. 6846-6855.
64. Gonzalez-Juarrero M., Hattle J.M., Izzo A., Junqueira-Kipnis A.P., Shim T.S., Trapnell B.C., Cooper A.M., Orme I.M. Disruption of granulocyte macrophage-colony stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control mycobacterium tuberculosis infection. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, Vol. 77, no. 6, pp. 914-922.
65. Gough N.M., Gough J., Metcalf D., Kelso A., Grail D., Nicola N.A., Burgess A.W., Dunn A.R. Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Nature*, 1984, Vol. 309, no. 5971, pp. 763-767.
66. Grabstein K.H., Urdal D.L., Tushinski R.J., Mochizuki D.Y., Price V.L., Cantrell M.A., Gillis S., Conlon P.J. Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science*, 1986, Vol. 232, no. 4749, pp. 506-508.
67. Groot R.P., Coffey P.J., Koenderman L. Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cell Signal*, 1998, Vol. 10, no. 9, pp. 619-628.
68. Hamilton J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 7, pp. 533-544.
69. Hamilton J.A., Anderson G.P. GM-CSF biology. *Growth Factors*, 2004, Vol. 22, no. 4, pp. 225-231.
70. Hamilton J.A., Whitty G.A., Stanton H., Meager A. Effects of macrophage-colony stimulating factor on human monocytes: induction of expression of urokinase-type plasminogen activator, but not of secreted prostaglandin E2, interleukin-6, interleukin-1, or tumour necrosis factor- α . *J. Leukoc. Biol.*, 1993, Vol. 53, no. 6, pp. 707-714.
71. Hansen G., Hercus T.R., McClure B.J., Stomski F.C., Dottore M., Powell J., Ramshaw H., Woodcock J.M., Xu Y., Guthridge M., McKinstry W.J., Lopez A.F., Parker M.W. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell*, 2008, Vol. 134, no. 3, pp. 496-507.
72. Hansen G., Hercus T.R., Xu Y., Lopez A.F., Parker M.W., McKinstry W.J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the ternary human GM-CSF receptor complex. *Acta Crystallogr. Section F Struct. Biol. Commun.*, 2008, Vol. 64, no. 8, pp. 711-714.
73. Hao N.B., Lü M.H., Fan Y.H., Cao Y.L., Zhang Z.R., Yang S.M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 242, pp. 8094-8098.
74. Hart P.H., Whitty G.A., Piccoli D.S., Hamilton J.A. Synergistic activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN- γ . Increased TNF- α but not IL-1 activity. *J. Immunol.*, 1988, Vol. 141, no. 5, pp. 1516-1521.
75. Hazenberg B.P., van Leeuwen M.A., Van Rijswijk M.H., Stern A.C., Vellenga E. Correction of granulocytopenia in Felty's syndrome by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Simultaneous induction of interleukin-6 release and flare-up of the arthritis. *Blood*, 1989, Vol. 74, no. 8, pp. 2769-2770.
76. Hege K.M., Carbone D.P. Lung cancer vaccines and gene therapy. *Lung Cancer*, 2003, Vol. 41, Suppl. 1, pp. 103-113.

77. Herold S., Mayer K., Lohmeyer J. Acute lung injury. How macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. *Front. Immunol.*, 2001, Vol. 2, 65. doi: 10.3389/fimmu.2011.00065.
78. Hesske L., Vincenzetti C., Heikenwalder M., Prinz M., Reith W., Fontana A., Suter T. Induction of inhibitory central nervous system-derived and stimulatory blood-derived dendritic cells suggests a dual role for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in central nervous system inflammation. *Brain*, 2010, Vol. 133, no. 6, pp. 1637-1654.
79. Higano C.S., Schellhammer P.F., Small E.J., Burch P.A., Nemunaitis J., Yuh L., Provost N., Frohlich M.W. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer*, 2009, Vol. 115, no. 16, pp. 3670-3679.
80. Hirata Y., Egea L., Dann S.M., Eckmann L., Kagnoff M.F. GM-CSF-facilitated dendritic cell recruitment and survival govern the intestinal mucosal response to a mouse enteric bacterial pathogen. *Cell Host Microbe*, 2010, Vol. 7, no. 2, pp. 151-163.
81. Holt G.E., Disis M.L. Immune modulation as a therapeutic strategy for non-small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer*, 2009, Vol. 9, Suppl. 1, pp. 13-19.
82. Hornell T.M., Beresford G.W., Bushey A., Boss J.M., Mellins E.D. Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 5, pp. 2374-2383.
83. Huang S.J., Zencussen A.C., Chen C.P., Basar M., Yang H., Arcuri F., Li M., Kocamaz E., Buchwalder L., Rahman M., Kayisli U., Schatz F., Toti P., Lockwood C.J. The implication of aberrant GM-CSF expression in decidual cells in the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Pathol.*, 2010, Vol. 177, no. 5, pp. 2472-2482.
84. Hutchins N.A., Unsinger J., Hotchkiss R.S., Ayala A. The new normal: immuno-modulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol. Med.*, 2014, Vol. 20, no. 4, pp. 224-233.
85. Jiang D., Schwarz H. Regulation of granulocyte and macrophage populations of murine bone marrow cells by G-CSF and CD137 protein. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 12, e15565. doi: 10.1371/journal.pone.0015565.
86. Jokhi P.P., King A., Loke Y.W. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes. *Hum. Reprod.*, 1994, Vol. 9, no. 9, pp. 1660-1669.
87. Jost M.M., Ninci E., Meder B., Kempf C., Royen N.V., Hua J., Berger B., Hoefer I., Modolell M., Buschmann I. Divergent effects of GM-CSF and TGF-beta-1 on bone marrow-derived macrophage arginase-1 activity, MCP-1 expression, and matrix metalloproteinase-12: a potential role during arteriogenesis. *FASEB J.*, 2003, Vol. 17, no. 15, pp. 2281-2283.
88. Kellar R.S., Lancaster J.J., Thai H.M., Juneman E., Johnson N.M., Byrne H.G., Stansifer M., Arsanjani R., Baer M., Bebbington C., Flashner M., Yarranton G., Goldman S. Antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reduces the number of activated tissue macrophages and improves left ventricular function following myocardial infarction in a rat coronary-artery ligation model. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2011, Vol. 57, no. 5, pp. 568-574.
89. Khaled Y.S., Ammori B.J., Elkord E. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects. *Immunol. Cell Biol.*, 2013, Vol. 91, no. 8, pp. 493-502.
90. Kim D.H., Sandoval D., Reed J.A., Matter E.K., Tolod E.G., Woods S.C., Seeley R.J. The role of GM-CSF in adipose tissue inflammation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2008, Vol. 295, no. 5, pp. 1038-1046.
91. Kim W., Seong J., Oh H.J., Koom W.S., Choi K.-J., Yun C.-O. A novel combination treatment of armed oncolytic adenovirus expressing IL-12 and GM-CSF with radiotherapy in murine hepatocarcinoma. *J. Radiat. Res.*, 2011, Vol. 52, no. 5, pp. 646-654.
92. Kleff V., Sorg U.R., Bury C., Suzuki T., Rattmann I., Jerabek-Willemsen M., Poremba C., Flasshove M., Opalka B., Trapnell B., Dirksen U., Moritz T. Gene therapy of β c-deficient pulmonary alveolar proteinosis (β c-PAP): studies in a murine *in vivo* Model. *Mol. Ther.*, 2008, Vol. 16, no. 4, pp. 757-764.
93. Kobayashi N., Saeki K., Yuo A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce cell cycle progression through the synthesis of c-Myc protein by internal ribosome entry site-mediated translation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway in human factor-dependent leukemic cells. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 9, pp. 3186-3195.
94. Korzenik J.R., Dieckgraefe B.K., Valentine J.F., Hausman D.F., Gilbert M.J., Sargramostim in Crohn's disease study group. Sargramostim for active Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.*, 2005, Vol. 352, no. 21, pp. 2193-2201.
95. Kowanko I.C., Ferrante A., Harvey D.P., Carman K.L. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments neutrophil killing of *Torulopsis glabrata* and stimulates neutrophil respiratory burst and degranulation. *Clin. Exp. Immunol.*, 1991, Vol. 83, pp. 225-230.
96. Krausgruber T., Blazek K., Smallie T., Alzabin S., Lockstone H., Sahgal N., Hussell T., Feldmann M., Udalova I.A. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 3, pp. 231-238.
97. Kutsuna H., Suzuki K., Kamata N., Kato T., Hato F., Mizuno K., Kobayashi H., Ishii M., Kitagawa S. Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by TNF, GM-CSF, and G-CSF: the role of MAP kinases. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004, Vol. 286, no. 1, pp. 55-64.

98. Lane T.A., Law P., Maruyama M., Young D., Burgess J., Mullen M., Mealiffe M., Terstappen L.W., Hardwick A., Moubayed M. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood*, 1995, Vol. 85, no. 1, pp. 275-282.
99. Lang R.A., Metcalf D., Cuthbertson R.A., Lyons I., Stanley E., Kelso A., Kannourakis G., Williamson D.J., Klintworth G.K., Gonda T.J. Transgenic mice expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage. *Cell*, 1987, Vol. 51, no. 4, pp. 675-686.
100. Lee F., Yokota T., Otsuka T., Gemmell L., Larson N., Luh J., Arai K., Rennick D. Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1985, Vol. 82, no. 13, pp. 4360-4364.
101. Lee A.Y., Chung H.K., Bae E.K., Hwang J.S., Sung B.W., Cho C. W., Kim J., Lee K., Han J.Y., Lee C., Youn H.J. A recombinant human G-CSF/GM-CSF fusion protein from E. coli showing colony stimulating activity on human bone marrow cells. *Biotechnol. Lett.*, 2003, Vol. 25, no. 3, pp. 205-211.
102. Leukine. Prescribing information. 2013. URL: <http://products.sanofi.us/Leukine/Leukine.html> Accessed on September 2013.
103. Li N., Yu Y.Z., Yu W.Y., Sun Z.W. Enhancement of the immunogenicity of DNA replicon vaccine of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A by GM-CSF gene adjuvant. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2011, no. 33, pp. 211-219.
104. Lilly M.B., Zemskova M., Frankel A.E., Salo J., Kraft A.S. Distinct domains of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit mediate activation of Jak/Stat signalling and differentiation. *Blood*, 2001, Vol. 97, pp. 1662-1670.
105. Liontos L.M., Dissanayake D., Ohashi P.S., Weiss A., Dragone L.L., McGlade C.J. The Src-like adaptor protein regulates GM-CSFR signalling and monocytic dendritic cell maturation. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, pp. 1923-1933.
106. Lu H., Xing Z., Brunham R.C. GM-CSF transgene-based adjuvant allows the establishment of protective mucosal immunity following vaccination with inactivated *Chlamydia trachomatis*. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, pp. 6324-6331.
107. Lutz E., Yeo C.J., Lillemoe K.D., Biedrzycki B., Kobrin B., Herman J., MSc Sugar E., Piantadosi S., Cameron J.L., Solt S., Onners B., Tartakovsky I., Choi M., Sharma R., Illei P.B., Ralph H.H., Abrams R.A., Le D., Elizabeth J., Laheru D. A lethally irradiated allogeneic granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreting tumor vaccine for pancreatic adenocarcinoma: a phase II trial of safety, efficacy, and immune activation. *Ann. Surg.*, 2011, Vol. 253, no. 2, pp. 328-335.
108. Marlow N., Morris T., Brocklehurst P., Carr R., Cowan F.M., Patel N., Petrou S., Redshaw M.E., Modi N., Dore C. A randomised trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neonatal sepsis: outcomes at 2 years. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, 2013, Vol. 98, no. 1, pp. 46-53.
109. Martinez-Moczygemba M., Doan M.L., Elidemir O., Fan L.L., Cheung S.W., Lei J.T., Moore J.P., Tavana G., Lewis L.R., Zhu Y., Muzny D.M., Gibbs R.A., Huston D.P. Pulmonary alveolar proteinosis caused by deletion of the GMCSFR(alpha) gene in the X chromosome pseudoautosomal region 1. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, pp. 2711-2716.
110. Matsuguchi T., Zhao Y., Lilly M., Kraft A.S. The cytoplasmic domain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GMCSF) receptor subunit is essential for both GM-CSF-mediated growth and differentiation. *J. Biol. Chem.*, 1997, Vol. 272, pp. 17450-17459.
111. McClure B.J., Hercus T.R., Cambareri B.A., Woodcock J.M., Bagley C.J., Howlett G.J., Lopez A.F. Molecular assembly of the ternary granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor complex. *Blood*, 2003, Vol. 101, pp. 1308-1315.
112. McCormick S., Santosuosso M., Zhang X.Z., Xing Z. Manipulation of dendritic cells for host defence against intracellular infections. *Biochem. Soc. Trans.*, 2006, Vol. 34, pp. 283-286.
113. Mera S., Tatulescu D., Cismaru C., Bondor C., Slavcovici A., Zanc V., Carstina D., Oltean M. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS*, 2011, Vol. 119, pp. 155-163.
114. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*, 2008, Vol. 111, pp. 485-491.
115. Miah M.A., Yoon C.H., Kim J., Jang J., Seong Y.R., Bae Y.S. CISH is induced during DC development and regulates DC-mediated CTL activation. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, pp. 58-68.
116. Moldenhauer L.M., Keenihan S.N., Hayball J.D., Robertson S.A. GM-CSF is an essential regulator of T cell activation competence in uterine dendritic cells during early pregnancy in mice. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, pp. 7085-7096.
117. Molineux G. Granulocyte colony-stimulating factors. *Cancer Treat. Res.*, 2011, Vol. 157, pp. 33-53.
118. Mollah Z.U., Aiba S., Nakagawa S., Mizuashi M., Ohtani T., Yoshino Y., Tagami H. Interleukin-3 in cooperation with transforming growth factor beta induces granulocyte macrophage colony stimulating factor independent differentiation of human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells into dendritic cells with features of langerhans cells. *J. Invest. Dermat.*, 2003, Vol. 121, no. 6, pp. 1397-1401.
119. Morstyn G., Burgess A.W. Hemopoietic growth factors: a review. *Cancer Res.*, 1988, Vol. 48, pp. 5624-5637.

120. Mudzinski S.P., Christian T.P., Guo T.L., Cirenza E., Hazlett K.R., Gosselin E.J. Expression of HLA-DR (major histocompatibility complex class II) on neutrophils from patients treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for mobilization of stem cells. *Blood*, 1995, Vol. 86, pp. 2452-2453.
121. Nambiar J.K., Ryan A.A., Kong C.U., Britton W.J., Triccas J.A. Modulation of pulmonary DC function by vaccine-encoded GM-CSF enhances protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 1, pp. 153-161.
122. Newman S.L., Gootee L. Colony-stimulating factors activate human macrophages to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum* yeasts. *Infect. Immun.*, 1992, Vol. 60, no. 11, pp. 4593-4597.
123. Olivares J., Kumar P., Yu Y., Maples P.B., Senzer N., Bedell C., Barve M., Tong A., Pappen B.O., Kuhn J., Magee M., Wallraven G., Nemunaitis J. Phase I trial of TGF-(beta)2antisense GM-CSF gene-modified autologous tumor cell (TAG) vaccine. *Clin. Cancer Res.*, 2011, Vol. 17, no. 1, pp. 183-192.
124. O'Mahony D.S., Pham U., Iyer R., Hawn T.R., Liles W.C. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int. J. Med. Sci.*, 2008, Vol. 5, no. 1, pp. 1-8.
125. Oren H., Erbay A.R., Balci M., Cehreli S. Role of novel biomarkers of inflammation in patients with stable coronary heart disease. *Angiology*, 2007, Vol. 58, no. 2, pp. 148-155.
126. Page A.V., Liles W.C. Colony-stimulating factors in the prevention and management of infectious diseases. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 2011, Vol. 25, no. 4, pp. 803-817.
127. Paine R.3rd, Wilcoxon S.E., Morris S.B., Sartori C., Baleeiro C.E., Matthay M.A., Christensen P.J. Transgenic overexpression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in the lung prevents hyperoxic lung injury. *Am. J. Pathol.*, 2003, Vol. 163, no. 6, pp. 2397-2406.
128. Peelen E., Muris A.H., Damoiseaux J., Knippenberg S., Broens K., Smolders J., Cohen Tervaert J.W., Hupperts R., Thewissen M. GM-CSF production by CD4⁺ T cells in MS patients: Regulation by regulatory T cells and vitamin D. *J. Neuroimmunol.*, 2015, no. 280, pp. 36-42.
129. Perricone R., de Carolis C., Giacomelli R., Guarino M.D., De Sanctis G., Fontana L. GM-CSF and pregnancy: evidence of significantly reduced blood concentrations in unexplained recurrent abortion efficiently reverted by intravenous immunoglobulin treatment. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2003, Vol. 50, no. 3, pp. 232-237.
130. Raines M.A., Liu L., Quan S.G., Joe V., DiPersio J.F., Golde D.W. Identification and molecular cloning of a soluble human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1991, no. 88, pp. 8203-8207.
131. Robertson S.A., Seemark R.F., Guilbert L.J., Wegmann T.G. The role of cytokines in gestation. *Crit. Rev. Immunol.*, 1994, Vol. 14, no. 3-4, pp. 239-292.
132. Roilides E., Blake C., Holmes A., Pizzo P.A., Walsh T.J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma prevent dexamethasone-induced immunosuppression of antifungal monocyte activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1996, Vol. 34, no. 1, pp. 63-69.
133. Roilides E., Mertins S., Eddy J., Walsh T.J., Pizzo P.A., Rubin M. Impairment of neutrophil chemotactic and bactericidal function in children infected with human immunodeficiency virus type 1 and partial reversal after *in vitro* exposure to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Pediatr.*, 1990, Vol. 117, no. 4, pp. 531-540.
134. Ryan A.A., Wozniak T.M., Shklovskaya E., O'Donnell M.A., de St Groth B.F., Britton W.J., Triccas J.A. Improved protection against disseminated tuberculosis by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin secreting murine GM-CSF is associated with expansion and activation of APCs. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 12, pp. 18-24.
135. Saitoh T., Kishida H., Tsukada Y., Fukuma Y., Sano J., Yasutake M., Fukuma N., Kusama Y., Hayakawa H. Clinical significance of increased plasma concentration of macrophage colony-stimulating factor in patients with angina pectoris. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2000, Vol. 35, no. 3, pp. 655-665.
136. Sawada M., Itoh Y., Suzumura A., Marunouchi T. Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells. *Neurosci. Lett.*, 1993, Vol. 160, no. 2, pp. 131-134.
137. Scarpellini F., Sbracia M. Effectiveness of GM-CSF 1 in the treatment of habitual abortion in a controlled study. *Fertil. Steril.*, 2003, Vol. 80, Suppl. 3, 288. doi: 10.1016/S0015-0282(03)01737-0.
138. Schadendorf D. Melanoma vaccines. *Drug News Perspect.*, 2000, Vol. 13, no. 2, pp. 85-90.
139. Schiffman K., Disis M.L. HER-2/neu peptide- based vaccines, with GM-CSF as an adjuvant, in patients with advanced-stage HER2/neu-expressing cancers. *Clin. Lung Cancer*, 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 74-77.
140. Schneeberger A., Luhers P., Kutil R., Steinlein P., Schild H., Schmidt W., Stingl G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-based melanoma cell vaccines immunize syngeneic and allogeneic recipients via host dendritic cells. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 10, pp. 5180-5187.
141. Schweizerhof M., Stosser S., Kurejova M., Njoo C., Gangadharan V., Agarwal N., Schmelz M., Bali K.K., Michalski C.W., Brugger S., Dickenson A., Simone D.A., Kuner R. Hematopoietic colony-stimulating factors mediate tumor-nerve interactions and bone cancer pain. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, no. 7, pp. 802-807.
142. Selgas R., Fernández de Castro M., Jiménez C., Selgas R., Cárcamo C., Contreras T., Bajo M.A., Vara F., Corbí A. Immunomodulation of peritoneal macrophages by granulocyte granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in humans. *Kidney Int.*, 1996, Vol. 50, no. 6, pp. 2070-2078.

143. Sheridan J.W., Metcalf D. A low molecular weight factor in lung-conditioned medium stimulating granulocyte and monocyte colony formation *in vitro*. *J. Cell. Physiol.*, 1973, Vol. 81, no. 1, pp. 11-23.
144. Shuai K., Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature*, 2003. Vol. 3, no. 11, pp. 900-911.
145. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 3, pp. 787-795.
146. Slingluff C.L., Petroni G.R., Yamshchikov G.V., Barnd D.L., Eastham S., Galavotti H., Patterson J.W., Deacon D.H., Hibbitts S., Teates D., Neese P.Y., Grosh W.W., Chianese-Bullock K.A., Woodson E.M.H., Wiernasz C.J., Merrill P., Gibson J., Ross M., Engelhard V.H. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J. Clin. Oncol.*, 2003, Vol. 21, no. 21, pp. 4016-4026.
147. Sonderegger I., Iezzi G., Maier R., Schmitz N., Kurrer M., Kopf M. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 10, pp. 2281-2294.
148. Spandorfer S.D., Barmat L.I., Liu H.C., Mele C., Veeck L., Rosenwaks Z. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by autologous endometrial co-culture is associated with outcome for *in vitro* fertilization patients with a history of multiple implantation failures. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1998, Vol. 40, no. 5, pp. 377-381.
149. Staff C., Mozaffari F., Haller B.K., Wahren B., Liljefors M. A Phase I safety study of plasmid DNA immunization targeting carcinoembryonic antigen in colorectal cancer patients. *Vaccine*, 2011, Vol. 29, no. 39, pp. 6817-6822.
150. Steinwede K., Tempelhof O., Bolte K., Maus R., Bohling J., Ueberberg B., Länger F., Christman J.W., Paton J.C., Ask K., Maharaj S., Kolb M., Gauldie J., Welte T., Maus U.A. Local delivery of GM-CSF protects mice from lethal pneumococcal pneumonia. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 10, pp. 5346-5356.
151. Stösser S., Schweizerhof M., Kuner R. Hematopoietic colony-stimulating factors: new players in tumor-nerve interactions. *J. Mol. Med.*, 2011, Vol. 89, no. 4, pp. 321-329.
152. Sugiyama Y., Yagita Y., Oyama N., Terasaki Y., Omura-Matsuoka E., Sasaki T., Kitagawa K. Granulocyte colony-stimulating factor enhances arteriogenesis and ameliorates cerebral damage in a mouse model of ischemic stroke. *Stroke*, 2011, Vol. 42, no. 3, pp. 770-775.
153. Sun X., Hodge L.M., Jones H.P., Tabor L., Simecka J.W. Co-expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with antigen enhances humoral and tumor immunity after DNA vaccination. *Vaccine*, 2002, Vol. 20, no. 9-10, pp. 1466-1474.
154. Szeliga J., Daniel D.S., Yang C.-H., Sever-Chroneos Z., Jagannath C., Chrones Z.C. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated innate responses in tuberculosis. *Tuberculosis*, 2008, Vol. 88, no. 1, pp. 7-20.
155. Takahashi G.W., Andrews 3rd D.F., Lilly M.B., Singer J.W., Alderson M.R. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes. *Blood*, 1993, Vol. 81, no. 2, pp. 357-364.
156. Tanimoto A., Murata Y., Wang K.Y., Tsutsui M., Kohno K., Sasaguri Y. Monocyte chemoattractant protein-1 expression is enhanced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via Jak2-Stat5 signalling and inhibited by atorvastatin in human monocytic U937 cells. *J. Biol. Chem.*, 2008, Vol. 283, no. 8, pp. 4643-4651.
157. Tazawa R., Trapnell B.C., Inoue Y., Arai T., Takada T., Nasuhara Y. Inhaled granulocyte/macrophage-colony stimulating factor as therapy for pulmonary alveolar proteinosis. *Am. J. Respir. Crit. Care*, 2010, Vol. 181, no. 12, pp. 1345-1354.
158. Tisato V., Secchiero P., Rimondi E., Ganesini S., Menegatti E., Casciano F., Zamboni P., Zauli G. GM-CSF Exhibits Anti-Inflammatory Activity on Endothelial Cells Derived from Chronic Venous Disease Patients. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 561689. doi: 10.1155/2013/561689.
159. Tu J., Karasavvas N., Heaney M.L., Vera J.C., Golde D.W. Molecular characterization of a granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit-associated protein, GRAP. *Blood*, 2000, Vol. 96, no. 3, pp. 794-799.
160. Ueno H., Klechevsky E., Morita R., Cao T., Matsui T., Di Pucchio T., Connolly J., Fay J.W., Pascual V., Palucka A.K., Banchereau J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.*, 2007, Vol. 219, pp. 118-142.
161. Vadhan-Raj S., Keating M., LeMaistre A., Hittelman W.N., McCredie K., Trujillo J.M., Broxmeyer H.E., Henney C., Gutterman J.U. Effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.*, 1987, Vol. 317, no. 25, pp. 1545-1552.
162. Valentine J.F., Fedorak R.N., Feagan B., Fredlund P., Schmitt R., Ni P., Humphries T.J. Steroid-sparing properties of sargramostim in patients with corticosteroid dependent Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Gut*, 2009, Vol. 58, no. 10, pp. 1354-1362.
163. van Nieuwenhuijze A., Koenders M., Roeleveld D., Sleeman M.A., van den Berg W., Wicks I. P. GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Mol. Immunol.*, 2013, Vol. 56, no. 4, pp. 675-682.
164. Vogela D., Glima J. E., Stavenhagen A., Breura M., Heijne P., Amor S., Dijkstra C.D., Beelen R.H.J. Department Human macrophage polarization *in vitro*: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 2014, Vol. 219 no. 9, pp. 695-703.

165. Wang J., Zganiacz A., Xing Z. Enhanced immunogenicity of BCG vaccine by using a viral-based GM-CSF transgene adjuvant formulation. *Vaccine*, 2002, Vol. 20, no. 23-24, pp. 2887-2898.
166. Wang L., Qi X., Sun Y., Liang L., Ju D. Adenovirus-mediated combined P16 gene and GM-CSF gene therapy for the treatment of established tumor and induction of antitumor immunity. *Cancer Gene Ther.*, 2002, Vol. 9, no. 10, pp. 819-824.
167. Wang L., Miyahara Y., Kato T., Wang L., Aota T., Kuribayashi K., Shiku H. Essential roles of tumor-derived helper T-cell epitopes for an effective peptide-based tumor vaccine. *Cancer Immun.*, 2003, Vol. 3, no. 1, pp. 3-16.
168. Wang H., Zhang G., Wen Y., Yang S., Xia X., Fu Z.F. Intracerebral administration of recombinant rabies virus expressing GM-CSF prevents the development of rabies after infection with street virus. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 9, e25414. doi: 10.1371/journal.pone.0025414.
169. Wang H., Wen Y., Polan M.L., Boostanfar R., Feinman M., Behr B. Exogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes follicular development in the newborn rat *in vivo*. *Hum. Reprod.*, 2005, Vol. 20, no. 10, pp. 2749-2756.
170. Wurfel W. G-CSF and GM-CSF: Clinical applications in reproductive medicine. In: *in vitro* fertilization. A textbook of current and emerging methods and devices / By ed. Z.P. Nagy, A.C. Varghese, A. Agarwal. Switzerland AG: Springer Nature 2019, pp. 751-763.
171. Xing Z., Braciak T., Ohkawara Y., Sallenave J.M., Foley R., Sime P.J., Jordana M., Graham F.L., Gauldie J. Gene transfer for cytokine functional studies in the lung: the multifunctional role of GM-CSF in pulmonary inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 1996, Vol. 59, no. 4, pp. 481-488.
172. Zhao Y., Chegini N. The expression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and receptors in human endometrium. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1999, Vol. 42, no. 5, pp. 303-311.
173. Zhang Y., Cheng S., Zhang M., Zhen L., Pang D., Zhang Q., Li Z. High-infiltration of tumor-associated macrophages predicts unfavorable clinical outcome for node-negative breast cancer. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 9, e76147. doi: 10.1371/journal.pone.0076147.
174. Zhang X., Divangahi M., Ngai P., Santosuosso M., Millar J., Zganiacz A., Wang J., Bramson J., Xing Z. Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene. *Vaccine*, 2007, Vol. 25, no. 7, pp. 1342-1352.

Авторы:

Зурочка А.В. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург; профессор кафедры «Пищевые биотехнологии», заведующий лабораторией иммунобиотехнологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Зурочка В.А. — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург; профессор кафедры «Пищевые биотехнологии», старший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Authors:

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg; Professor, Department of Food Biotechnology, Head, Laboratory of Immunobiotechnology, South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

Zurochka V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg; Professor, Department of Food Biotechnology, Senior Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

Добрынина М.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Dobrynina M.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Гриценко В.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Оренбург, Россия

Gritsenko V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Поступила 28.02.2021
Отправлена на доработку 25.04.2021
Принята к печати 18.05.2021

Received 28.02.2021
Revision received 25.04.2021
Accepted 18.05.2021

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИММУНОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ПАРОДОНТИТА

Антонов И.И.¹, Мудров В.П.^{2,3}, Нелюбин В.Н.⁴, Мураев А.А.¹,
Иванов С.Ю.^{1,5}

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

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГБУ «9 лечебно-диагностический центр» Министерства обороны РФ, Москва, Россия

⁴ Научно-исследовательский медико-стоматологический институт ФГБОУ ВО «Московский
государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова», Москва, Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Доказанным фактом считается нарушение иммунологической реактивности при воспалительных заболеваниях пародонта. С целями иммуномодуляции в отечественной стоматологической практике применяются различные природные, в том числе модифицированные, рекомбинантные, генно-инженерные и синтетические препараты, различающиеся по действию на врожденную и адаптивную иммунную систему. В клиническом применении нашли свое место как комплексные препараты природных цитокинов, так и генно-инженерные препараты IL-1, IL-2, факторов роста, IFN α , IFN β , IFN γ . Включение интерферона, препаратов-индукторов интерферона в комплексную терапию генерализованного пародонтита, повышает устойчивость к вирусной составляющей микробиоты полости рта. Для регенерации тканей в пародонтологии и челюстно-лицевой хирургии успешно применяются факторы роста (тромбоцитарный фактор роста, фактор роста фибробластов, фактор роста эндотелия и др.). Перспективными являются работы по индукции врожденного иммунитета. В экспериментальной работе было показано, что местное введение Toll-подобного рецептора-9 и лиганда CD40 может уменьшить лигатурное воспаление пародонта и потерю костной массы у мышей при индукции пролиферации В-клеток и повышении экспрессии мРНК IL-10. Перспективное направление в разработке новых биологически активных препаратов — нанотехнологии, связанные с созданием композитов наночастиц металлов с полимерами, факторами роста и локальное применение этих средств. Общие ограничения всех факторов роста — чрезвычайно короткие периоды биологической активности и заданная продолжительность локальных эффективных концентраций. Поэтому важно разработать систему доставки лекарственных средств с использованием соответствующих каркасных элементов, позволяющих препарату действовать локально в течение определенного периода времени. В эксперименте хорошо себя показали альгинатные гидрогели, локально доставляющие гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и стромальный лимфопоэтин тимуса. Новая иммуномодулирующая стратегия регенерации альвеолярной кости нацелена на макрофаги.

Адрес для переписки:

Мудров Валерий Павлович
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия
непрерывного профессионального образования»
Министерства здравоохранения РФ
125993, Россия, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1.
Тел.: 8 (916) 174-44-77.
E-mail: vpmudrov@yandex.ru

Address for correspondence:

Mudrov Valery P.
Russian Medical Academy of Postgraduate Education
125993, Russian Federation, Moscow,
Barrikadnaya str., 2/1, bldg 1.
Phone: 7 (916) 174-44-77.
E-mail: vpmudrov@yandex.ru

Образец цитирования:

И.И. Антонов, В.П. Мудров, В.Н. Нелюбин,
А.А. Мураев, С.Ю. Иванов «Современные возможности
и перспективы иммуотропной терапии хронического
генерализованного пародонтита» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1055–1068.
doi: 10.15789/1563-0625-COA-2156

© Антонов И.И. и соавт., 2021

For citation:

I.I. Antonov, V.P. Mudrov, V.N. Nelyubin, A.A. Muraev,
S.Yu. Ivanov "Current opportunities and perspectives of
immunotropic therapy in chronic generalized periodontitis",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1055–1068.
doi: 10.15789/1563-0625-COA-2156

DOI: 10.15789/1563-0625-COA-2156

Биоинспирированная инъекционная микросфера из модифицированных гепарином желатиновых нановолокон, имитирующих архитектуру естественного костного экстрацеллюлярного матрикса и обеспечивающих остеокондуктивное микроокружение для костных клеток, включает IL-4, имеющий домены связи с гепарином. Такие лекарственные средства входят в состав комплексного лечения и следует проводить оценку иммунного статуса до и после терапии. Таким образом, прогресс знаний о развитии врожденного и приобретенного иммунного ответа при воспалительных заболеваниях и, в частности, при патологии пародонта, позволяет разрабатывать новые подходы, методы лечения для повышения эффективности комплексной терапии пародонтита.

Ключевые слова: челюстно-лицевая хирургия, пародонтит, иммуотропные препараты, иммуномодуляторы, цитокины, факторы роста, гидрогели, способ доставки лекарственных средств

CURRENT OPPORTUNITIES AND PROSPECTIVES OF IMMUNOTROPIC THERAPY IN CHRONIC GENERALIZED PERIODONTITIS

Antonov I.I.^a, Mudrov V.P.^{b,c}, Nelyubin V.N.^d, Muraev A.A.^a,
Ivanov S.Yu.^{a,e}

^a Russian University of the People Friendship, Moscow, Russian Federation

^b Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation

^c 9th Clinical and Diagnostic Center, Moscow, Russian Federation

^d Research Medical and Dental Institute, A. Evdokimov Moscow State Medical and Dental University, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Impairment of immunological reactivity in inflammatory periodontal diseases is well proven. To perform immunomodulatory treatment in domestic dental practice, various medications are used, including natural, chemically modified, recombinant, genetically engineered and synthetic substances, which differ in their effects upon innate and adaptive immune systems. Complex preparations of natural cytokines as well as genetically engineered preparations of IL-1, IL-2, growth factors, IFN α , IFN β , IFN γ are applied in clinical settings. Clinical implementation of interferon and interferon inducers in combined therapy of generalized periodontitis is shown to increase resistance to viral components of the oral microbiota. Growth factors (platelet growth factor, fibroblast growth factor, endothelial growth factor, etc.) are successfully used for tissue regeneration in periodontics and maxillofacial surgery. Experimental studies have shown that local administration of toll-like receptor-9 and CD40 ligand may reduce periodontal ligature inflammation and bone loss in mice by inducing B-cell proliferation and increasing IL-10 mRNA expression. Promising results in development of new biologically active drugs are obtained with nanotechnology approaches, i.e., production of composite materials of metal nanoparticles with polymers, growth factors, and local application of these products. General limitations of all these growth factors include extremely short periods of biological activity, and adjusted duration of local effective concentrations. Therefore, it is important to develop a drug delivery system using appropriate scaffolding elements thus allowing local effects of the drug for a certain period of time. In experimental models, alginate hydrogels performed well upon local delivery of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and stromal lymphopoietin of the thymus. A new immunomodulatory strategy for alveolar bone regeneration targets macrophages. A biologically functionalized injectable microsphere of heparin-modified gelatin nanofibers that mimic the architecture of the natural bone extracellular matrix, and provide an osteoconductive microenvironment for bone cells includes IL-4, which has heparin-binding domains. These medications represent a component of a comprehensive treatment schedule, and should be evaluated for immune status before and after therapy. Thus, recent advances in studies of innate and acquired immune responses in inflammatory diseases and, in particular, in periodontal disorders, allows us to develop new approaches and methods of treatment in order to improve efficiency of complex therapy in the inflammatory periodontal diseases.

Keywords: maxillofacial surgery, periodontitis, immunotropic drugs, immunomodulators, cytokines, growth factors, hydrogels, drug delivery route

Введение

Современные патологии характеризуются ростом заболеваний, сопряженных с вторичными иммунопатологиями [7]. Развитие медицины привело к пониманию, что многие болезни являются причиной или следствием иммунологических нарушений, способствующих хронизации основного заболевания и возникновению осложнений [41, 63]. Это проявляется в заболеваниях дыхательного, желудочно-кишечного, урогенитального трактов, кожи, носящих вялотекущий, рецидивирующий инфекционно-воспалительный характер. Доказанным фактом считается развитие иммунопатологического процесса при воспалительных заболеваниях пародонта (ВЗП) [7, 49, 63]. Применение антибактериальных лекарственных средств бывает малоэффективным, а полное излечение пациентов без применения иммунокорректирующих средств становится затруднительным. Очевидно, что без воздействия на иммунологическую реактивность будет сложно получить адекватный терапевтический эффект при хронических инфекционно-воспалительных процессах.

Использование иммуотропных препаратов в комплексной терапии заболеваний пародонта широко применяется на протяжении более чем 30 лет. Применение таких лекарственных средств — важный метод коррекции иммунитета.

Способы воздействия на иммунитет исчисляются сотнями. Так, метод удаления зубного налета и камня “Full-mouth scaling and root planing” (FM-SRP), обеспечивающего чистку до самого дна пародонтального кармана, относят к методам стимуляции факторов местного иммунитета. Исследователями было показано, что применение технологии FM-SRP через 6 недель после лечения привело к значительному улучшению клинических показателей, снижению количества пародонтопатогенных бактерий, при этом в десневой жидкости было отмечено увеличение высокочувствительного С-реактивного белка, IL-5, IL-6, TNF α , значительное увеличение IFN γ и небольшое увеличение IL-12p70 [57].

Но следует заметить, что иммуотропные лекарственные препараты действуют на иммунную систему и ее ответ избирательно. А в целом иммуномодуляторы, как биологически активные вещества, влияют на иммунитет двояко: усиливают функции иммунной системы (иммуностимуляторы) или подавляют иммунный ответ (иммунодепрессанты) [27]. В качестве примера плейотропности можно привести действие модуляторов метилирования ДНК на синовиальные фибробласты больных ревматоидным артритом *in vitro* [28]. В такой ситуации анализ иммунопато-

логических состояний — важный признак квалифицированного лечения [3, 7, 9, 13, 18, 63].

На текущий момент предложен широкий спектр иммуотропных препаратов, в который входят иммуномодуляторы разнонаправленного действия на иммунную систему, иммуностимуляторы, иммуносупрессоры [4, 21]. С современных позиций классификация иммуномодуляторов по происхождению более информативна, нежели по химической структуре, так как препараты одной и той же химической группы (белки, пептиды, низкомолекулярные соединения и т.д.) могут обладать совершенно различной биологической активностью. По этому признаку можно выделить следующие группы иммуностимуляторов:

- природные, в том числе модифицированные, микробные, растительные, человеческие;
- аналоги природных соединений, полученные путем химического синтеза;
- аналоги природных соединений, полученные с помощью рекомбинантных технологий;
- синтетические соединения, не имеющие аналогов в живой природе [4].

С позиции терапии важнее принцип действия на иммунную систему. В таком случае иммуотропные препараты подразделяются следующим образом:

- с преимущественной активностью в отношении врожденной иммунной системы;
- с преимущественной активностью в отношении адаптивной иммунной системы;
- с активностью в отношении обоих компонентов иммунной системы;
- с механизмом действия, не связанным с первичной активацией каких-либо рецепторов или сигнальных путей (антиоксиданты и детоксиканты);
- с неуточненным механизмом действия [4].

Синтетические иммуотропные лекарственные средства — соединения, не имеющие аналогов в живой природе

К синтетическим иммуотропным лекарственным средствам, не имеющим аналогов в живой природе, относится полимерный препарат полиоксидоний, полученный с помощью направленного химического синтеза. При использовании препарата «Полиоксидоний» в пародонтологической практике указывалось на четкую тенденцию к увеличению CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. В то же время уровень в крови CD16⁺ лимфоцитов снижался. Значения IgA превышали показатели в группе сравнения. У всех пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени до лечения было отмечено повышение уровня цитокинов IL-10, TNF α [9].

Другим препаратом такого класса, используемым в комплексной терапии хронического генерализованного пародонтита, стал иммуномодулятор «Гепон» с доказанной эффективностью в восстановлении баланса цитокинов в пародонтальных карманах. Локальное применение «Гепона» позволило ускорить послеоперационную реабилитацию больных и добиться стабильной ремиссии через 6 месяцев наблюдения при пародонтите средней степени тяжести [12].

Природные иммуностропные лекарственные средства

К природным иммуностропным лекарственным средствам относятся препараты растительного, бактериального, грибкового происхождения, в том числе модифицированные человеческие.

Большинство препаратов микробного происхождения (пирогенал, продионозан, нуклеинат натрия, рибомунил, бронхомунал пирогенал и др.) обладают способностью усиливать функциональную активность нейтрофилов и макрофагов [4]. Но главной мишенью действия препаратов бактериального происхождения служат в основном клетки моноцитарно-макрофагальной звена, которые, активируясь, начинают синтезировать ряд цитокинов, активизирующих Т- и В-клетки адаптивного иммунитета [4].

Подход к использованию иммуномодуляторов микробного происхождения является патогенетически обоснованным в иммунокоррекции антиинфекционной направленности. Одним из таких препаратов является рибомунил [20]. Рибомунил — рибосомально-протеогликановый комплекс, содержащий в своем составе рибосомы *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, мембранные протеингликаны. Другой аналогичный препарат — «Максилак», содержащий в своем составе компоненты *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* [2]. Было показано, что при генерализованном пародонтите уровень sIgA возрастал в 1,93 раза, уровень IL-2 возрастал в 2,05 раза, уровень IL-6 снижался в 1,98 раза [20].

Действие препарата «Имудон» из лиофилизата отдельных бактерий зубной бляшки связано с повышением активности лизоцима и фагоцитоза, продукции антител и sIgA, а также численности и активности иммунокомпетентных клеток [22, 26].

С целями иммуномодуляции в отечественной стоматологической практике применяются фитопрепараты [1, 17]. «Инсадол», действующим началом которого являются фитостероиды, после оперативного вмешательства на пародон-

те способствует увеличению уровня лизоцима слюны, нормализации уровня комплемента и лизоцима, повышению функциональной активности нейтрофилов, увеличению количества Т-лимфоцитов, стимулирует репаративный остеогенез [17].

Также из фитопрепаратов используются «Тонзинал», пластины «ЦМ». Было показано, что их использование способствует повышению уровня секреторного и сывороточного IgA, при этом нормализуется неспецифическая резистентность тканей ротовой полости за счет увеличения уровня активности лизоцима. Стойкость капилляров десны повышалась за счет снижения проницаемости стенок капилляров [1].

Иммуностропные лекарственные средства эндогенного происхождения

Для профилактики и лечения вторичных иммунодефицитов из иммуностропных лекарственных средств эндогенного происхождения применяются препараты, полученные из центральных органов иммунной системы (тимуса, костного мозга) и цитокины.

При генерализованном хроническом пародонтите средней и тяжелой форм применяют Т-активин, оказывающий нормализующее влияние на Т-клетки. Назначение позволяет добиться длительной более 12 месяцев клинической ремиссии [4].

Клиническая эффективность тимических препаратов первого поколения не вызывает сомнения, но у них есть недостаток, связанный с особенностями производства и стандартизации. Поэтому следующим шагом стало выделение одного из активных фрагментов тимопоэтина и создание препарата иммунофан [4]. Изучение механизма действия показало, что иммунофан оказывает иммуномодулирующее действие на продукцию TNF, т.е. повышает пониженное и понижает повышенное его образование. Это обусловило применение иммунофана как высокоэффективного средства при хронических бактериальных и вирусных инфекциях [20].

Экспериментальное изучение антиагрегационной активности иммуномодулятора иммунофана установило, что иммунофан не только нормализует иммунную систему, но и угнетает функциональную способность тромбоцитов к склеиванию и может предотвращать нарушения микроциркуляции, возникающие при пародонтите, что позволяет повысить эффективность комплексного лечения данной патологии зубочелюстной системы [14].

Другим ИТЛС, применяемым в стоматологической практике, является миелопид, также полученный из костного мозга. Миелопид используется для активации гуморального звена иммунитета,

усиления синтеза антибактериальных антител на высоте воспалительного процесса [5, 10].

Необходимость разработки новых подходов в применении иммуотропной терапии заболеваний полости рта является побудительным моментом в проведении экспериментов на животных. Так, применение иммуноглобулинов яичного желтка птиц в экспериментальной модели пародонтита на крысах, обусловленного *P. gingivalis*, показало ингибирующее влияние на развитие процесса. В ходе эксперимента клинические показатели улучшились. Уровни IL-6 и TNF α были значительно снижены ($p < 0,05$). Рентгенография и гистоморфология показали, что интенсивность воспаления пародонта и периодонтит были уменьшены по сравнению с контролем [66].

Цитокины

Цитокины — секретируемые протеины, продуцируемые как клетками иммунной системы, так и другими клетками крови, эндотелия сосудов, нейроэндокринной системы, фибробластами соединительной ткани [4, 76]. Это регуляторы, участвующие в реализации воспалительных реакций, противоопухолевой резистентности, иммунных процессов, оказывающих прямое действие на бактерии и вирусы. На сегодняшний день описано более 200 различных цитокинов: интерлейкины, интерфероны, факторы некроза опухолей, колониестимулирующие факторы, факторы, трансформирующие рост клеток, ростовые факторы [4, 42, 49, 61, 62, 70, 76].

Общие биохимические и функциональные характеристики цитокинов — плеiotропность, взаимозаменяемость, ко-стимулирующий и каскадный характер действия, отсутствие антигенной специфичности. Поэтому, наряду с нервной и гормональной регуляцией, цитокины являются самостоятельной системой регуляции функций организма [4, 27].

Часть цитокинов обладает свойствами стимулировать воспалительные реакции (TNF, IL-1, IL-8, IL-11), другие подавлять (IL-4, IL-6, IL-10), отдельные группы цитокинов семейства TNF, IL-1 участвуют в резорбции костной ткани [4, 39, 46].

В клиническом применении нашли свое место как комплексные препараты природных цитокинов (лейкинферон, суперлимф, мультикаин и др.) [4, 27], так и генно-инженерные препараты IL-1, IL-2 (пролейкин, ронколейкин и др.), колониестимулирующих факторов (лейкомакс, ТФР, рФРФ, VEGF-A и др.), IFN α (реальдирон, интрон-А, бирофор, гриппферон и др.), IFN β (ребиф, ферон и др.), IFN γ (имукин, гаммаферон и др.) [4].

Известно об участии цитокинов в патогенезе различных заболеваний, сопровождающихся воспалительными реакциями. Поэтому в клинической практике необходимо рациональное соче-

тание цитокиновой и антицитокиновой терапии, основанной на контроле цитокинового баланса [4, 6, 7, 11, 15, 19, 23, 24].

Другой важной особенностью цитокиновой терапии является локальное использование, позволяющее создать высокую концентрацию в участке воспаления и запустить каскадный эффект действия. Такой подход обусловлен возможностью локального иммунодефицита в полости рта и в пародонте в отдельности [6]. Так, IL-1 β («Беталейкин») применяется при лечении острых и хронических инфекционно-воспалительных процессов различной этиологии и локализации, в частности в комплексной терапии гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области. В условиях клинического применения под влиянием IL-1 β изменяется спектр синтезируемых цитокинов, активируются макрофаги, НК-клетки, цитолитические Т-клетки [23].

Публикуются результаты использования препаратов, содержащих антитела к провоспалительным цитокинам, например к TNF α . Данные препараты снижают интенсивность воспалительной реакции в тканях пародонта [37].

Суперсемейство TGF- β классифицируется на четыре подгруппы, включающие костные матриксные белки (КМБ), активин, ингибин и TGF- β , с различными функциями, такими как развитие и гомеостаз тканей [67]. Среди них КМБ-2, КМБ-4, КМБ-6 и КМБ-7 оказывают сильное влияние на формирование костной ткани [34, 50].

IL-10 является наиболее важным цитокином в подавлении провоспалительных реакций при всех видах аутоиммунных заболеваний и ограничении чрезмерных иммунных реакций. Семейство цитокинов интерлейкина (IL) -10 включает IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 и IL-26, которые рассматриваются как класс 2 α -спиральных цитокинов. Благодаря гомологии белковой структуры и совместному использованию рецепторных комплексов, а также нисходящего сигнального пути, другие цитокины семейства IL-10 также демонстрируют незаменимые функции в иммунной регуляции, тканевом гомеостазе и защите хозяина [78].

Включение интерферона, препаратов-индукторов интерферона в комплексную терапию генерализованного пародонтита повышает устойчивость к вирусной составляющей микробиоты полости рта [6, 8, 25].

Факторы роста

Факторы роста (ФР) включают нейро-ФР, факторы роста фибробластов (ФРФ); факторы роста гепатоцитов; костные морфогенетические белки (КМБ). ФР, участвующие в регуляции костного метаболизма, включают ФРФ, КМБ, трансформирующий фактор роста бета (TGF- β),

тромбоцитарный фактор роста (ТФР), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и инсулиноподобный фактор роста (IGF) [4].

Показано, что регенерация пародонта зависит от взаимодействия между барьером и факторами роста, клетками и кровоснабжением [38, 68, 69, 72]. Тромбоциты высвобождают пул различных факторов роста, таких как тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF-а), основного фактора роста фибробластов (ФРФ-2), фактора роста гепатоцитов (ФРГ), эпидермальный фактор роста (ЭФР) и инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), которые способствуют регуляции раневого процесса [45].

Фактор роста фибробластов (ФРФ)

ФРФ обладают различной физиологической активностью и образуют семейство, включающее ФРФ-1 и ФРФ-23 [52, 55, 56]. ФРФ-2, ФРФ-9 и ФРФ-18 были впервые идентифицированы в мезенхимальных клетках и остеобластах, агрегированных в эмбриональном периоде, в течение которого ФРФ играют важную роль в развитии скелета. ФРФ обычно действуют как системные или локально циркулирующие молекулы внеклеточного происхождения, которые активируют рецепторы клеточной поверхности [62, 76]. Сигнализация ФРФ играет важную роль в образовании костей и хрящей в периоды развития и роста [52, 53, 56]. ФРФ-2 способствует пролиферации и дифференцировке клеток посредством вазоформирующих процессов. ФРФ-2 способствует ангиогенезу, заживлению ран и восстановлению костей, увеличивает количество остеобластов и хондробластов, индуцирует дифференцировку и пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток, что приводит к регенерации костной ткани [55, 56, 70]. Связка ФРФ/ФРФ-рецептор является важным регулятором остеобластогенеза и контролирует репликацию и дифференцировку остеобластов.

Тромбоцитарный фактор роста

ТФР продуцируются остеобластами и в первую очередь способствуют пролиферации костных клеток и миграции мезенхимальных клеток одновременно. ТФР демонстрируют более слабую стимуляцию костеобразования, чем другие ФР, однако в сочетании с IGF-1 было обнаружено, что он способствует костеобразованию в челюстно-лицевой области [74]. ТФР существуют в виде димерных форм полимеризованных мономеров PDGF-A и PDGF-B, причем наибольшую активность проявляет PDGF-BB. PDGFs действуют на остеобласты, способствуя пролиферации и выработке коллагена, но не дифференцировке остеобластов [34]. Рандомизирован-

ное контролируемое исследование, включавшее 3-летнее наблюдение после операции, показало, что сочетание 0,3 мг/мл rhPDGF-BB (рекомбинантный ТФР) с носителем снижают глубину пародонтального кармана [64].

Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF)

Факторы роста эндотелия (VEGFs) главным образом действуют на эндотелиальные клетки как паракринные факторы, способствуют ангиогенезу, делению клеток, проницаемости сосудов и хемотаксической активности. Как VEGF, так и рецепторы VEGF экспрессируются на остеобластах. VEGF способствует минерализации остеобластов, демонстрируя, что VEGF способствует их дифференцировке [46]. Продукция VEGF в остеобластах усиливается КМБ через митоген-активированный протеинкиназный путь p38; однако повышенная продукция VEGF, индуцированная КМБ, способствует образованию костей за счет усиления ангиогенеза, а не минерализации остеобластов. VEGFs клинически применяются для улучшения ангиогенеза и ишемии тканей при заболеваниях, поражающих нижние конечности [38, 59, 69].

Новое направление в работе с факторами роста — генная инженерия. В экспериментальных работах с помощью плазмидных и вирусных векторов в ткани были доставлены гены факторов роста (VEGF, HGF, ангиопоэтина-1, PDGF и др.), регулирующие регенерацию и ее отдельные звенья: рост нервов и кровеносных сосудов, миграцию эпителия и др. Но в клинических исследованиях только генная терапия с геном фактора роста оказалась малоэффективной для стимуляции регенеративных процессов и формирования ткани, что требовало каскада последовательно переключающихся стимулов. Требуется комбинированная генная терапия несколькими ФР с дополняющими друг друга эффектами. Например, сочетание VEGF165 — активатора ангиогенеза и ангиопоэтина-1 — аттрактанта перicytes и гладкомышечных клеток. Под влиянием VEGF165 происходит активный капиллярогенез, однако многие сформированные сосуды обладают повышенной проницаемостью или быстро разрушаются. Ангиопоэтин-1, сам по себе обладающий очень скромным ангиогенным потенциалом, в комбинации с VEGF165 сыграл роль стабилизатора сосудов и оказался способен уменьшать побочные эффекты монотерапии VEGF. Более того, комбинирование этих генов значительно усилило васкуляризацию регенерирующей ткани по сравнению с каждым из них по отдельности. Но для запуска полноценной регенерации ткани или органа потенциал генной терапии пока ограничен [16].

Инсулиноподобный фактор роста (IGF)

IGF первоначально был идентифицирован как инсулиноподобный фактор роста; однако недавно было обнаружено, что он оказывает различные эффекты на защиту и пролиферацию клеток. IGF усиливает сигнализацию, необходимую для выживания клеток, уменьшает количество ненужного активного кислорода и ингибирует апоптоз [40]. Кроме того, он усиливает клеточный энергетический метаболизм, способствует функциональному росту клеток и нейротрансмиссии дофамина, а следовательно, способствует регенерации нервных клеток [60]. В костных тканях ИФР продуцируется остеобластами и действует через аутокринную/паракринную активность и обильно накапливается в костном матриксе [34, 58].

Таким образом, ФР — это многофакторные белки с широким спектром эффектов, успешно применяющиеся в пародонтологии и челюстно-лицевой хирургии для регенерации тканей [52, 55, 56].

Терапия на основе мезенхимальных стволовых клеток

Связанным с терапией ростовыми факторами является метод, основанный на использовании мезенхимальных стволовых клеток. Такая терапия на основе стволовых клеток может обеспечить метод полного и надежного восстановления тканей, поврежденных заболеваниями пародонта [36]. Интенсивные исследования, проведенные в последнее десятилетие с участием других тканей и органов в организме, показывают, что тканевая инженерия способна регенерировать ткани благоприятным образом [31, 36, 51, 52]. Стволовые клетки периодонтальных связок являются подходящим источником клеток для функциональной регенерации тканей пародонта, поскольку они обладают уникальными регенеративными способностями пародонта [53].

При этом в комбинации со стволовыми клетками используются ростовые факторы. В частности, костный морфогенетический белок 2 из семейства TGF- β использовался для усиления регенерации костей и ускорения репарации костных дефектов нижней челюсти в комбинации с гиалуроновой кислотой [33].

Иммунотропные препараты, действующие на врожденную иммунную систему

Перспективными являются работы по индукции врожденного иммунитета. Проводятся экспериментальные работы по разработке методов модулирования сигнала с Toll-подобных рецепторов на иммунорегуляторные Т- и В-клетки [44]. Так, было продемонстрировано, что местное введение Toll-подобного рецептора 9 (TLR9) — агониста цитидин-фосфат-гуанозин-олигодезоксинуклеотида (CpG ODNs) и лиганда CD40 (CD40L)

может уменьшить лигатурное воспаление пародонта и потерю костной массы у мышей [80]. TLR9 + CpG значительно индуцировал пролиферацию В-клеток, повышал экспрессию мРНК IL-10 и секрецию белка IL-10, но уменьшал популяцию CD1dhiCD5⁺ В-клеток. Местное введение смеси CpG + CD40L значительно уменьшало потерю альвеолярной кости и количество TRAP-позитивных клеток, прилегающих к поверхности альвеолярной кости, и значительно увеличивало экспрессию мРНК в деснах IL-10 и уменьшало экспрессию мРНК RANKL и IFN γ [80].

В недавно опубликованной работе, авторы провели анализ экспериментальных работ по модулированию регуляторных Т-клеток (Tregs) [30]. Основываясь на постулате, что Treg модулируют как врожденный, так и адаптивный иммунитет, авторы указывают на их исключительно важную роль в поддержании самотолерантности и иммунного гомеостаза. Treg — это подмножество CD4⁺Т-лимфоцитов, включающих различные типы Т-клеток с регуляторными функциями, наиболее физиологически релевантная популяция Treg характеризуется как CD4⁺Т-лимфоциты, которые конститутивно экспрессируют α -цепь рецептора IL-2, CD25 и фактор транскрипции FoxP3, составляющий примерно 10% компартмента CD4⁺Т-клеток [30, 32].

В иммунотропной терапии пародонтита необходимо контролировать иммунный ответ, чтобы эффективно избежать распространения патогенных микроорганизмов и, в то же время, предотвращать повреждение тканей пародонта. При анализе результатов различных исследований отмечается, что Treg преимущественно накапливаются в инфицированных тканях [47]. При пародонтите, например, в биопсийном материале чаще встречаются CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺Treg, чем при гингивите. Эти клетки демонстрировали фенотипические характеристики Treg, подтвержденные экспрессией CTLA-4, GITR, CD103, CD45RO и FoxP3. Более того, миграция CD4⁺CD25⁺Т-клеток в воспаленные ткани, по-видимому, зависела от экспрессии CCL17 и CCL22 маркеров клеток воспалительного инфильтрата, что, в свою очередь, рекрутирует Treg-клетки, экспрессирующие CCR4 или CCR8 [32].

Несмотря на увеличение количества Treg в процессе ВЗП, возможно, часть этих клеток теряет свои подавляющие функции из-за провоспалительного цитокинового профиля среды пародонта, обогащенной IL-6 [30]. Например, при деструктивных поражениях пародонта по сравнению со случаями слабоактивного процесса мРНК FoxP3, T-bet, RANKL, IL-17, IL-1 β и IFN γ были значительно экспрессированы. В то же время, экспрессия мРНК TGF- β 1 и IL-10 была увеличена в вяло текущих очагах поражения пародонта

по сравнению с деструктивными очагами [39]. Отмечается, что количество CD25⁺FoxP3⁺Treg значительно снижается при резорбции костной ткани при пародонтите по сравнению со здоровыми тканями десны [39]. Тем не менее до сих пор не было подтверждено, модифицирует ли воспалительная среда пародонта фенотипическую или функциональную стабильность инфильтрирующих Treg-клеток.

Иммунотропные препараты с механизмом действия, не связанным с первичной активацией каких-либо рецепторов или сигнальных путей

Перспективное направление в разработке новых биологически активных препаратов — нанотехнологии. Антибактериальный эффект наночастиц серебра хорошо известен в медицине. Например, наночастицы AgNP диаметром 7–17 нм замедляют развитие биопленки и улучшают состояние пародонта [79].

Развитием этого метода стала комбинация антибактериального и пролиферативного эффектов серебра. Для этого в качестве стабилизирующей матрицы применялись полимеры, что дополняло антибактериальные свойства наночастиц серебра и усиливало репаративный эффект эпителизации раны. Наночастицы серебра, стабилизированные мексидолом и поливинилпирролидоном, снижают микробную контаминацию и ускоряют заживление раны в подчелюстной области при опытах на крысах [79].

Такой же эффект наблюдался при стабилизации нанокompозита серебра хитозаном и поливиниловым спиртом. Предполагаемый механизм такого действия — повышение уровня экспрессии генов, активируемых сигнальным путем TGF-β1 [79]. Наночастицы серебра способны индуцировать пролиферацию и миграцию кератиноцитов и фибробластов, у мышей, страдающих диабетом, что способствует ускорению заживления раны [29]. На модели *in vitro* показана пролиферация мезенхимальных стволовых клеток и остеогенная дифференцировка, индуцированная наночастицами серебра. На модели поврежденной бедренной кости мыши было показано формирование костной мозоли в зоне перелома, обусловленное действием наночастиц серебра, инкапсулированных в коллаген и, возможно, связанное с индукцией пролиферации и остеогенной дифференцировкой мезенхимальных стволовых клеток через активацию TGF-β/BMP (костный морфогенетический белок) [79].

Другими исследованиями показано действие композита наночастиц золота, эпигаллокатехина галлата и α-липоевой кислоты на ускоренное заживление ран и снижение экспрессии конечных продуктов гликолиза через регуляцию противовоспалительных эффектов и ангиогенеза. При

изучении ангиогенеза было показано повышение уровня VEGF и снижение ангиопоэтина-2 [29].

Другой используемый в стоматологической практике препарат — хитозан обуславливает пролонгированную санацию пародонтальных карманов, благодаря своей антибактериальной активности и действию на эффекторы врожденного иммунитета. Противовоспалительное действие препарата 8%-го аскорбата хитозана связано с супрессией продукции TNFα. При этом изменения уровней цитокинов TNFα и IL-1β в жидкости пародонтальных карманов отражают процессы рекрутинга, праймирования и продления срока жизни нейтрофилов, осуществляющих защиту от пиогенных бактерий и способных существовать в анаэробных условиях пародонтального кармана [11]. Также хитозан стабилизирует факторы роста тромбоцитов и модулирует дифференцировку стволовых клеток в направлении регенерации тканей. Каркасы на основе хитозана служат наноматериалами для тканевой инженерии пародонта [51].

В лечении пародонтитов используется препарат, содержащий гиалуроновую кислоту и ее соединения. Показана их эффективность в комплексной терапии пародонтитов, за счет активации факторов местного иммунитета [35, 54].

Способ доставки иммунотропных лекарственных средств

В настоящее время локальное применение иммунотропных препаратов считается наиболее перспективным направлением в использовании иммунотерапии при заболеваниях пародонта, но дальнейшее развитие потребовало исследований в области способов доставки иммунотропных лекарственных средств.

Перспективным направлением в лечении воспалительных заболеваний пародонта является местное применение различных гелей, содержащих компоненты, активирующие регенеративные процессы. Показана эффективность инъектируемого альгинат-пептидного композитного гидрогеля в качестве основы для регенерации костной ткани. Испытания на биосовместимость геля *in vitro*, проведенные с клетками преостеобластов MC3T3-E1, продемонстрировали хорошую жизнеспособность этих клеток и адгезию к гидрогелевым волокнам [43].

Определенный интерес представляет экспериментальная работа коллектива исследователей, использовавших альгинатные гидрогели, доставляющие гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и стромальный лимфопоэтин тимуса (TSLP) местно [77, 78]. Регистрация событий *in vivo* показала активную миграцию дендритных клеток, FoxP3⁺ клеток и IL-10 в ткани пародонта.

Недавно была разработана новая иммуномодулирующая стратегия регенерации альвеолярной кости, нацеленная на макрофаги, играющие центральную роль в активации и разрешении воспаления [48]. Среди макрофагов выделяются два фенотипа: классически активированные макрофаги M1 и альтернативно активированные макрофаги M2.

Макрофаги способны динамически переключаться с одного фенотипа на другой в зависимости от окружающей микроокружения. Например, IL-4 является эффективным цитокином для изменения провоспалительного M1 в противовоспалительный M2-фенотип. На основе этих биологических находок была разработана уникальная биоинспирированная инъекционная микросфера в качестве остеоиммуномодулирующего каркасного биоматериала [48].

Микросфера была собрана из модифицированных гепарином желатиновых нановолокон, имитирующих архитектуру естественного костного экстрацеллюлярного матрикса и обеспечивающих остеокондуктивное микроокружение для костных клеток. IL-4, имеющий домены связи с гепарином, был включен в нановолокнистую гепарин-модифицированную желатиновую микросферу. Связывание IL-4 с гепарином защищало IL-4 от денатурации и деградации и контролировало его длительное высвобождение. Исследование *in vivo* показало, что остеоиммуномодулирующие микросферы переключают провоспалительный макрофаг M1 в прозаживляющий фенотип M2, эффективно разрешают воспаление и впоследствии усиливают остеобластную дифференцировку и новую регенерацию костной ткани. Таким образом, разработка иммуномодулирующих биоматериалов является перспективным подходом к заживлению костей.

Общие ограничения всех факторов роста — чрезвычайно короткие периоды биологической активности и заданная продолжительность локальных эффективных концентраций. Поэтому было важно разработать систему доставки лекарственных средств (ДЛС) с использованием соответствующих каркасных элементов, позволяющих препарату действовать локально в течение определенного периода времени. Из различных разработанных и успешно примененных в Японии ДЛС — биodeградируемый желатиновый гидрогель, включающий rhФРФ-2, служащий каркасом для клеточной пролиферации, способствующий индукции регенерации биологических тканей и обеспечивающий непрерывную биоактивность клеточных ФР.

Среди природных полимеров, выполняющих роль эффективного каркаса, гидрогели на основе желатина продемонстрировали контролируемое

высвобождение ФР в целевом участке в течение длительного периода времени. Желатиновые гидрогели представляют собой сшитые гидрофильные полимерные сети, обеспечивающие стабильность и перекрестную связь с ФР [51, 56]. Кроме того, японские исследователи разработали [71, 72, 73] и успешно применяют в настоящее время инъекционные гидрогели, содержащие ФР, которые могут быть введены с использованием малоинвазивных методов, а не обычных открытых операций [50, 51].

Таким образом, технология доставки лекарственных средств, обеспечивающая устойчивое высвобождение ФР, имеет важное значение для регенерации тканей.

Заключение

Этиопатология хронического пародонтита является многофакторной и включает в себя специфические бактериальные и грибковые патогены, активные герпес-вирусы и провоспалительные иммунные реакции. В большинстве случаев для лечения этих иммунодефицитных состояний применяются антибактериальные, противогрибковые и противовирусные препараты. Поэтому иммуотропные лекарственные средства не используются в виде монотерапии.

В связи с этим целесообразно назначать иммуномодуляторы одновременно с антибиотиками. При таком комплексном применении достигаются две цели. Подавляется функциональная активность возбудителя и повышается чувствительность к бактерицидному действию фагоцитов. При вирусной инфекции иммуотропный препарат повышает цитотоксические свойства макрофагов и NK-клеток. При смешанных бактериально-вирусных инфекциях будет эффективной комбинация из антибактериального, противовирусного препарата и индуктора интерферона.

Следует учитывать условия использования иммуотропных препаратов в рамках иммунокорректирующей терапии. Такие лекарственные средства входят в состав комплексного лечения и следует проводить оценку иммунного статуса до и после терапии.

Таким образом, прогресс знаний о развитии врожденного и приобретенного иммунного ответа при воспалительных заболеваниях и, в частности, при патологии пародонта позволяет разрабатывать новые подходы, методы лечения для повышения эффективности комплексной терапии ВЗП. А применение иммуотропных препаратов в комплексной терапии воспалительных заболеваний пародонта представляет практический интерес.

Список литературы / References

1. Абдурахманова С.А., Рунова Г.С., Подпорин М.С., Царева Е.В., Ипполитов Е.В., Царев В.Н. Микробиологическое обоснование применения фитопрепаратов для лечения воспалительных заболеваний пародонта // Пародонтология, 2019. Т. 24, № 3. С. 196-202. [Abdurakhmanova S.A., Runova G.S., Podporin M.S., Tsareva E.V., Ippolitov E.V., Tsarev V.N. Microbiological substantiation of application of phytopreparations in treatment of inflammatory periodontal diseases. *Parodontologiya = Parodontology*, 2019, Vol. 24, no. 3, pp. 196-202. (In Russ.)]
2. Агафонова Е.В., Фролова Л.Б. Оптимизация комплекса лечебных мероприятий у пациентов с быстро прогрессирующим пародонтитом // Медицинский альманах, 2011. № 2 (15). С. 176-179. [Agafonova E.V., Frolova L.V. Optimization of remedial actions complex among patients with rapidly progressing periodontal disease. *Meditsinskiy almanakh = Medical Almanac*, 2011, no. 2 (15), pp. 176-179. (In Russ.)]
3. Алеханова И.Ф., Васенев Е.Е., Рыжкова М.М. Сравнительная характеристика местных противовоспалительных препаратов при лечении заболеваний пародонта // Лекарственный вестник, 2019. Т. 13, № 3 (75). С. 32-39. [Alekhanova I.F., Vasenev E.E., Ryzhkova M.M. Comparative characteristics of local anti-inflammatory medicaments in the treatment of periodontal diseases. *Lekarstvennyy vestnik = Drugs Bulletin*, 2019, Vol. 13, no. 3 (75), pp. 32-39. (In Russ.)]
4. Алленов С.Н., Аляев Ю.Г., Атауллаханов Р.И., Балаболкин И.И., Баткаев Э.А. Иммуноterapia: руководство для врачей / под ред. Хаитова Р.М., Атауллаханова Р.И., Шульженко А.Е. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 767 с. [Allenov S.N., Alyaev Yu.G., Ataulakhonov R.I., Balabolkin I.I., Batkaev E.A. Immunotherapy: a guide for physicians. Ed. Khaitov R.M., Ataulakhonov R.I., Shulzhenko A.E.]. Moscow: GEOTAR-Media, 2018. 767 p.
5. Антонова Е.А., Михайлова А.А., Сизякина Л.П. Влияние различных фракций миелогида *in vitro* на свойства лимфоцитов периферической крови у часто болеющих детей // Иммунология, 2008. Т. 29, № 3. С. 172-174. [Antonova E.A., Mikhailova A.A., Siziakina L.P. The different mieloid fraction *in vitro* influence on peripheral blood lymphocytes in children who is often ill. *Immunologiya = Immunology*, 2008, Vol. 29, no. 3, pp. 172-174. (In Russ.)]
6. Ахкамова Т.М., Булгакова А.И., Медведев Ю.А., Валеев И.В. Иммуномодулирующие эффекты лейкоцитарного интерферона в комплексном лечении больных хроническим генерализованным пародонтитом // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2007. № 1. С. 19-22. [Akhkumova T.M., Bulgakova A.I., Medvedev Yu.A., Valeev I.V. The local immunomodulatory effects in oral cavity of leukocyte interferone use in complex therapy patients with chronic parodontitis. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2007, Vol. 29, no. 3, pp. 172-174. (In Russ.)]
7. Барабанова Л.В., Цепов Л.М., Мешкова Р.Я. Иммунокорректирующая терапия при воспалительных заболеваниях пародонта // Вестник Смоленской государственной медицинской академии, 2000. № 3. С. 59-63. [Barabanova L.V., Tsepov L.M., Meshkova R.Ya. Immunocorrective therapy for inflammatory periodontal diseases. *Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii = Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*, 2000, no. 3, pp. 59-63. (In Russ.)]
8. Барер Г.М., Григорян С.С., Суражев Б.Ю., Постнова Н.В. Применение 5% линимента циклоферона в комплексной терапии больных хроническим генерализованным пародонтитом // Институт стоматологии, 2006. № 3 (32). С. 84-87. [Barer G.M., Grigoryan S.S., Surazhev B.Yu., Postnova N.V. Application of 5% cycloferon liniment in complex therapy of patients with chronic generalized periodontitis. *Institut stomatologii = Institute of Dentistry*, 2006, no. 3 (32), pp. 84-87. (In Russ.)]
9. Блашкова С.Л., Крикун Е.В. Состояние местного иммунитета при развитии комбинированных эндо-пародонтальных поражений // Пародонтология, 2017. Т. 22, № 4 (85). С. 25-28. [Blashkova S.L., Krikun E.V. Condition of local immunity in the development of combined endo-periodontal lesions. *Parodontologiya = Parodontology*, 2017, Vol. 22, no. 4 (85), pp. 25-28. (In Russ.)]
10. Булгакова А.И., Медведев Ю.А., Изгина Э.Р., Валеев И.В. Изменения показателей состояния местного иммунитета десны и ротовой полости больных хроническим пародонтитом при лечении с использованием интерферона и миелогида // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2002. № 3. С. 32-37. [Bulgakova A.I., Medvedev Yu.A., Izgina E.R., Valeev I.V. Change of parameters of gingival and oral cavity local immune state in patients with chronic periodontitis after treatment with interferon and myeloidum. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = International Journal of Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2002, no. 3, pp. 32-37. (In Russ.)]
11. Булкина Н.В., Ведяева А.П., Токмакова Е.В., Попкова О.В. Опыт применения аскорбата хитозана в комплексной терапии заболеваний пародонта // Саратовский научно-медицинский журнал, 2013. Т. 9, № 3. С. 372-375. [Bulkina N.V., Vedyayeva A.P., Tokmakova E.V., Popkova O.V. Experience of using chitosan ascorbate in the complex therapy of periodontal diseases. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Scientific and Medical Journal*, 2013, Vol. 9, no. 3, pp. 372-375. (In Russ.)]
12. Булкина Н.В., Лукина Л.В., Глыбочко А.П., Осипова Ю.Л., Моргунова В.М., Ковтунова О.В. Применение иммуномодулятора гепон в комплексной терапии больных хроническим генерализованным пародонтитом // Российский стоматологический журнал, 2008. № 6. С. 20-21. [Bulkina N.V., Lukina L.V., Glybochko A.P., Osipova Yu.L., Morgunova V.M., Kovtunova O.V. Clinico-immunological estimation of application

of immunomodulatory medicine "Gepon" in complex therapy of inflammatory periodontium diseases. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal = Russian Dentistry Journal*, 2008, no. 6, pp. 20-21. (In Russ.)]

13. Иванов П.В., Булкина Н.В., Зудина И.В., Ведяева А.П., Зюлькина Л.А. // Клинико-иммунологическая оценка эффективности местного применения 8%-го аскорбата хитозана в комплексном лечении больных генерализованным пародонтитом // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. Клиническая медицина, 2015. № 2 (34). С. 68-74. [Ivanov P.V., Bulkina N.V., Zudina I.V., Vedyeva A.P., Zyl'kina L.A. Clinical and immunological evaluation of local application efficiency of 8% chitosan ascorbate in complex treatment of patients with generalized periodontal disease. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki. Klinicheskaya meditsina. = News of Higher Educational Institutions. Volga Region. Medical Science. Clinical Medicine*, 2015, no. 2 (34), pp. 68-74. (In Russ.)]

14. Какван А., Лебеденко И.Ю., Муляр А.Г., Гасанов М.Т. Перспективы применения иммуномодулятора Имунофана при лечении болезней пародонта // Вестник Медицинского стоматологического института, 2016. № 4 (39). С. 34-37. [Kakvan A., Lebedenko I.Yu., Mulyar A.G., Gasanov M.T. Perspectives of application of imunofan immunomodulator in treatment of periodont diseases. *Vestnik Meditsinskogo stomatologicheskogo instituta = Bulletin of the Medical Dentistry Institute*, 2016, no. 4 (39), pp. 34-37. (In Russ.)]

15. Крайнов С.В., Попова А.Н. Сравнительная оценка иммуномодуляторов, включенных в схему лечения пародонтита в геронтостоматологической практике // Colloquium-journal, 2019. № 24-3 (48). С. 36-40. [Kraynov S.V., Popova A.N. Comparative evaluation of immunomodulators included in the treatment regimen of periodontitis in elderly patients. *Colloquium-journal*, 2019, no. 24-3 (48), pp. 36-40. (In Russ.)]

16. Макаревич П.И., Ефименко А.Ю., Ткачук В.А. Биохимическая регуляция регенеративных процессов факторами роста и цитокинами: основные механизмы и значимость для регенеративной медицины // Биохимия, 2020. Т. 85, № 1. С. 15-33. [Makarevich P.I., Efimenko A.Yu., Tkachuk V.A. Biochemical regulation of regenerative processes by growth factors and cytokines: Basic mechanisms and relevance for regenerative medicine. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2020, Vol. 85, no. 1, pp. 11-26. (In Russ.)]

17. Маланьин И.В., Бондаренко И.С. Применение препарата «Инсадол» в комплексном лечении заболеваний пародонта // Фундаментальные исследования, 2004. № 5. С. 119-120. [Malanyin I.V., Bondarenko I.S. Application "Insadol" in the complex treatment of periodontal diseases. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2004, no. 5, pp. 119-120. (In Russ.)]

18. Мартынова Е.Ю., Башкова Л.В., Терещук О.С., Арина Л.В., Булкина Н.В. Иммуномодулирующая терапия в комплексном лечении больных хроническим генерализованным пародонтитом // Фарматека, 2014. № 15-3. С. 27-28. [Martynova E.Yu., Bashkova L.V., Tereshchuk O.S., Arinina L.V., Bulkina N.V. Immunomodulatory therapy in the complex treatment of patients with chronic generalized periodontitis. *Farmateka = Pharmateca*, 2014, no. 15-3, pp. 27-28. (In Russ.)]

19. Михальченко В.Ф., Фирсова И.В., Крайнов С.В., Попова А.Н., Яковлев А.Т., Дьяченко С.В. Оценка эффективности иммуномодулирующей терапии при лечении хронического генерализованного пародонтита у лиц пожилого возраста // Лекарственный вестник, 2019. Т. 13, № 3 (75). С. 3-8. [Mikhalchenko V.F., Firsova I.V., Krainov S.V., Popova A.N., Yakovlev A.T., Dyachenko S.V. Evaluation of the effectiveness of immunomodulatory therapy in the treatment of chronic generalized periodontitis in the elderly. *Lekarstvennyy vestnik = Drugs Bulletin*, 2019, Vol. 13, no. 3 (75), pp. 3-8. (In Russ.)]

20. Мухамеджанова Л.Р., Кузьмина Ж.И., Тюрин Ю.А., Кузнецова Р.Г. Иммунокорректирующая терапия при воспалительных заболеваниях пародонта у спортсменов олимпийского резерва // Практическая медицина, 2014. № 4-1 (80). С. 79-82. [Mukhamedzhanova L.R., Kuzmina Zh.I., Tyurin Yu.A., Kuznetsova R.G. Immunocorrective therapy of inflammatory periodontal diseases in olympic reserve athletes. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2014, no. 4-1 (80), pp. 79-82. (In Russ.)]

21. Руманова А.И., Брагин А.В. Современные средства местной иммуномодулирующей фармакотерапии воспалительных заболеваний пародонта // Медицинская наука и образование Урала, 2015. Т. 16, № 1 (81). С. 162-165. [Rumanova A.I., Bragin A.V. Modern methods of conservative treatment of inflammatory periodontal diseases. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala = Medical Science and Education of the Urals*, 2015, Vol. 16, no. 1 (81), pp. 162-165. (In Russ.)]

22. Румянцев В.А., Битюкова Е.В., Бруй Е.Д., Денис А.Г., Закарян А.В. Эффективность «Имудона» в комплексном лечении больных хроническим генерализованным пародонтитом (клинико-лабораторное исследование) // Верхневолжский медицинский журнал, 2013. Т. 11. № 3. С. 33-35. [Rumyantsev V.A., Bityukova E.V., Bruy E.D. Denis A.G., Zakaryan A.V. Efficiency of "Imudon" in complex treatment of patients with chronic general periodontitis (clinic and laboratory research). *Verkhnevolzhskiy meditsinskiy zhurnal = Upper Volga Medical Journal*, 2013, Vol. 11, no. 3, pp. 33-35. (In Russ.)]

23. Сафонова Т.А., Долгушин И.И., Бутюгин И.А. Клинико-иммунологическая эффективность применения бета-лейкина при хроническом генерализованном пародонтите // Проблемы стоматологии, 2009. № 5. С. 44-47. [Safonova T.A., Dolgushin I.I., Butyugin I.A. Clinical and immunological efficacy of beta-leukin in chronic generalized periodontitis. *Problemy stomatologii = Problems of Dentistry*, 2009, no. 5, pp. 44-47. (In Russ.)]

24. Сашкина Т.И., Порядин Г.В., Рунова Г.С., Дубровин Д.С., Фасхутдинов Д.К., Маркина М.Л., Салдукова И.В., Соколова С.И., Зайченко О.В., Агаев Р.Р. Применение иммуномодулятора для коррекции воспалительного процесса в тканях пародонта у больных с хроническим генерализованным пародонтитом // Российская стоматология, 2016. Т.9, № 3. С. 38-41. [Sashkina T.I., Poryadin G.V., Runova G.S., Dubrovin D.S.,

Faskhutdinov D.K., Markina M.L., Saldusova I.V., Sokolova S.I., Zaichenko O.V., Agaev R.R. The application of an immunomodulator for the correction of the inflammatory process in periodontal tissues of the patients presenting with chronic generalized periodontitis. *Rossiyskaya stomatologiya = Russian Dentistry*, 2016, Vol. 9, no. 3, pp. 38-41. (In Russ.)]

25. Соболева Л.А., Шульдяков А.А., Булкина Н.В. Эффективность линимента циклоферона в комплексном лечении хронического гингивита у больных с хроническими инфекциями // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2015. Т. 78, № 7. С. 41-44. [Soboleva L.A., Shuldyakov A.A., Bulkina N.V. Efficacy of cycloferon liniment in the combined treatment of chronic gingivitis in patients with chronic infectious diseases. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2015, Vol. 78, no. 7, pp. 41-44. (In Russ.)]

26. Фомичев И.В., Флейшер Г.М. Иммунологические аспекты применения препарата «Имудон» в комплексной терапии воспалительных заболеваний пародонта // Медицинский алфавит, 2014. Т. 1, № 1. С. 45-50. [Fomichev I.V., Fleisher G.M. Immunological aspects of the application of Imudon in the complex therapy of inflammatory periodontal diseases. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, 2014, Vol. 1, no. 1, pp. 45-50. (In Russ.)]

27. Хайтов Р.М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность // Иммунология, 2020. Т. 41, № 2. С. 101-106. [Khaitov R.M. Immunomodulators: Myths and reality. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, Vol. 41, no. 2, pp. 101-106. (In Russ.)]

28. Шнайдер М.А., Калиновская (Соловьева) Н.Ю. Плейотропное действие модуляторов метилирования ДНК на синовиальные фибробласты больных ревматоидным артритом *in vitro* // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 663-665. [Schneider M.A., Soloveva N.Yu. Pleiotropic effects of dna methylation modulators on rheumatoid arthritis synovial fibroblasts *in vitro*. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 2, pp. 663-665. (In Russ.)]

29. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. Перспективы применения наночастиц металлов для целей регенеративной медицины // Сибирское медицинское обозрение, 2018. № 4 (112). С. 31-37. [Shurygina I.A., Shurygin M.G. Perspectives of metal nanoparticles application for the purposes of regenerative medicine. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2018, no. 4 (112), pp. 31-37. (In Russ.)]

30. Alvarez C., Rojas C., Rojas L., Cafferata E.A., Monasterio G., Vernal R. Regulatory T lymphocytes in periodontitis: a translational view. *Mediators Inflamm.*, 2018, Vol. 2018, 7806912. doi: 10.1155/2018/7806912.

31. Ausenda F., Rasperini G., Acunzo R., Gorbunkova A., Pagni G. New Perspectives in the Use of Biomaterials for Periodontal Regeneration. *Materials (Basel)*, 2019, Vol. 12, no. 13, 2197. doi: 10.3390/ma12132197.

32. Barbi J., Pardoll D., Pan F. Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment. *Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 259, no. 1, pp. 115-139.

33. Bhakta G. Hyaluronic acid-based hydrogels functionalized with heparin that support controlled release of bioactive BMP-2. *Biomaterials*, 2012, Vol. 33, no. 26, pp. 6113-6122.

34. Canalis E., Gabbitis B. Bone morphogenetic protein 2 increases insulin-like growth factor I and II transcripts and polypeptide levels in bone cell cultures. *J. Bone Miner. Res.*, 1994, Vol. 9, no. 12, pp. 1999-2005.

35. Casale M., Moffa A., Vella P., Sabatino L., Capuano F., Salvinelli B., Lopez M.A., Carinci F., Salvinelli F. A systematic review. Hyaluronic acid: perspectives in dentistry. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2016, Vol. 29, no. 4, pp. 572-582.

36. Chen F.M., Sun H.H., Lu H., Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*, 2012, Vol. 33, 6320-6344.

37. Cotti E., Mezzena S., Schirru E., Ottonello O., Mura M., Ideo F., Susnik M., Usai P. Healing of apical periodontitis in patients with inflammatory bowel diseases and under anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *J. Endod.*, 2018, Vol. 44, no. 12, pp. 1777-1782.

38. Din J., Yin Y.Z. The effect of vascular endothelial cells on the proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *Shanghai J. Stomatol.*, 2013, Vol. 22, no. 5, pp. 518-522.

39. Dutzan N., Gamonal J., Silva A., Sanz M., Vernal R. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, interleukin (IL)-17, IL-10 and transforming growth factor- β during the progression of chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 2009, Vol. 36, no. 5, pp. 396-s403.

40. Emtage P., Vatta P., Arterburn M., Muller M.W., Park E., Boyle B., Hazell S., Polizotto R., Funk W.D., Tang Y.T. IGFL: a secreted family with conserved cysteine residues and similarities to the IGF superfamily. *Genomics*, 2006, Vol. 88, pp. 513-520.

41. Garn H., Bahn S., Baune B.T., Binder E.B., Bisgaard H., Chatila T.A., T. Chavakis, Culmsee C., Dannlowski U., Gay S., Gern J., Haahtela T., Kircher T., Müller-Ladner U., Neurath M.F., Preissner K.T., Reinhardt C., Rook G., Russell S., Schmeck B., Stappenbeck T., Steinhoff U., van Os J., Weiss S., Zemlin M., Renz H. Current concepts in chronic inflammatory diseases: Interactions between microbes, cellular metabolism, and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 138, no. 1, pp. 47-56.

42. Ghassib I., Chen Z., Zhu J., Wang H.L. Use of IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha, and MMP-8 biomarkers to distinguish peri-implant diseases: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 190-207.

43. Ghosh M., Halperin-Sternfeld M., Grinberg I., Adler-Abramovich L. Injectable alginate-peptide composite hydrogel as a scaffold for bone tissue regeneration. *Nanomaterials (Basel)*, 2019, Vol. 9, no. 4, pii: E497. doi: 10.3390/nano9040497.

44. Gu Y., Han X. Toll-Like Receptor signaling and immune regulatory lymphocytes in periodontal disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 9, 3329. doi: 10.3390/ijms21093329.
45. Heijnen H., van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules or not? *J. Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 13, no. 12, pp. 2141-2151.
46. Horiuchi N. Vascular endothelial cells and osteoblasts. *Clin. Calcium*, 2004, Vol. 14, pp. 263-268.
47. Hsieh C.-S., Lee H.-M., Lio C.-W. J. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 3, pp. 157-167.
48. Hu Z. Immunomodulatory ECM-like microspheres for accelerated bone regeneration in diabetes mellitus. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, Vol. 10, no. 3, pp. 2377-2390.
49. Kinane D.F., Stathopoulou P.G., Papapanou P.N. Periodontal diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2017, Vol. 3, 17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38.
50. Kuroda Y., Kawai T., Goto K., Matsuda S. Clinical application of injectable growth factor for bone regeneration: a systematic review. *Inflamm. Regen.*, 2019, Vol. 39, 20. doi: 10.1186/s41232-019-0109-x.
51. Lauritano D., Limongelli L., Moreo G., Favia G., Carinci F. Nanomaterials for periodontal tissue engineering: chitosan-based scaffolds. A systematic review. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, Vol. 10, no. 4, 605. doi: 10.3390/nano10040605.
52. Lee K., Silva E.A., Mooney D.J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J. R. Soc. Interface*, 2011, Vol. 8, pp. 153-170.
53. Liu Y. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cell*, 2008, Vol. 26, no. 4, pp. 1065-1073.
54. Mallikarjun S., Neelakanti A., Babu H.M., Pai S.B., Shinde S.V., Krishnan S. Neutrophil elastase levels in the gingival crevicular fluid following hyaluronan gel application in the treatment of chronic periodontitis: A randomized split-mouth study. *Indian J. Dent. Res.*, 2016, Vol. 27, no. 4, pp. 397-404.
55. Marie P.J. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: an update. *Gene*, 2012, Vol. 498, pp. 1-4.
56. Marie P.J., Miraoui H., S  v  re N. FGF/FGFR signaling in bone formation: progress and perspectives. *Growth Factors*, 2012, Vol. 30, pp. 117-123.
57. Morozumi T., Yashima A., Gomi K., Ujiie Y., Izumi Y., Akizuki T., Mizutani K., Takamatsu H., Minabe M., Miyauchi S., Yoshino T., Tanaka M., Tanaka Y., Hokari T., Yoshie H. Increased systemic levels of inflammatory mediators following one-stage full-mouth scaling and root planing. *J. Periodontal Res.*, 2018, Vol. 53, no. 4, pp. 536-544.
58. Nakagawa T., Kumakawa K., Usami S.I., Hato N., Tabuchi K., Takahashi M., Fujiwara K., Sasaki A., Komune S., Sakamoto T., Hiraumi H., Yamamoto N., Tanaka S., Tada H., Yamamoto M., Yonezawa A., Ito-Ihara T., Ikeda T., Shimizu A., Tabata Y., Ito J. A randomized controlled clinical trial of topical insulin-like growth factor-1 therapy for sudden deafness refractory to systemic corticosteroid treatment. *BMC Med.*, 2014, Vol. 12, 219. doi: 10.1186/s12916-014-0219-x.
59. Nardi G.M., Ferrara E., Converti I., Cesarano F., Scacco S., Grassi R., Gnoni A., Grassi F.R., Rapone B. Does diabetes induce the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) expression in periodontal tissues? A systematic review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, Vol. 17, no. 8, 2765. doi: 10.3390/ijerph17082765.
60. Niu T., Rosen C.J. The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal. *Gene*, 2005, Vol. 361, pp. 38-56.
61. Ornitz D.M., Marie P.J. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev.*, 2015, Vol. 29, pp. 1463-1486.
62. Ouchi T., Nakagawa T. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration therapies for periodontitis. *Regen. Ther.*, 2020, Vol. 14, pp. 72-78.
63. Peacock M.E., Arce R.M., Cutler C.W. Periodontal and other oral manifestations of immunodeficiency diseases. *Oral Dis.*, 2017, Vol. 23, no. 7, pp. 866-888.
64. Ridgway H.K., Mellonig J.T., Cochran D.L. Human histologic and clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor and betatricalcium phosphate for the treatment of periodontal intraosseous defects. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, 2008, Vol. 28, pp. 171-179.
65. Sanchez-Duffhues G., Hiepen C., Knaus P., Ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone*, 2015, Vol. 80, pp. 43-59.
66. Sands R.W., Verbeke C.S., Ouhara K., Silva E.A., Hsiong S., Kawai T., Mooney D. Tuning cytokines enriches dendritic cells and regulatory T cells in the periodontium. *J. Periodontol.*, 2020, Vol. 91, no. 11, pp. 1475-1485.
67. Shi T., Jin Y., Miao Y., Wang Y., Zhou Y., Lin X. IL-10 secreting B cells regulate periodontal immune response during periodontitis. *Odontology*, 2020, Vol. 108, no. 3, pp. 350-357.
68. Smith P.C., Martínez C., Martínez J., McCulloch C.A. Role of fibroblast populations in periodontal wound healing and tissue remodeling. *Front. Physiol.*, 2019, Vol. 10, 270. doi: 10.3389/fphys.2019.00270.
69. Stone W.L., Leavitt L., Varacallo M. Physiology, Growth Factor In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020, 28723053.
70. Su N., Jin M., Chen L. Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models. *Bone Res.*, 2014, Vol. 2, 14003. doi: 10.1038/boneres.2014.3.

71. Taba J., Jin Q., Sugai J.V., Giannobile W.V. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod. Craniofac. Res.*, 2005, Vol. 8, no. 4, pp. 292-302.
72. Tabata Y., Nagano A., Ikada Y. Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng.*, 1999, Vol. 5, pp. 127-138.
73. Tabata Y., Yamada K., Miyamoto S., Nagata I., Kikuchi H., Aoyama I., Tamura M., Ikada Y. Bone regeneration by basic fibroblast growth factor complexed with biodegradable hydrogel. *Biomaterials*, 1998, Vol. 19, pp. 807-815.
74. Tavelli L., Ravidà A., Barootchi S., Chambrone L., Giannobile W.V. Recombinant human platelet-derived growth factor: a systematic review of clinical findings in oral regenerative procedures. *JDR Clin. Trans. Res.*, 2020, 2380084420921353. doi: 10.1177/2380084420921353.
75. Teven C.M., Farina E.M., Rivas J., Reid R.R. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes Dis.*, 2014, Vol. 1, pp. 199-213.
76. Vaillant A.A. J., Qurie A. Interleukin Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020, 29763015.
77. Wang F., Qiao W., Xu X., Wang S., Regenstien J.M., Bao B., Ma M. Egg yolk immunoglobulins' impact on experimental periodontitis caused by *Porphyromonas gingivalis*. *Technol. Health Care*, 2018, Vol. 26, no. 5, pp. 805-814.
78. Wei H., Li B., Sun A., Guo F. Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, Vol. 1172, pp. 79-96.
79. Yin I.X., Yu O.Y., Zhao I.S., Mei M.L., Li Q.-L., Tang J., Chu C.-H. Developing biocompatible silver nanoparticles using epigallocatechin gallate for dental use. *Arch. Oral Biol.*, 2019 Mar 28, Vol. 102, pp. 106-112.
80. Zhao Q., Hu Y., Deng S., Yu P., Chen B., Wang Z., Han X. Cytidine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides in combination with CD40 ligand decrease periodontal inflammation and alveolar bone loss in a TLR9-independent manner. *J. Appl. Oral Sci.*, 2018, Vol. 26, e20170451. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0451.

Авторы:

Антонов И.И. — аспирант кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Мудров В.П. — к.м.н., ассистент кафедры медицинской биохимии и иммунопатологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ; врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «9 лечебно-диагностический центр» Министерства обороны РФ, Москва, Россия

Нелюбин В.Н. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский медико-стоматологический институт ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова», Москва, Россия

Мураев А.А. — д.м.н., профессор кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Иванов С.Ю. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; заведующий кафедрой челюстно-лицевой хирургии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Authors:

Antonov I.I., Postgraduate Student, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Russian University of the People Friendship, Moscow, Russian Federation

Mudrov V.P., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Medical Biochemistry and Immunopathology, Russian Medical Academy of Postgraduate Education; Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, 9th Clinical and Diagnostic Center, Moscow, Russian Federation

Nelyubin V.N., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Research Medical and Dental Institute, A. Evdokimov Moscow State Medical and Dental University, Moscow, Russian Federation

Muraev A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Russian University of the People Friendship, Moscow, Russian Federation

Ivanov S.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Maxillofacial Surgery and Surgical Dentistry, Russian University of the People Friendship; Head, Department of Maxillofacial Surgery, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 10.11.2020
Принята к печати 19.02.2021

Received 10.11.2020
Accepted 19.02.2021

ОРГАНОСПЕЦИФИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ВОСПАЛЕНИЯ В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА РЫБАМ *Danio rerio*

Ма И, Федоров А.В., Кондратов К.А., Князева А.А., Васютина М.Л.,
Головкин А.С.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Известно, что системное воспаление является ключевым компонентом прогрессирования многих инфекционных и неинфекционных заболеваний и может приводить к полиорганной недостаточности, хроническому воспалению, иммуносупрессии, катаболическому синдрому и даже смерти. Важность этого состояния обуславливает необходимость создания релевантной *in vivo* модели воспаления, пригодной для изучения патогенеза многих заболеваний, а также для проведения скрининга эффективности фармакологических препаратов. Рыбы *Danio rerio* являются одними из наиболее важных моделей исследования биологических процессов *in vivo*. Целью настоящего исследования было создание модели системного воспаления *in vivo*, индуцированного внутрибрюшинным введением липополисахарида (ЛПС) у рыб *Danio rerio*, с последующей идентификацией органо-специфической провоспалительной активности генов. Было проведено исследование уровня экспрессии основных провоспалительных генов у *Danio rerio* после инъекции ЛПС. Сравнивая *18s*, *eef1a1l1*, *gapdh* и *actb* в качестве потенциальных генов домашнего хозяйства, мы пришли к выводу, что *eef1a1l1* с эффективностью 99% является наиболее перспективным для дальнейшей нормализации в этой модели. Активность генов была наиболее выраженной в сердце, где экспрессия *IL6*, *CXCL8α* и *CXCL18β* была повышена до 100 раз. Кроме того, почки были наиболее вовлечены в воспалительный процесс, поскольку там было активировано наибольшее количество из проанализированных генов: уровни экспрессии *CXCL18β*, *CXCL8α*, *IL1β*, *IL6*, *Mpeg1.2* и *TNFα* были значительно увеличены. Вероятно, это связано с активностью почек как иммунного и кроветворного органа. Самая низкая реактивность обнаружена в мышцах. Иммунные реакции демонстрируют дозозависимость, например, инфузия 20 мкг ЛПС приводила к снижению экспрессии *IFNγ*, *Mpeg1.2* и *Mpeg1.1* в печени и к увеличению экспрессии *Mpeg1.2* в почках по сравнению с дозировкой 10 мкг. Таким образом, *Danio rerio* является релевантной моделью воспаления. Наша модель продемонстрировала, что исследование изолированных органов рыб может быть полезным и информативным для исследования воспалительных процессов.

Ключевые слова: *Danio rerio*, воспаление, липополисахарид, экспрессия генов, сердце, почки

Адрес для переписки:

Головкин Алексей Сергеевич
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр имени В.А. Алмазова» Министерства
здравоохранения РФ
197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акkuratова, 2.
Тел.: 8 (960) 240-98-96.
E-mail: golovkin_a@mail.ru

Address for correspondence:

Golovkin Alexey S.
Almazov National Medical Research Centre
197341, Russian Federation,
St. Petersburg, Akkuratova str., 2.
Phone: 7 (960) 240-98-96.
E-mail: golovkin_a@mail.ru

Образец цитирования:

И Ма, А.В. Федоров, К.А. Кондратов, А.А. Князева,
М.Л. Васютина, А.С. Головкин «Органо-специфичная
экспрессия генов воспаления в ответ на введение
липолисахарида рыбам *Danio rerio*» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1069-1078.
doi: 10.15789/1563-0625-OSL-2357

© Ма И и соавт., 2021

For citation:

Yi Ma, A.V. Fedorov, K.A. Kondratov, A.A. Knyazeva,
M.L. Vasyutina, A.S. Golovkin "Organ-specific LPS-induced
inflammatory gene expression in adult Zebrafish", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2021,
Vol. 23, no. 5, pp. 1069-1078.
doi: 10.15789/1563-0625-OSL-2357
DOI: 10.15789/1563-0625-OSL-2357

ORGAN-SPECIFIC LPS-INDUCED INFLAMMATORY GENE EXPRESSION IN ADULT ZEBRAFISH

Ma Yi, Fedorov A.V., Kondratov K.A., Knyazeva A.A., Vasyutina M.L., Golovkin A.S.

Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Systemic inflammation is known to be a key component of infection and non-infection diseases progression and may lead to multiorgan failure, persistent inflammation, immunosuppression, catabolism syndrome or even indolent death. This importance dictates the need for relevant *in vivo* models of inflammation to investigate the pathogenesis of numerous diseases and to perform drug screening. *Danio rerio* (zebrafish) became one of the most important models to explore biological processes *in vivo*. The aim of the study was to generate a lipopolysaccharide (LPS) model of systemic inflammation *in vivo* using zebrafish and to identify organspecific proinflammatory genes activity after intraperitoneal LPS infusion. We performed organ specific analysis of main proinflammatory genes expression in zebrafish after LPS stimulation. Comparing *18s*, *eef1a111*, *gapdh*, and *actb* as potential housekeeping genes, we came to conclusion that *eef1a111* with 99% effectiveness is the most promising for further normalization in this model. The genes activity was the most pronounced in the heart where the expression of *IL6*, *CXCL8 α* , and *CXCL18b* was increased up to 100-fold. Moreover, the kidneys were the most involved in the inflammatory process since the highest number of analysed genes were up-regulated there: expression levels of *CXCL18 β* , *CXCL8 α* , *IL1 β* , *IL6*, *Mpeg1.2*, and *TNF α* were significantly increased. This was probably related to the kidney activity as an immune and hematopoietic organ. The lowest reactivity was detected in the muscles. Immune reactions could be dose-dependent, for instance the infusion of 20 μ g LPS led to decrease of expression of *IFN γ* , *Mpeg 1.2*, and *Mpeg 1.1* in the liver and to increase of *Mpeg 1.2* expression in the kidney comparing with 10 μ g dosage. Thus, due to the high degree of the similarity and other unique properties, *Danio rerio* has the advantage of being relevant model of inflammation. Our model demonstrated that the investigation of isolated zebrafish organs could be useful and informative for the investigation of inflammatory processes.

Keywords: zebrafish, *Danio rerio*, inflammation, LPS, gene expression, heart, kidney

This research was funded by Russian Science Foundation, grant number 19-75-20076.

Introduction

Since the 1960s, zebrafish (*Danio rerio*) has been used as a vertebrate model organism. Zebrafish became one of the most important models to study a variety of biological processes *in vivo* after establishing in 2013 that its genetic structure is similar to humans [21, 27]. Currently, *Danio rerio* is widely used in developing human disease models in oncology [4], neurology [10], endocrinology [62], cardiology [32] as well as being highly demanded in drug research and development [39]. Besides, *Danio rerio* was used as an *in vivo* model of inflammation triggered by chemical agents [8], microorganisms and their endotoxins [17, 61, 65], and extracellular membrane vesicles [1]. Traditionally, histological, cytological [1], and gene [17] analysis are among high priority assays. Among them, the most commonly used method is quantitative real-time PCR for detecting mRNA copy number [1, 29, 50, 61, 66].

Lipopolysaccharide (LPS) is an endotoxin and the major component of the outer membrane of all Gram-negative bacteria [7]. Directly or indirectly LPS elicits multiple pathophysiological processes *in vivo*, such as metabolic changes, fever, multiple organ dysfunction syndrome (MODS), endotoxic shock, and death in extreme cases [9, 34]. It has long been established that lower vertebrates, most notably fish and amphibians, are resistant to the LPS toxic effect. It has been demonstrated that the mechanism of LPS recognition in fish may differ from that of mammals. For example, the identification of TLR4 as a negative regulator of TLR signaling in fish along with its absence in most fish species, accounts for fish resistance to endotoxic shock [44]. The fish genes *TLR4 α* and *TLR4 β* appear to be paralogous rather than orthologous to human *tlr4* but they probably play a role in zebrafish immunity, supporting the hypothesis that alternative LPS induction pathways predominate in fishes [49]. Nevertheless, zebrafish inflammatory models are suited to study the basic mechanisms of inflammation in human inflammatory diseases exerting a great translational impact potential [17].

By using microarrays G. Forn-Cun found that LPS injection modulated the gene expression in adult zebrafish and the most affected genes were inflammatory factors, such as interleukins (*IL1 β* , *IL6*), chemokines (*CXCL8 α* , *CXCL11.1*, *CXCL8 β*) that were significantly up-regulated [17]. This increase was more profound in kidney than in liver and muscle [17]. Li-Ling Yang et al. found enhanced *IL1 β* , *IL6* and *TNF α* expression in 3-dpf (day post-fertilization) zebrafish larvae injected with 0.5 mg/mL LPS [61]. Benard EL et al. demonstrated the anti-bacterial activity of the macrophage-produced perforins *Mpeg 1* and *Mpeg 1.2* in zebrafish [8].

Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is known to be an important pathogenesis factor of infection and non-infection diseases that may lead to multiorgan failure, chronic critical illness, persist inflammation, immunosuppression, catabolism syndrome or even indolent death [15, 43, 46]. Inflammation plays a central role in many cardiovascular diseases, including heart failure [13], myocardial infarction [18], arrhythmias [17], pericarditis [24], myocarditis [16], and sepsis-induced cardiomyopathy [26].

Therefore, an *in vivo* model of systemic inflammation involving the heart and other organs is of great importance for investigating a variety of human diseases. Use mice models of inflammation is time-consuming and costly, due to the long body development and maturation [22]. Thus, the need for a relevant but more accessible and cheap *in vivo* model of systemic inflammation is of great importance for further investigations of human diseases as well as for drug research and development. In addition, organ-specific gene expression profiling is absolutely crucial for model validation and needs to be identified to prove the effectiveness and reproducibility of chosen model system.

The aim of the study was to generate an *in vivo* model of systemic inflammation using *Danio rerio* and to develop RT-qPCR based system for quantitative analysis of organ-specific proinflammatory genes expression activity after intraperitoneal LPS infusion.

Materials and methods

Adult wild-type zebrafish AB strain were obtained from a local commercial distributor (Axolotl Co., St. Petersburg, Russia) and housed in the ZebTec Active Blue Stands equipped with Water Treatment Unit (Tecniplast, West Chester, USA) in the Aquatic Facility of the Almazov National Medical Research Center (St. Petersburg, Russia) in groups of 10 fish per standard 3.5-L tanks. Tanks were filled with filtered system water maintained at 27 ± 0.5 °C and pH 7.4. Water was prepared by reverse osmosis and

subsequent enrichment with Heka Marine Reef Crystals (Germany). The microbiological purity of the water has been tested and demonstrated to be free from bacteria. Illumination (950–960 lux) in the holding and testing rooms was provided by 18-Wt fluorescent light tubes with a 14/10-h light/dark cycle according to the standards of zebrafish care [46]. All fish were fed twice daily with Neon Micro Granules for fish size 1–2 cm long (Dajana Pet, Bohuovice, Czech Republic). The nutrition for Zebrafish was chosen and applied according to recommendations by Watts et al. [57].

Fish experiments were approved by the Institutional IACUC at the Almazov National Medical Research Centre (Protocol No. 19-2, dated of January 25, 2019) and fully adhered to the National guidelines and regulations on animal experimentation. The fish used in the experiments belonged to the same baseline population, and were allocated randomly to the experimental groups. The animals were acclimated at least two weeks prior to the experiments. Thirty-six adult fish of both sexes above four months of age were enrolled in the study.

Before procedures, every fish was anesthetized by immersion into the 0.032% (wt/vol) tricaine solution (MS-222; Sigma-Aldrich) until immobilization. Two groups were injected using sterile single-use syringe into the midline of the cavity, posterior to the pectoral fins with 10 μ g of LPS (lipopolysaccharide) (Sigma, L2630) (12 fish) and with 20 μ g LPS injection (12 fish). LPS was dissolved in sterile PBS. Each injection dose was 10 μ L. Twelve fishes were injected with 10 μ L of sterile PBS and were included in the control group. After the injection, each fish was returned to the tank with water prepared as described above and remained under the surveillance for 5 h. Fishes from different groups were reared in separate tanks. Then, fishes were euthanized with a tricaine overdose (0.16%). After euthanasia, heart, liver, kidney, and skeletal muscles were dissected under the microscope (without blood removing). Samples were snap frozen and stored at -80 °C.

Total RNA was isolated from tissues using ExtractRNA reagent (Evrogen, Moscow, Russia) according to the manufacturers recommendations, as previously described [28]. RNase-free glycogen was used as co-precipitate to increase visibility and recovery of low amounts of RNA as previously described [28]. The RNA pellet was air dried, dissolved in 10–50 μ L of RNase-free water and stored at -80 °C.

The quantity and quality of RNA isolation were measured using NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). The efficiency (Eff) of each primer was calculated by using formula $\text{Eff} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. In our experiments

efficiency of all primers was within the range of 90–100%. Reverse transcription was performed by using MMLV Reverse Transcriptase (Evrogen, Moscow). Amplification was performed by using qPCRmix-HS SYBR + LowROX (Evrogen, Moscow) according to the manufacturer's recommendations as previously described [34]. PCR was performed by using 400 ng of total RNA in 25 µl reaction mix (cDNA 5µl, forward primer (2µM) 1 µl, reverse primer (2 µM) 1µl, SYBR + LowROX 5 µl). Conditions for a routine PCR were as follows: 45 cycles 95 °C for 15 sec, 60 °C for 30 sec, 70 °C for 30 sec. The PCR primers were designed by using the BLAST program. All primers are listed in SupTable 1.

GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used to perform statistical analysis and visualizations. Gene expression heatmaps were generated using the Phantasus Web tool (<https://artyomovlab.wustl.edu/phantasus/>). Differences between groups were calculated by using Mann–Whitney test and detected as statistically significant if a p-value was less than 0.05. Correlations were calculated by using Spearman test, a p-value less than 0.01 was considered as statistically significant.

GeNorm [54] and NormFinder [2] were used to compare stability of reference genes expression. For geNorm, raw Ct values were transformed to relative non-normalized quantities (Q), according to geNorm. The relative levels of gene expression (RQ) in each sample were calculated as $RQ = 2^{(Cq_{max} - Cq_{sample})}$.

NormFinder software (<https://www.moma.dk/normfinder-software/>) performed by GenEx Standard software (bioMCC, Freising, Germany) was used to compare targeted genes expression and reference genes. We tested housekeeping genes most commonly used in zebrafish, such as *18s* (*18s* ribosomal RNA), *eef1a1l1* (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, like 1), *Gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and *actb* (actin, beta 1 [35]). Finally, *eef1a1l1* was selected as reference gene for normalization, since it was constitutively expressed and not affected by the treatment. Next, fold changes in target gene expression in stimulated tissues were normalized to the non-treated controls.

Results

On the first stage, four genes were used as potential housekeeping genes. We found that qRT-PCR results of these genes (*18s*, *eef1a1l1*, *gapdh*, and *actb*) showed high diversity in different tissues both with or without LPS injection (SupFigure 1A, B, C, D). *Actb* demonstrated the peak baseline, whereas *18s* – the lowest level. Moreover, *18s* exhibited the most stable expression according to the geNorm (SupFigure 1E) data and NormFinder analysis (SupFigure 1F). However the effectiveness of *18s* was 85%. The relative M-values were defined as a measure of gene expression stability whilst increasing M-value correlated with less stability. However, the high abundance of rRNA compared to mRNA complicated subtraction of the

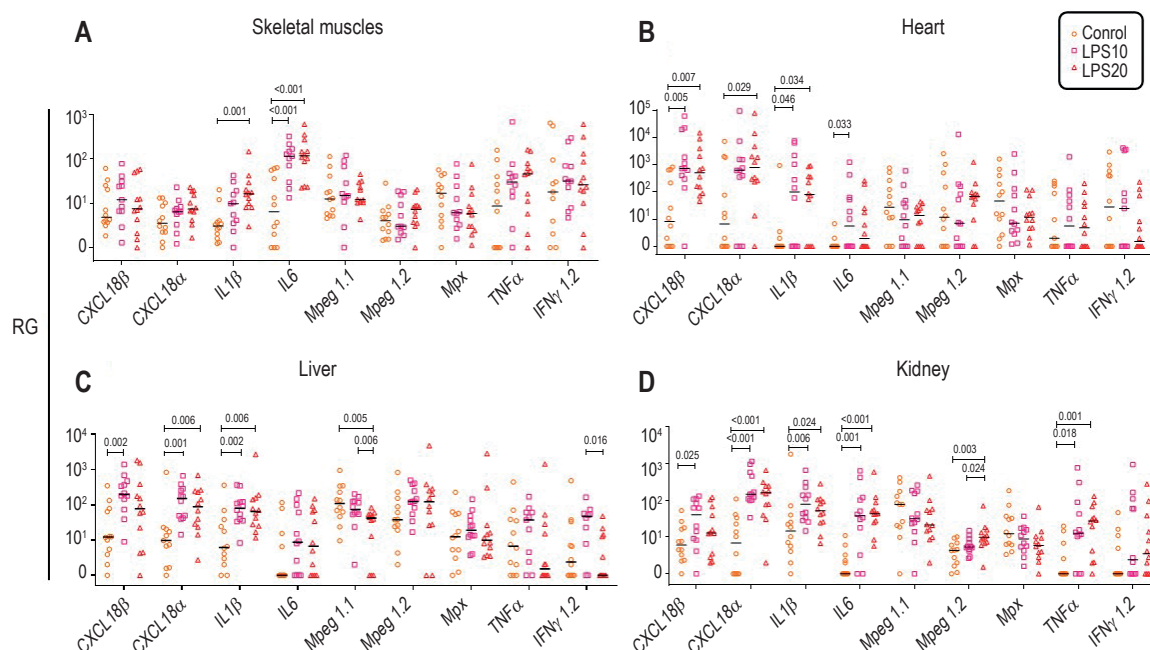


Figure 1. Expression of genes in different tissues of *Danio rerio* after LPS injection

Note. A, skeletal muscles. B, heart. C, Liver. D, kidney. RQ, relative quantification

baseline value in qPCR analysis [38, 39]. Thus, taking into account the data obtained we chose *eef1a1l1* with 99% effectiveness as a reference gene for the further normalization.

Nine genes associated with inflammation (*CXCL18 β* , *CXCL8 α* , *IL1 β* , *IL6*, *Mpeg 1.1*, *Mpeg 1.2*, *MPX*, *TNF α* , *IFN γ 1.2*) were selected as targets. The injection of LPS into the peritoneum of *Danio rerio* resulted in upregulated expression of *IL1 β* and *IL6* in the muscles (Figure 1A), heart (Figure 1B), and kidney (Figure 1D). Additionally, there was a significant increase of *IL1 β* but not *IL6* in the liver (Figure 1C). Moreover, expression of *CXCL18 β* and *CXCL8 α* in the heart (Figure 1B) and liver (Figure 1C) was upregulated. Kidneys appeared to be the most responsive organ to the LPS infusion since it contained the majority of up-regulated genes studied here: expression levels of *CXCL18 β* , *CXCL8 α* , *IL1 β* , *IL6*, *Mpeg 1.2*, and *TNF α* were significantly increased (Figure 1D). Furthermore, the lowest reactivity was detected in the muscles.

Interestingly, the significant increase of *CXCL18 β* in the liver and kidney was detected only after 10 μ g but not 20 μ g LPS injection. Besides, the usage of 20 μ g LPS resulted in decreased *Mpeg 1.1* expression in the liver.

The heart tissue demonstrated the peak reactivity after LPS stimulation. The gene expression was increased by around 100-fold and 80-fold for *IL1 β* and for *CXCL8 β* , respectively. The liver and the muscles were less reactive demonstrating up to an 18-fold gene expression change. Interestingly, the change in *IL6* expression in the liver was not significant despite that this is the main cytokine to stimulate C-reactive protein synthesis in the liver. Meanwhile, it had marked about a 40-fold increase in the kidney.

Immune reactions could be dose-dependent, for instance the infusion of 20 μ g LPS led to decreased expression of *IFN γ* , *Mpeg 1.2*, and *Mpeg 1.1* in the liver and to increase of *Mpeg 1.2* expression in the kidney (Figure 1) comparing with lower dosage.

Discussion

The study of the systemic inflammatory response requires whole-organism experiments. *Danio rerio* seems to be a very promising model, since zebrafish immune system has almost the full repertoire of lymphoid organs and types of immune cell found in mammals [36, 52, 63]. The innate immune system is detectable and active at day 1 of zebrafish embryogenesis [20], whereas the adaptive immune system is morphologically and functionally mature only at 4-6 weeks after the egg fertilization when the lymphocytes become functional [11, 31, 52, 58]. Zebrafish as a vertebrate are genetically closer

to mammals than invertebrate models. About 71% of human genes have at least one corresponding gene found in the zebrafish genome, known as an ortholog [21]. The genetic similarity between humans and zebrafish enables to use them for modeling human diseases [3]. Moreover, the zebrafish genome is fully sequenced and was the third high-quality sequenced genome after mouse and human [21]. Experiments with fish are easy to perform to be carried out in the same conditions. Zebrafish have high fecundity and short maturation times. It makes possible getting a large number of homologous offspring in a short time, which in turn shortens the experiment cycle and also reduces the experiment-related genetic heterogeneity. All these features lead us to the decision to generate the experimental model of systemic inflammation by using *Danio rerio*.

The intraperitoneal injection of LPS provoked the changes in the proinflammatory genes expression in different organs (Figure 2). We suggest that this gene expression profile could become a specific marker of the systemic inflammatory response. The highest number of genes with increased expression was found in the kidney but the most prominent reactions were found in the heart. Moreover, we observed that different concentrations of LPS have different effects on organ inflammation process, which might be due to potential for lower LPS concentrations to stimulate the immune system by activating monocytes-phagocytes, endothelial cells etc., releasing inflammatory factors, and causing systemic inflammation. At higher concentrations LPS not only exhausts pro-inflammatory factors but also provokes a systemic toxic effect, directly or indirectly inducing apoptosis of immune cells, thereby suppressing the immune system [59].

Previous studies have already shown that after different types of stimulation zebrafish leukocytes can produce a variety of cytokines orchestrating inflammatory reactions [47, 48, 49, 50]. In our study, we found significant changes in tissue-specific expression of cytokine genes. Interestingly, the proinflammatory *IL1 β* gene expression was most prominent in the heart. The relationship between IL-1 and cardiovascular disease (CVD) was shown in recent studies [51, 56]. IL-1 is one of the first cytokines to be recognized as a pivotal mediator of cell-to-cell communication within the immune system and a key driver of local and systemic immune responses in many diseases including atherosclerotic CVD [53]. Now, *IL1 β* blockade is the most promising approach for autoinflammatory disease therapy [52]. Our results demonstrate the involvement of different organs in the LPS-induced inflammatory process.

Chemokines are a family of small cell-signaling proteins that direct the migration of cells expressing corresponding receptors along a ligand concentration gradient. Chemokines and their receptors are widely presented on vascular cells, such as endothelial cells (ECs) and smooth muscle cells (SMCs) [55]. As the main subfamily of chemokines, CXC (Cysteine-X-Cysteine) exists in both mammalian and teleost species. CXCL8 is the best-studied neutrophil chemoattractant in humans [54] and is conserved in zebrafish [57, 58], but lacked in rodents [59, 60]. Contrary to humans, *CXCL8α* in zebrafish requires no CXCR1 receptor and recruits neutrophils essentially via CXCR2 [58].

CXCL18β is an inflammatory marker which was found in zebrafish and other piscine and amphibian species. Similarly to *CXCL8α*, *CXCL18β*-dependent recruitment required the chemokine receptor CXCR2 [58]. Meanwhile, its activity was independent of the expressed CXCR1 and CXCR4b. Like other inflammatory chemokines, *CXCL18β* transcription was found to rely on activated Myd88-dependent innate immunity signaling pathway [61, 62]. It was also demonstrated that *CXCL18β* is up-regulated in response to treatment with toxic and pro-apoptotic compounds, which highlights this gene as a marker of inflammation [63]. In our model of LPS-induced acute inflammation, we also found significant changes in these two chemokines. Moreover, the changes in the heart exceeded those found in the kidney, which is the main fish immune organ. It may be related to the presence of high number of endothelial cells in the heart.

Danio rerio have 3 copies of *Mpeg 1* (Macrophage-expressed gene 1): *Mpeg 1.1* and *Mpeg 1.2* expressed in macrophages and exhibit antibacterial activity [21],

whereas *Mpeg 1.3* could be a pseudogene. The *Mpeg 1.1* and *Mpeg 1.2* genes demonstrated differential expression during infection of zebrafish embryos with the bacterial pathogens *Mycobacterium marinum* and *Salmonella typhimurium*. *Mpeg 1.1* was down-regulated during infection with both pathogens, *Mpeg 1.2* was up-regulated. Up-regulation of *Mpeg 1.2* is partially dependent on identified functional *Mpeg 1* and requires the Toll-like receptor adaptor molecule MyD88 and the transcription factor NF-κB [21]. Similar to these results, we observed trends in down-regulation of *Mpeg 1* and up-regulation of *Mpeg 1.2* in all analyzed organs and tissues. These findings demonstrate the mechanisms for compartmentalized inflammation.

Mpx are the molecular markers of zebrafish heterophil granulocytes which play a key role in acute inflammation resembling human neutrophils. Zebrafish heterophils show strong histochemical myeloperoxidase activity, suggesting about presence of existing intracellular peroxidase activity [64]. Zebrafish myeloblasts, promyelocytes, myelocytes, and meta-myelocytes are found in the kidney hematopoietic tissue [65]. It was noted that kidneys in zebrafish are the main immune and hematopoietic organ similar to the human bone marrow [66, 67]. This could partially account for as to why the LPS stimulation most prominently affected proinflammatory genes expression in the kidneys (Figure 3). Meanwhile simultaneous up-regulation of proinflammatory genes was detected in the liver and skeletal muscles but not in the heart presumably related to detected innate immune cells therein.

Due to the high degree of the similarity and other unique properties, *Danio rerio* has the advantage of being relevant model of inflammation that could be

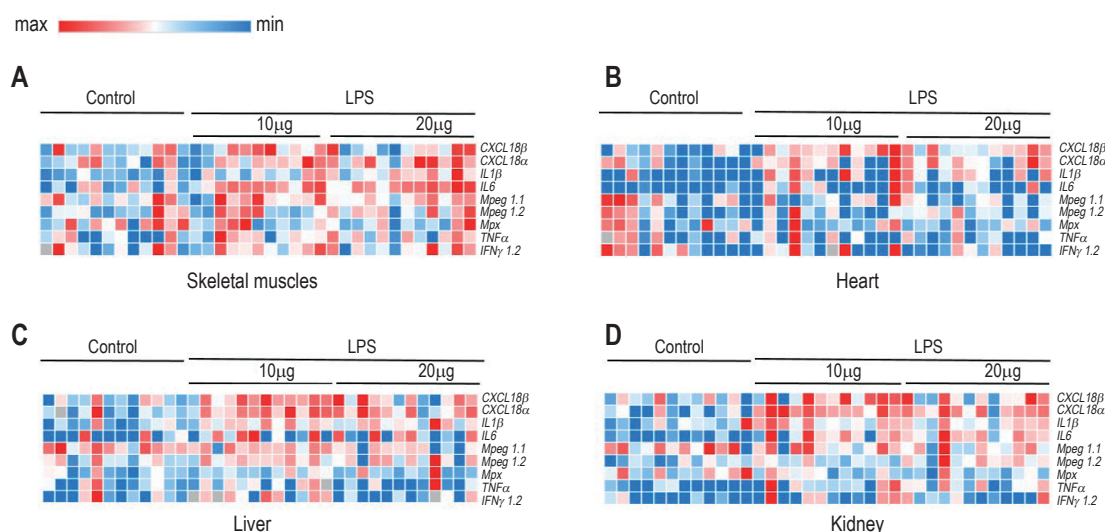


Figure 2. Heatmap of gene expression levels in organs from individual Zebrafishes of different groups

Note. A, muscles. B, heart. C, liver. D, kidney.

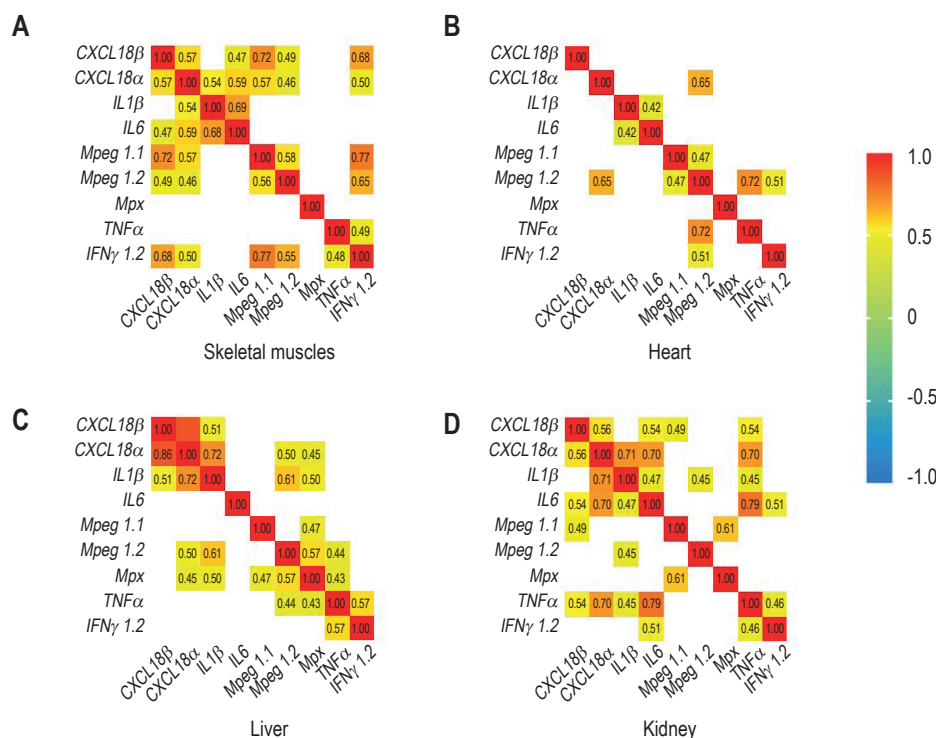


Figure 3. Correlations between levels of genes expression

Note. A, skeletal muscles. B, heart. C, liver. D, kidney. The correlations are presented if $p < 0.01$.

used in different fields, e.g. investigation of disease pathogenesis or drug discovery. Our model demonstrated that the investigation of isolated zebrafish organs could be useful and informative for the investigation of inflammatory processes.

Conclusion

It was found that after generation of lipopolysaccharide induced model of systemic inflammation in adult zebrafish the genes activity was the most pronounced in the heart where the expression of *IL6*, *CXCL8a*, and *CXCL18b* was increased up to 100-fold. The kidneys were the most involved in the

inflammatory process since the highest number of analysed genes were up-regulated there: expression levels of *CXCL18β*, *CXCL8a*, *IL1β*, *IL6*, *Mpeg1.2*, and *TNFα* were significantly increased. The lowest reactivity was detected in the muscles.

Author contributions

Conceptualization, writing, project administration A.G.; methodology A.F. and K.K., investigation M.Y. and A.K.; resources M.V. All authors have read and agreed with the published version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Al-Samadi A., Awad S.A., Tuomainen K., Zhao Y., Salem A., Parikka M., Salo T. Crosstalk between tongue carcinoma cells, extracellular vesicles, and immune cells in *in vitro* and *in vivo* models. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 36, pp. 60123-60134.
2. Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, 2004, Vol. 64, no. 15, pp. 5245-5250.
3. Arnaout R., Ferrer T., Huiskens J., Spitzer K., Stainier D.Y.R., Tristani-Firouzi M., Chi N.C. Zebrafish model for human long QT syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 27, pp. 11316-11321.
4. Asnani A., Peterson R.T. The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. *Dis. Model. Mech.*, 2014, Vol. 7, no. 7, pp. 763-767.
5. Banerjee S., Leptin M. Systemic response to ultraviolet radiation involves induction of leukocytic IL-1β and inflammation in zebrafish. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 3, pp. 1408-1415.
6. Barriuso J., Nagaraju R., Hurlstone A. Zebrafish in oncology. *Aging (Albany NY)*, 2013, Vol. 7, no. 5, pp. 286-287.

7. Bates J.M., Akerlund J., Mittge E., Guillemin K. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host Microbe*, 2007, Vol. 2, no. 6, pp. 371-382.
8. Benard E.L., Racz P.I., Rougeot J., Nezhinsky A.E., Verbeek F.J., Spaink H.P., Meijer A.H. Macrophage-expressed perforins *Mpeg 1* and *Mpeg 1.2* have an anti-bacterial function in zebrafish. *J. Innate Immun.*, 2015, Vol. 7, no. 2, pp. 136-152.
9. Beutler B., Rietschel E.T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, no. 2, pp. 169-176.
10. Ciura S., Lattante S., Le Ber I., Latouche M., Tostivint H., Brice A., Kabashi E. Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, 2013, Vol. 74, no. 2, pp. 180-187.
11. Davidson A.J., Zon L.I. The "definitive" (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene*, 2004, Vol. 23, no. 43, pp. 7233-7246.
12. Dawid I.B. Developmental biology of zebrafish. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2004, Vol. 1038, no. 4, pp. 88-93.
13. de Oliveira S., Reyes-Aldasoro C.C., Candel S., Renshaw S.A., Mulero V., Calado Â. Cxcl8 (IL-8) Mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 8, pp. 4349-4359.
14. Deng Q., Sarris M., Bennin D.A., Green J.M., Herbomel P., Huttenlocher A. Localized bacterial infection induces systemic activation of neutrophils through Cxcr2 signaling in zebrafish. *J. Leukoc. Biol.*, 2013, Vol. 93, no. 5, pp. 761-769.
15. Elamm C., Fairweather D.L., Cooper L.T. Pathogenesis and diagnosis of myocarditis. *Heart*, 2012, Vol. 98, no. 11, pp. 835-840.
16. Forn-Cuní G., Varela M., Pereiro P., Novoa B., Figueras A. Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 41905. doi: 10.1038/srep41905.
17. Francis Stuart S.D., de Jesus N.M., Lindsey M.L., Ripplinger C.M. The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2016, Vol. 91, pp. 114-122.
18. Gupta S., Gupta S. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *Med. Updat* (Vol. 17, 2007), 2007, Vol. 352, no. 16, pp. 44-44.
19. Hendriks-Balk M.C., Michel M.C., Alewijnse A.E. Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data. *Basic Res. Cardiol.*, 2007, Vol. 102, no. 3, pp. 195-197.
20. Herbomel P., Thisse B., Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development*, 1999, Vol. 126, no. 17, pp. 3735-3745.
21. Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 2013, Vol. 496, no. 7446, pp. 498-503.
22. Huang S., Xu M., Liu L., Yang J., Wang H., Wan C., Deng W., Tang, Q. Autophagy is involved in the protective effect of p21 on LPS-induced cardiac dysfunction. *Cell Death Dis.*, 2020, Vol. 11, no. 7, pp. 1-15.
23. Hui S.P., Sheng D.Z., Sugimoto K., Gonzalez-Rajal A., Nakagawa S., Hesselson D., Kikuchi K. Zebrafish regulatory T cells mediate organ-specific regenerative programs. *Dev. Cell*, 2017, Vol. 43, no. 6, pp. 659-672.e5.
24. Imazio M., Gaita F. Diagnosis and treatment of pericarditis. *Heart*, 2015, Vol. 101, no. 14, pp. 1159-1168.
25. Jiang J., Wu S., Wu C., An X., Cai L., Zhao X. Embryonic exposure to carbendazim induces the transcription of genes related to apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.*, 2014, Vol. 41, no. 2, pp. 493-500.
26. Kakihana Y., Ito T., Nakahara M., Yamaguchi K., Yasuda T. Sepsis-induced myocardial dysfunction: Pathophysiology and management. *J. Intensive Care*, 2016, Vol. 4, no. 1, 22. doi: 10.1186/s40560-016-0148-1.
27. Kettleborough R.N.W., Busch-Nentwich E.M., Harvey S.A., Dooley C.M., de Bruijn E., van Eeden F., Sealy I., White R.J., Herd C., Nijman I.J., Fényes F., Mehroke S., Scahill C., Gibbons R., Wali N., Carruthers S., Hall A., Yen J., Cuppen E., Stemple D.L. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*, 2013, Vol. 496, no. 7446, pp. 494-497.
28. Kondratov K., Kurapeev D., Popov M., Sidorova M., Minasian S., Galagudza M., Kostareva A., Fedorov A. Heparinase treatment of heparin-contaminated plasma from coronary artery bypass grafting patients enables reliable quantification of microRNAs. *Biomol. Detect. Quantif.*, 2016, Vol. 8, pp. 9-14.
29. Lagos L., Tandberg J.I., Becker M.I., Winther-Larsen H.C. Immunomodulatory properties of Concholepas concholepas hemocyanin against francisellosis in a zebrafish model. *Fish Shellfish Immunol.*, 2017, Vol. 67, pp. 571-574.
30. Libby P. Interleukin-1 beta as a target for atherosclerosis therapy: biological basis of CANTOS and beyond. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2017, Vol. 70, no. 18, pp. 2278-2289.
31. Lieschke G.J., Currie P.D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.*, 2007, Vol. 8, no. 5, pp. 353-367.
32. MacRae C.A., Peterson R.T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2015, Vol. 14, no. 10, pp. 721-731.

33. Masters S.L., Simon A., Aksentijevich I., Kastner D.L. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 27, no. 1, pp. 621-668.
34. Mazmanian S.K., Cui H.L., Tzianabos A.O., Kasper D.L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell.*, 2005, Vol. 122, no. 1, pp. 107-118.
35. McCurley A.T., Callard G.V. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Mol. Biol.*, 2008, Vol. 9, no. 1, 102. doi: 10.1186/1471-2199-9-102.
36. Meeker N.D., Trede N.S. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Dev. Comp. Immunol.*, 2008, Vol. 32, no. 7, pp. 745-757.
37. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2003, Vol. 284, no. 4, pp. L566-L577.
38. Novoa B., Figueras A. Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012, pp. 253-275.
39. Oehlers S.H., Flores M.V., Okuda K.S., Hall C.J., Crosier K.E., Crosier P.S. A chemical enterocolitis model in zebrafish larvae that is dependent on microbiota and responsive to pharmacological agents. *Dev. Dyn.*, 2011, Vol. 240, no. 1, pp. 288-298.
40. Parish R.C., Evans J.D. Inflammation in chronic heart failure. *Ann. Pharmacother.*, 2008, Vol. 42, no. 7-8, pp. 1002-1016.
41. Renshaw S.A., Loynes C.A., Trushell D.M.I., Elworthy S., Ingham P.W., Whyte M.K.B. Atransgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood*, 2006, Vol. 108, no. 13, pp. 3976-3978.
42. Renshaw S.A., Trede N.S. A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Dis. Model. Mech.*, 2012, Vol. 5, no. 1, pp. 38-47.
43. Rhee C., Klompas M. New sepsis and septic shock definitions. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 2017, Vol. 31, no. 3, pp. 397-413.
44. Russo R.C., Garcia C.C., Teixeira M.M., Amaral F.A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 10, no. 5, pp. 593-619.
45. Sepulcre M.P., Alcaraz-Pérez F., López-Muñoz A., Roca F.J., Mesequer J., Cayuela M.L., Mulero V. Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF-κB activation. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 4, pp. 1836-1845.
46. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Cooper-Smith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*, 2016, Vol. 315, no. 8, pp. 801-810.
47. Snider D.R., Clegg E.D. Alteration of phospholipids in porcine spermatozoa during *in vivo* uterus and oviduct incubation. *J. Anim. Sci.*, 1975, Vol. 40, no. 2, pp. 269-274.
48. Solanas M., Moral R., Escrich E. Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal RNA content in rat mammary tumors. *Anal. Biochem.*, 2001, Vol. 288, no. 1, pp. 99-102.
49. Stockhammer O.W., Zakrzewska A., Hegedüs Z., Spaink H.P., Meijer A.H. Transcriptome profiling and functional analyses of the zebrafish embryonic innate immune response to salmonella infection. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 9, pp. 5641-5653.
50. Sullivan C., Charette J., Catchen J., Lage C.R., Giasson G., Postlethwait J.H., Millard P.J., Kim C.H. The gene history of zebrafish *tlr4a* and *tlr4b* is predictive of their divergent functions. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 9, pp. 5896-5908.
51. Tandberg J., Oliver C., Lagos L., Gaarder M., Yáñez A.J., Ropstad E., Winther-Larsen H.C. Membrane vesicles from *Piscirickettsia salmonis* induce protective immunity and reduce development of salmonid rickettsial septicemia in an adult zebrafish model. *Fish Shellfish Immunol.*, 2017, Vol. 67, pp. 189-198.
52. Tanino Y., Coombe D.R., Gill S.E., Kett W.C., Kajikawa O., Proudfoot A.E.I., Wells T.N.C., Parks W.C., Wight T.N., Martin T.R., Frevert C.W. Kinetics of chemokine-glycosaminoglycan interactions control neutrophil migration into the airspaces of the lungs. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 5, pp. 2677-2685.
53. Trede N.S., Langenau D.M., Traver D., Look A.T., Zon L.I. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*, 2004, Vol. 20, no. 4, pp. 367-379.
54. van der Vaart M., van Soest J.J., Spaink H.P., Meijer A.H. Functional analysis of a zebrafish myd88 mutant identifies key transcriptional components of the innate immune system. *Dis. Model. Mech.*, 2013, Vol. 6, no. 3, pp. 841-854.
55. van Tassell B.W., Toldo S., Mezzaroma E., Abbate A. Targeting interleukin-1 in heart disease. *Circulation*, 2013, Vol. 128, no. 17, pp. 1910-1923.
56. van Tassell B.W., Raleigh J.M.V., Abbate A. Targeting Interleukin-1 in heart failure and inflammatory heart disease. *Curr. Heart Fail. Rep.*, 2015, Vol. 12, no. 1, pp. 33-41.

57. Vandesompele J., de Preter K., Pattyn F., Poppe B., van Roy N., de Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002, Vol. 3, research0034.1. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
58. Watts S.A., Powell M., d'Abramo L.R. Fundamental approaches to the study of zebrafish nutrition. *ILAR J.*, 2012, Vol. 53, no. 2, pp. 144-160.
59. Willett C.E., Cortes A., Zuasti A., Zapata A.G. Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Dev. Dyn.*, 1999, Vol. 214, no. 4, pp. 323-336.
60. Williams M.A. Monocyte anergy in septic shock is associated with a predilection to apoptosis and is reversed by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor *ex vivo*. *J. Infect. Dis.*, 1998, Vol. 178, no. 5, pp. 1421-1433.
61. Yan B., Han P., Pan L., Lu W., Xiong J., Zhang M., Li L., Wen Z. Il-1 β and reactive oxygen species differentially regulate neutrophil directional migration and basal random motility in a zebrafish injury-induced inflammation model. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 12, pp. 5998-6008.
62. Yang L.L., Wang G.Q., Yang L.M., Huang Z.B., Zhang W.Q., Yu L.Z. Endotoxin molecule lipopolysaccharide-induced zebrafish inflammation model: a novel screening method for anti-inflammatory drugs. *Molecules*, 2014, Vol. 19, no. 2, pp. 2390-2409.
63. Zang L., Maddison L.A., Chen W. Zebrafish as a model for obesity and diabetes. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2018, Vol. 6, 91. Doi: 10.3389/fcell.2018.00091.
64. Zapata A., Diez B., Cejalvo T., Gutiérrez-de Frías C., Cortés A. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 2006, Vol. 20, no. 2, pp. 126-136.
65. Zernecke A., Weber C. Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2014, Vol. 34, no. 4, pp. 742-750.
66. Zhang D., Tang J., Zhang J., Zhang D.L., Hu C.X. Responses of pro- and anti-inflammatory cytokines in zebrafish liver exposed to sublethal doses of aphanizomenon flosaquae DC-1 aphanotoxins. *Aquat. Toxicol.*, 2019, Vol. 215, 105269. doi: 10.1016/j.aquatox.2019.105269.
67. Zhang Y., Takagi N., Yuan B., Zhou Y., Si N., Wang H., Yang J., Wei X., Zhao H., Bian B. The protection of indolealkylamines from LPS-induced inflammation in zebrafish. *J. Ethnopharmacol.*, 2019, Vol. 243, 112122. doi: 10.1016/j.jep.2019.112122.

Авторы:

Ма И — к.м.н., научный сотрудник, Институт молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Федоров А.В. — к.б.н., заведующий лабораторией, Институт молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Кондратов К.А. — к.б.н., научный сотрудник, Институт молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Князева А.А. — научный сотрудник, Институт молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Васюткина М.Л. — ветеринарный врач ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Головкин А.С. — д.м.н., руководитель группы генно-клеточной инженерии, Институт молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Ma Yi, PhD (Medicine), Research Associate, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Fedorov A.V., PhD (Biology), Head of Laboratory, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Kondratov K.A., PhD (Biology), Research Associate, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Knyazeva A.A., Research Associate, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Vasyutina M.L., Veterinarian, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Golovkin A.S., PhD, MD (Medicine), Head of the Group of Genetic Cell Engineering, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 11.05.2021
Отправлена на доработку 02.06.2021
Принята к печати 09.06.2021

Received 11.05.2021
Revision received 02.06.2021
Accepted 09.06.2021

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ПРИ БОЛЕЗНИ БЕХЧЕТА, ПРОТЕКАЮЩЕЙ В АССОЦИИ С УВЕИТОМ И БЕЗ ГЛАЗНЫХ ПОРАЖЕНИЙ

Сорожкина Е.С.¹, Кричевская Г.И.¹, Балацкая Н.В.¹, Куликова И.Г.¹, Андрюшин А.Е.¹, Давыдова Г.А.¹, Лисицына Т.А.²

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, Россия

Резюме. Болезнь Бехчета (ББ) — системное заболевание, основу которого составляет хронический васкулит. В патогенезе ББ важную роль играет гиперактивность врожденного и адаптивного иммунитета. Увеит возникает у 30-70% больных, часто рецидивирует и значительно снижает зрительные функции. Цель исследования — изучить особенности системной продукции иммуномедиаторов у пациентов с ББ в зависимости от наличия и активности увеита. 116 пациентов с ББ разделены на 3 группы: 1 (n = 41) — активный увеит (УА), 2 (n = 64) — увеит в ремиссии (УР), 3 (n = 11) — без увеита (БУ). Контрольная группа (КГ) — 34 условно здоровых человека. В сыворотке крови (СК) определяли частоту выявления (%) и содержание (пг/мл) IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-13, IL-18, IFN γ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxin, CXCL1/GRO- α , CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CXCL12/SDF-1 α , GM-CSF, TNF α (мультиплексный анализ, MAGPIX (Luminex Corp., США), наборы Procarta Plex™ “Human Th1/Th2&Chemokine Panel 20 plex” (Bioscience, Австрия); и TGF- β 1, TGF- β 2 (ИФА, тест-системы АО «Вектор-Бест»).

У всех больных с ББ в СК в сравнении с КГ достоверно повышалась частота выявления CXCL1/GRO- α (но не его уровень). У пациентов 1-й и 2-й групп по сравнению с КГ повышались также частота выявления и содержание IL-6, IL-8. В отличие от больных УА и БУ в группе УР достоверно чаще по сравнению с КГ выявлялся IL-4. У пациентов БУ отмечено существенное повышение частоты выявления только CXCL1/GRO- α , уровень иммуномедиаторов не увеличивался. В сравнении с группой УА у пациентов БУ существенно уменьшалась концентрация IFN γ , MCP-1, IP-10, MIP-1 α , SDF-1 α , TGF- β 1; у больных УР дополнительно снижалась концентрация IL-18, Eotaxin, GRO- α , RANTES, TGF- β 2.

Полученные результаты свидетельствуют о важной роли ангиогенных и провоспалительных хемокинов и цитокинов в патогенезе увеитов, ассоциированных с ББ, наличии дисбаланса в продукции разных иммуномедиаторов. Значимое повышение частоты и уровня системной продукции IL-6 и IL-8 у пациентов не только с УА, но и с УР может быть обусловлено длительно сохраняющимся после купирования клинических симптомов слабым интраокулярным воспалением, возможно нуждающимся в терапевтической коррекции.

Ключевые слова: болезнь Бехчета, цитокины, хемокины, увеит активный, увеит в ремиссии

Адрес для переписки:

Сорожкина Екатерина Сергеевна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца»
Министерства здравоохранения РФ
105062, Россия, Москва, ул. Садовая-Черногрозская,
14/19.
Тел.: 8 (962) 922-69-43.
E-mail: skai6@mail.ru

Address for correspondence:

Sorozhkina Ekaterina S.
Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-
Chernogryazskaya str., 14/19.
Phone: 7 (962) 922-69-43.
E-mail: skai6@mail.ru

Образец цитирования:

Е.С. Сорожкина, Г.И. Кричевская, Н.В. Балацкая, И.Г. Куликова, А.Е. Андрюшин, Г.А. Давыдова, Т.А. Лисицына «Особенности системной продукции цитокинов при болезни Бехчета, протекающей в ассоциации с увеитом и без глазных поражений» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1079-1088. doi: 10.15789/1563-0625-FOS-2341
© Сорожкина Е.С. и соавт., 2021

For citation:

E.S. Sorozhkina, G.I. Krichevskaya, N.V. Balatskaya, I.G. Kulikova, A.E. Andryushin, G.A. Davidova, T.A. Lisitsyna “Features of systemic cytokine production in Behcet’s disease associated with uveitis without ocular lesions”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1079-1088. doi: 10.15789/1563-0625-FOS-2341
DOI: 10.15789/1563-0625-FOS-2341

FEATURES OF SYSTEMIC CYTOKINE PRODUCTION IN BEHCET'S DISEASE ASSOCIATED WITH UVEITIS WITHOUT OCULAR LESIONS

Sorozhkina E.S.^a, Krichevskaya G.I.^a, Balatskaya N.V.^a, Kulikova I.G.^a, Andryushin A.E.^a, Davidova G.A.^a, Lisitsyna T.A.^b

^a Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

^b V. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Behcet's disease (BD) is a systemic disease underlyed by chronic vasculitis. Hyperactivity of innate and adaptive immunity plays important role in its pathogenesis. Uveitis occurs in 30-70% of the patients, often recurring and reducing visual function. The objective of our work was to study the features of systemic production of immune mediators in BD patients, depending on presence and activity of uveitis. 116 BD patients were divided into 3 groups: (1) 41 patients with active uveitis (UA), (2) 64 subjects with uveitis remission (UR), (3) 11 uveitis-free BD patients (WU). Control group (CG) comprised 34 conditionally healthy people. Detection rate (%) and contents (pg/ml) were measured for IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-13, IL-18, IFN γ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxin, CXCL1/GRO- α , CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CXCL12/SDF-1 α , GM-CSF, TNF α in blood serum by means of multiplex analysis using MAGPIX analyzer (Luminex Corp., USA), Procarta Plex "Human Th1/Th2&Chemokine Panel 20 plex" kits (Bioscience, Austria). TGF- β 1, TGF- β 2 levels were assayed by ELISA-test ("Vector-Best"). All the BD patients showed high detection rates of CXCL1/GRO- α (but not its level) in comparison with CG. Detection rate and levels of IL-6, IL-8 were increased in 1st and 2nd BD groups, compared to CG. In UR, unlike UA and WU groups, IL-4 was detected more often than in CG. WU patients showed increased detection rate of only CXCL1/GRO- α . When compared with UA, WU patients had lower serum concentrations of IFN γ , MCP-1, IP-10, MIP-1 α , SDF-1 α , TGF- β 1; UR patients also showed decreased serum levels of IL-18, Eotaxin, GRO- α , RANTES, TGF- β 2. Our results indicate the importance of angiogenic and proinflammatory chemokines and cytokines in pathogenesis of BD uveitis, as well as imbalanced production of various immunomediators. Higher detection rates and levels of IL-6 and IL-8 in UA and UR patients may result from weak persistent intraocular inflammation, even upon relief of clinical symptoms, thus, probably, requiring therapeutic correction.

Keywords: Behcet's disease, cytokines, chemokines, active uveitis, uveitis remission

Введение

Болезнь Бехчета (ББ) — тяжелое системное заболевание неясной этиологии предположительно аутоиммунно-аутовоспалительного генеза, в основе которого лежит хронический окклюзивный васкулит [9, 15].

В отличие от классического васкулита, при ББ не развивается истинный некротизирующий васкулит, гранулемы или отложения иммунных комплексов. При гистологическом исследовании выявляют инфильтрацию артерий и вен нейтрофилами и лимфоцитами, что приводит к эндотелиальной дисфункции. Тромбоз бывает приблизительно у 25-30% больных, чаще в венах, чем в артериях. Ключевой фактор, опосредующий тромбоз при ББ, — эндотелиальная дисфункция и нейтрофильное сосудистое воспаление [12, 15].

По разным данным, воспаление сосудистой оболочки глаза (увеит) возникает у 30-70% пациентов ББ [9].

Ассоциированные с ББ увеиты ухудшают зрительные функции, в связи с чем ряд исследова-

ний посвящен изучению иммунных механизмов, лежащих в основе возникновения и рецидивирования интраокулярного воспаления [9, 13].

Проведенная разными авторами оценка системного и локального синтеза цитокинов, как основы иммунопатогенеза увеитов при ББ, весьма противоречива.

Цель исследования — изучить особенности системной продукции цитокинов и хемокинов у пациентов с ББ с активными увеитами, увеитами в ремиссии и без поражения глаз.

Материалы и методы

Обследовано 116 пациентов с ББ. Возраст пациентов варьировал от 19 до 61 года (средний возраст 36,6 $\pm$ 9,9), мужчин 73, женщин 43. Всех пациентов разделили на 3 группы в зависимости от наличия и активности увеита: 1-я группа — 41 человек с активными увеитами (ББ УА); 2-я группа — 64 человека с увеитами в стадии ремиссии (ББ УР); 3-я группа — 11 человек без увеита (ББ БУ). Контрольная группа (КГ) — 34 условно здо-

ровых человека, сопоставимых по полу и возрасту.

ББ диагностировали в ФГБНУ НИИ ревматологии им. В.А. Насоновой в соответствии с принятыми в 2014 г. Международными критериями (International Criteria for Behcet's Disease – ICBBD) [1].

В сыворотке крови (СК) в мультиплексном анализе определяли уровень цитокинов и хемокинов: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p70, IL-13, IL-18, IFN γ , CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxin, CXCL1/GRO- α , CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CXCL12/SDF-1 α , GM-CSF, TNF α . Постановку осуществляли на анализаторе MAGPIX (Luminex Corp.,

США) с диагностическими наборами Procarta Plex™ “Human Th1/Th2&Chemokine Panel 20 plex” (Bioscience, Австрия) [4]. TGF- β 1, TGF- β 2 исследовали в иммуноферментном анализе с тест-системами ЗАО «Вектор-Бест», Кольцово, РФ.

Статистический анализ проводили в программе STATISTICA 12.0, точный критерий Фишера, t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

В малочисленной группе 3 (ББ БУ) IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12p70 обнаружены только в 1 из проб, что ограничивало возможность проведения статистического анализа (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ББ С АКТИВНЫМ УВЕИТОМ, РЕМИССИЕЙ УВЕИТА И БЕЗ ПОРАЖЕНИЯ ГЛАЗ ($M \pm m$, пг/мл) ПО СРАВНЕНИЮ С КОНТРОЛЕМ

TABLE 1. SERUM LEVELS OF CYTOKINES IN BD PATIENTS WITH ACTIVE UVEITIS, UVEITIS IN REMISSION AND WITHOUT UVEITIS ($M \pm m$, pg/ml) COMPARED TO CONTROL

Цитокины Cytokines	Болезнь Бехчета / Behcet's disease (n = 116)						4. Контроль 4. Control (n = 34)
	1. Увеит активный 1. Active uveitis (n = 41)	p	2. Увеит в ремиссии 2. Uveitis in remission (n = 64)	p	3. Без увеита 3. Without uveitis (n = 11)	p	
IFN γ	23 (56%)*	$p_4^{***} = 0,002$	42 (66%)	$p_4 = 0,030$	5 (46%)	$p_4 < 0,05$	30 (88%)
	$4,8 \pm 0,5^{**}$	$p_3^{****} = 0,050$	$6,1 \pm 0,73$	$p_3 = 0,003$	$3,6 \pm 0,3$	$p_1 = 0,050$ $p_2 = 0,003$	$4 \pm 1,1$
IL-1 β	6 (14,6%)		15 (23,4%)		1 (9,1%)		6 (17,6%)
	$4,2 \pm 2,4$		$1,2 \pm 0,2$	$p_4 = 0,0008$			$0,3 \pm 0,1$
IL-2	10 (24%)	$p_4 = 0,002$	12 (18,8%)	$p_4 = 0,001$	2 (18,2%)	$p_4 = 0,012$	22 (64,7%)
	$15,0 \pm 4,6$		$8,5 \pm 2,0$		$16,8 \pm 4,2$		$14,0 \pm 2,2$
IL-4	8 (19,5%)		22 (34%)	$p_4 = 0,012$	1 (9,1%)		3 (8,8%)
	$12,4 \pm 3,6$		$7,8 \pm 1,1$		5,7		$9,4 \pm 1,7$
IL-5	1 (2,4%)		0		1 (9,1%)		1 (2,6%)
	$14,7$				11,8		10
IL-6	8 (19,5%)	$p_4 = 0,028$	21 (32,8%)	$p_4 = 0,002$	1 (9,1%)		1 (2,8%)
	$13,6 \pm 3,3$		$7,6 \pm 1,7$		12,5		0,1
IL-8	9 (21,9%)	$p_4 = 0,011$	13 (20%)	$p_4 = 0,013$	1 (9,1%)		0
	$83 \pm 77,2$		$21,2 \pm 9,4$		2,4		
IL-12p70	17 (41,5%)		32 (50%)		1 (9,1%)	$p_4 = 0,018$	19 (55,9%)
	$3,50 \pm 0,15$	$p_4 = 0,0000$	$4,2 \pm 0,9$	$p_4 = 0,003$	2,8		$1,3 \pm 0,2$
IL-13	15 (36,6%)		25 (39%)		3 (27%)		16 (47%)
	$2,4 \pm 0,7$		$1,9 \pm 0,9$		$2,1 \pm 1,1$		$1,8 \pm 0,3$
IL-18	28 (68%)		44 (68,8%)		9 (81,8%)		22 (64,7%)
	$9,4 \pm 1,9$	$p_4 = 0,03$	$14,9 \pm 2,6$	$p_4 = 0,0005$ $p_3 = 0,01$	$6,5 \pm 1,8$		$4 \pm 1,5$

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Цитокины Cytokines	Болезнь Бехчета / Behcet's disease (n = 116)						4. Контроль 4. Control (n = 34)
	1. Увеит активный 1. Active uveitis (n = 41)	p	2. Увеит в ремиссии 2. Uveitis in remission (n = 64)	p	3. Без увеита 3. Without uveitis (n = 11)	p	
TNF α	13 (31,7%)	p ₄ = 0,001	24 (37,5%)	p ₄ = 0,001	3 (27,3%)	p ₄ = 0,005	27 (79,4%)
	2,8 $\pm$ 0,5		2,9 $\pm$ 0,5		7 $\pm$ 6,2		3 $\pm$ 0,8
MCP-1	41 (100%)		64 (100%)		11 (100%)		34 (100%)
	77,0 $\pm$ 8,2	p ₄ = 0,0001 p ₃ = 0,001	96,4 $\pm$ 14,4	p ₄ = 0,0002 p ₃ = 0,002	35,5 $\pm$ 5,9	p ₄ = 0,00000	144 $\pm$ 14,5
Eotaxin	41 (100%)		64 (100%)		11 (100%)		34 (100%)
	60,6 $\pm$ 6,8	p ₄ = 0,000004	67,6 $\pm$ 4,9	p ₄ = 0,000001 p ₃ = 0,003	42,6 $\pm$ 6,4	p ₄ = 0,000001	168,3 $\pm$ 20,6
GRO- α	25 (61%)	p ₄ = 0,001	32 (50%)	p ₄ = 0,001	5 (45,5%)	p ₄ = 0,047	4 (11,8%)
	29,2 $\pm$ 12,7		21,6 $\pm$ 6,5	p ₃ = 0,038	7,4 $\pm$ 1,1		16,6 $\pm$ 8,0
IP-10	41 (100%)		64 (100%)		11 (100%)		34 (100%)
	51,8 $\pm$ 18,8	p ₃ = 0,042	38,6 $\pm$ 6,7	p ₃ = 0,0003	12,5 $\pm$ 1,2	p ₄ = 0,01	24,0 $\pm$ 4,2
MIP-1 α	29 (70,7%)	p ₄ = 0,008	40 (62,5%)	p ₄ = 0,001	4 (36,4%)	p ₄ = 0,001	33 (97%)
	12,1 $\pm$ 2,1	p ₄ = 0,039 p ₃ = 0,0001	12,2 $\pm$ 2,0	p ₄ = 0,036 p ₃ = 0,001	2,2 $\pm$ 0,7	p ₄ < 0,05	20,0 $\pm$ 3,1
MIP-1 β	40 (97,6%)		62 (96,9%)		11 (100%)		33 (97%)
	85,6 $\pm$ 12,6	p ₄ = 0,0000 p ₃ = 0,0000	96 $\pm$ 11,3	p ₄ = 0,0000 p ₃ = 0,0000	42,1 $\pm$ 8,5	p ₄ = 0,0000	206 $\pm$ 15
RANTES	41 (100%)		64 (100%)		11 (100%)		34 (100%)
	61,3 $\pm$ 5,2	p ₄ = 0,0036	73 $\pm$ 5,2	p ₄ = 0,026 p ₃ = 0,002	45,4 $\pm$ 7,0	p ₄ = 0,0004	108,2 $\pm$ 14,7
SDF-1 α	41 (100%)		64 (100%)		11 (100%)		33 (97%)
	428,4 $\pm$ 19,3	p ₄ = 0,0016 p ₃ = 0,00003	479,9 $\pm$ 26,5	p ₄ = 0,0001 p ₃ = 0,00000	301,4 $\pm$ 20,0		286 $\pm$ 39
GM-CSF	5 (12,2%)	p ₄ = 0,019	6 (9,4%)	p ₄ = 0,002	0	p ₄ = 0,041	13 (38,2%)
	22,8 $\pm$ 5,3		19,5 $\pm$ 3,3				20 $\pm$ 12
TGF- β 1	26 (100%)		48 (100%)		1/1 (100%)		12 (100%)
	34520 $\pm$ 3208	p ₄ = 0,0002	26603 $\pm$ 2114	p ₄ = 0,009	46541		17481 $\pm$ 2617
TGF- β 2	15 (100%)		61 (97%)		5/7 (71%)		22 (100%)
	5177 $\pm$ 807		5175 $\pm$ 502	p ₃ = 0,045	2120 $\pm$ 1405		4401 $\pm$ 1002

Примечание. * – абсолютное число пациентов, у которых в сыворотке выявлен цитокин, в скобках – % выявления;
** – среднее содержание цитокина M $\pm$ m, пг/мл; *** – номер группы, с которой установлены достоверные различия в частоте выявления цитокина; **** – номер группы, с которой установлены достоверные различия в концентрации цитокина.

Note. *, absolute number of patients detected with cytokine in serum, in brackets – % of detection; **, average level of cytokine M $\pm$ m, pg/ml; ***, group number with which significant differences in cytokine detection rate were established; ****, group number with which significant differences in cytokine concentration were established.

ТАБЛИЦА 2. ИЗМЕНЕНИЕ СИСТЕМНОГО ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ ББ С АКТИВНЫМИ УВЕИТАМИ, В РЕМИССИИ И БЕЗ УВЕИТОВ ПО СРАВНЕНИЮ С КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППОЙ

TABLE 2. SYSTEMIC CYTOKINE PROFILE CHANGES IN BD PATIENTS WITH ACTIVE UVEITIS, UVEITIS IN REMISSION AND WITHOUT UVEITIS COMPARED WITH THE CONTROL GROUP

Обследованные группы Groups examined	Показатели повышены Indicators increased ($p < 0,05$)		Показатели снижены Indicators decreased ($p < 0,05$)	
	Частота выявления, % Detection rate, %	Уровень ($M \pm m$), пг/мл Level ($M \pm m$), pg/ml	Частота выявления, % Detection rate, %	Уровень ($M \pm m$), пг/мл Level ($M \pm m$), pg/ml
1. ББ, увеит активный 1. BD, active uveitis	IL-6 (19,5%)* IL-8 (21,9%) GRO- α (61%)	IL-6 ($13,6 \pm 3,3$)** IL-8 ($83,0 \pm 77,2$) IL-12p70 ($3,50 \pm 0,15$) IL-18 ($9,4 \pm 1,9$) SDF-1 α ($428,4 \pm 19,3$) TGF- $\beta 1$ (34520 ± 3208)	IFN γ (56%) IL-2 (24%) TNF α (31,7%) MIP-1 α (70,7%) GM-CSF (12,2%)	MCP-1 ($77,0 \pm 8,2$) Eotaxin ($60,6 \pm 6,8$) RANTES ($61,3 \pm 5,2$) MIP-1 α ($12,1 \pm 2,1$) MIP-1 β ($85,6 \pm 12,6$)
2. ББ, увеит в ремиссии 2. BD, uveitis in remission	IL-4 (34%) IL-6 (32,8%) IL-8 (20%) GRO- α (50%)	IL-6 ($7,6 \pm 1,7$) IL-8 ($21,2 \pm 9,4$) IL-12p70 ($4,2 \pm 0,9$) IL-18 ($14,9 \pm 2,6$) SDF-1 α ($479,0 \pm 26,5$) TGF- $\beta 1$ (26603 ± 2114) IL-1 β ($1,2 \pm 0,2$)	IFN γ (66%) IL-2 (18,8%) TNF α (37,5%) MIP-1 α (62,5%) GM-CSF (9,4%)	MCP-1 ($96,4 \pm 14,4$) Eotaxin ($67,6 \pm 4,9$) RANTES ($73,0 \pm 5,2$) MIP-1 α ($12,2 \pm 2,0$) MIP-1 β ($96,0 \pm 11,3$)
3. ББ, без увеита 3. BD, without uveitis	GRO- α (45%)		IFN γ (46%) IL-2 (18,2%) TNF α (27,3%) MIP-1 α (36,4%) GM-CSF (0) IL-12p70 (9,1%)	MCP-1 ($35,5 \pm 5,9$) Eotaxin ($42,6 \pm 6,4$) RANTES ($45,4 \pm 7,0$) MIP-1 α ($2,2 \pm 0,7$) MIP-1 β ($42,1 \pm 8,5$) IP-10 ($12,5 \pm 1,2$)

Примечание.* – частота выявления в %; ** – средняя концентрация в сыворотке крови, пг/мл.

Note. *, detection rate, %; **, average concentration in blood serum, pg/ml.

Общим для всех пациентов с ББ, независимо от наличия и активности увеита, было существенное по сравнению с КГ увеличение частоты выявления системной продукции хемокина CXCL1/Gro- α (КГ – 11,8%; УА – 61%, $p = 0,001$; УР – 50%, $p = 0,001$; БГП – 45,5%, $p = 0,047$). Концентрация Gro- α в СК была выше при УА ($29,2 \pm 12,7$), снижалась в период ремиссии внутриглазного воспаления ($21,6 \pm 6,5$) и достигала наименьших значений у пациентов без вовлечения глаза ($7,4 \pm 1,1$) (табл. 1, 2).

У пациентов с увеитами, как активными (группа 1), так и в стадии ремиссии (группа 2), по сравнению с КГ (группа 4) достоверно чаще и в более высоких концентрациях выявлялись провоспалительные цитокины IL-6 ($p = 0,028$, $p = 0,002$ соответственно), IL-8 ($p = 0,01$, $p = 0,013$); также в СК определялось высокое содержание IL-18 ($p = 0,03$, $p = 0,0005$), IL-12p70 ($p = 0,0000$, $p = 0,003$), гомеостатического хемокина CXCL12/SDF-1 α с широким спектром действия ($p = 0,0016$, $0,0001$) [3], поливалентного цитокина TGF- $\beta 1$ ($p = 0,0002$, $p = 0,009$) [2] (табл. 1). Напротив, су-

щественно снижались частота выявления в СК IFN γ , IL-2, TNF α , MIP-1 α , GM-CSF и уровень хемокинов MCP-1, Eotaxin, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β (табл. 1, 2)

Среди пациентов с увеитами в стадии ремиссии (группа 2) по сравнению с КГ почти в 4 раза повышалось также число больных с системным синтезом противовоспалительного цитокина IL-4 ($p = 0,012$) при незначительном изменении его концентрации ($p > 0,05$) и существенно увеличивался уровень провоспалительного цитокина IL-1 β ($p = 0,0008$) (табл. 1, 2), что отличало эту группу от пациентов с активными увеитами (группа 1).

У больных с ББ без поражения глаза по сравнению с КГ достоверно повышалась только частота выявления CXCL1/Gro- α ($p = 0,047$). Увеличения уровня исследованных цитокинов и хемокинов в СК не отмечено (табл. 1, 2). Дополнительно к цитокинам и хемокинам, продукция которых существенно снижалась при ББ с увеитами (1-я и 2-я группа) по сравнению с КГ, у пациентов без увеитов достоверно реже по сравне-

нию с контролем выявлялся провоспалительный цитокин IL-12p70 ($p = 0,018$) и снижался уровень провоспалительного хемокина CXCL-10/IP-10 ($p = 0,01$) (табл. 1, 2).

Однонаправленное изменение частоты выявления определенного цитокина и его уровня в СК наблюдалось редко. Только у больных с увеитами (активными и в ремиссии) одновременно обнаружено повышение числа пациентов и средней концентрации IL-6, CXCL8/IL-8, а также снижение этих показателей для хемокина CCL2/MIP-1 α (табл. 1).

Частота выявления в СК исследованных цитокинов и хемокинов между 1-й (активные увеиты) и 2-й группой (увеиты в ремиссии) достоверно не отличалась (табл. 1). Однако в 3 группе (ББ без увеита) обнаружено существенное снижение средней концентрации IFN γ , MCP-1, IP-10, MIP-1 α , SDF-1 α , TGF- β 1 по сравнению с 1-й и 2-й группами с увеитами (табл.3). Уровень IL-18,

Eotaxin, Gro- α , RANTES, TGF- β 2 в группе 3 достоверно снижался только по сравнению с группой 2 (увеиты в ремиссии) (табл. 3).

В таблице 3 представлен спектр цитокинов, сывороточные концентрации которых значимо отличаются у пациентов с ББ и офтальмопатологией от группы больных без вовлечения глаза.

Обсуждение

Таким образом, обнаруживаемые в сыворотке крови цитокины и хемокины и характер их изменений в трех группах пациентов с ББ по сравнению с условно здоровыми лицами (КГ) во многом совпадали, что объясняется общей патогенетической основой системных поражений, но в каждой группе была своя особенность (табл. 3).

В сравнении с условно здоровыми лицами (КГ):

— у всех больных с ББ независимо от наличия и активности увеита достоверно выше ча-

ТАБЛИЦА 3. ЗНАЧИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В СК ПАЦИЕНТОВ С ББ И УВЕИТОМ ПО ОТНОШЕНИЮ К ГРУППЕ БОЛЬНЫХ С ББ БЕЗ ГЛАЗНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ

TABLE 3. SIGNIFICANT CHANGES IN SERUM LEVELS OF CYTOKINES IN BD PATIENTS WITH UVEITIS COMPARED TO BD PATIENTS WITHOUT OCULAR MANIFESTATIONS

Цитокины Cytokines	Группы больных с увеитом Uveitic groups of patients	
	1. Увеит активный 1. Active uveitis	2. Увеит в ремиссии 2. Uveitis in remission
IFN γ	($p = 0,05$)* $\uparrow$	$p = 0,003$ $\uparrow$
IL-18		$p = 0,01$ $\uparrow$
MCP-1	$p = 0,001$ $\uparrow$	$p = 0,002$ $\uparrow$
Eotaxin		$p = 0,003$ $\uparrow$
GRO- α		$p = 0,038$ $\uparrow$
IP-10	$p = 0,042$ $\uparrow$	$p = 0,0003$ $\uparrow$
MIP-1 α	$p = 0,00000$ $\uparrow$	$p = 0,00000$ $\uparrow$
RANTES		$p = 0,002$ $\uparrow$
SDF-1 α	$p = 0,00003$ $\uparrow$	$p = 0,000000$ $\uparrow$
TGF- β 1	$p = 0,0002$ $\uparrow$	$p = 0,009$ $\uparrow$
TGF- β 2		$p = 0,045$ $\uparrow$

Примечание. $\uparrow$ – повышение по сравнению с 3 группой (без глазных проявлений); * p – достоверность различия в содержании цитокинов в СК по сравнению с 3 группой (без глазных проявлений).

Note. $\uparrow$, increase in comparison with group 3 (without ocular manifestations); * p , significance of the difference in serum levels of cytokines compared to 3rd group (without ocular manifestations).

стота выявления в СК ангиогенного хемокина G α ;

- только у пациентов с увеитами (активным и неактивным) провоспалительные цитокины IL-6, IL-8 выявлялись в СК достоверно чаще и в существенно более высоких концентрациях;

- только у больных с увеитами в ремиссии в СК достоверно чаще выявлялся противовоспалительный цитокин IL-4 и существенно повышался уровень провоспалительного цитокина IL-1 β ;

- у пациентов с ББ без увеита отмечено повышение частоты выявления единственного из исследованных факторов — ангиогенного хемокина CXCL1/G α . Дополнительно к обнаруженному в 1 (ББ УА) и 2 (ББ УР) группах снижению уровня хемокинов MCP-1, Eotaxin, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , выявлено также уменьшение концентрации IP-10 и частоты обнаружения IL-12p70.

Межгрупповой анализ показал, что у пациентов с ББ без увеитов достоверно снижался системный уровень ряда цитокинов и хемокинов по сравнению с больными с поражением глаз. В сравнении с группой больных с активным увеитом у пациентов без увеитов в СК существенно уменьшалась концентрация 6 иммуномедиаторов: IFN γ , MCP-1, IP-10, MIP-1 α , SDF-1 α , TGF- β 1; у больных с увеитом в ремиссии дополнительно снижалась концентрация еще 5 факторов: IL-18, Eotaxin, G α , RANTES, TGF- β 2 (табл. 3).

Изучена системная продукция 22 цитокинов и хемокинов у 116 пациентов с ББ с активными увеитами, увеитами в ремиссии и без поражения глаз.

Частота выявления и уровень цитокинов и хемокинов в СК, а также характер их изменений по сравнению с условно здоровыми лицами (КГ) в трех группах пациентов с ББ частично совпадали, что, по-видимому, обусловлено фундаментальными иммунопатогенетическими механизмами, приводящими к манифестации разных клинических форм болезни Бехчета. Однако в каждой из трех групп в сравнении с условно здоровыми лицами (КГ) выявлены отличительные особенности.

Общим для всех пациентов с ББ независимо от наличия или отсутствия увеита и его активности была усиленная по сравнению с контрольной группой продукция проангиогенного хемокина CXCL1/G α , что укладывается в современное представление о ББ как о системном хроническом васкулите. G α относится к подгруппе ELR(+) CXС-хемокинов с сильно выраженным провоспалительным и ангиогенным действием [6, 8, 10]. Показана его важная роль в патогенезе синовита при ББ, ревматоидного артрита,

других системных заболеваний с поражением суставов, а также при синдроме Шегрена [10].

В отличие от поражений суставов в нашем исследовании достоверно повышалась только частота выявления, но не уровень G α в СК по сравнению с условно здоровыми лицами. Важно, что в группе с ремиссией увеита G α обнаружен у половины пациентов, существенно чаще, чем у больных ББ без увеита, что, по нашему мнению, может отражать сохраняющуюся слабую активность внутриглазного воспаления после наступления клинической ремиссии увеита (табл. 2).

У пациентов с ББ и увеитами независимо от их активности в отличие от больных без поражения глаза достоверно усиливалась системная продукция и других провоспалительных и ангиогенных факторов: повышалась частота выявления и концентрация в СК IL-6, IL-8, а также концентрация IL-18, CXCL12/SDF- α [9]. IL-8-хемокин, основной хемоаттрактант для нейтрофилов, играет важную роль в патогенезе ББ и преобладает в гипопионе при ассоциированных с ББ увеитах [7]. Некоторые авторы отметили корреляцию уровня IL-8 с активностью ББ и поражением сосудов [5].

Мы полагаем, что высокая продукция ряда провоспалительных и ангиогенных иммуномедиаторов у пациентов с ББ и ремиссией увеита может отражать наличие субклинической активности интраокулярного воспаления, возможно, нуждающегося в медикаментозной коррекции. Купированию симптомов активности увеита, по-видимому, способствовала системная продукция противовоспалительного цитокина IL-4, выявленного в СК только у пациентов с клинической ремиссией увеита.

Sadeghi A. и соавт. [14] в сходном с нами по дизайну исследовании определяли системную продукцию VEGF, IFN γ , TNF α , IL-17, IL-15, IL-2, IL-10, IL-8, IL-6, IL-4 в трех группах пациентов с ББ, в зависимости от наличия и активности увеита. Они обнаружили достоверное повышение концентрации только IL-2 у больных с активными увеитами по сравнению двумя другими группами. Среди обследованных нами 116 пациентов с ББ существенных отличий в концентрации IL-2 у пациентов с активным увеитом и увеитом в ремиссии не выявлено, что согласуется с результатами Türkçüoğlu P. и соавт. [16]. Нами также отмечено снижение частоты выявления IL-2 в сыворотке пациентов как с увеитами, так и без по сравнению с КГ.

На противоречивость литературных данных, отражающих частоту выявления и концентрацию разных иммуномедиаторов у пациентов с ББ, указывает большинство исследователей. Подобные расхождения связаны со многими фак-

торами, в первую очередь с генетическими особенностями больных, их клиническим статусом в момент обследования и особенностями проводимой терапии. Определенное влияние оказывает подход к оценке результатов, отсутствие в большинстве случаев анализа цитокинового профиля сыворотки в зависимости от наличия увеита, хотя во все обследованные группы входили больные с внутриглазным воспалением [11].

Помимо MIP-1 α и MCP-1 у всех пациентов с ББ существенно по сравнению с КГ уменьшалась частота выявления в СК IFN γ , IL-2, TNF α , GM-CSF и системная продукция Eotaxin, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , обладающих провоспалительными и ангиогенными свойствами.

У пациентов с ББ без интраокулярного воспаления обнаружено также уменьшение частоты выявления IL-12p70 и концентрации IP-10.

Таким образом, общей чертой всех пациентов с ББ, независимо от наличия или отсутствия увеита, была достоверно более высокая по сравнению с КГ частота выявления G α — хемокина с выраженными ангиогенными свойствами, снижение частоты выявления IFN γ , IL-2, TNF α ,

MIP-1 α , GM-CSF и системного уровня MCP-1, Eotaxin, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β .

В группе больных с активным увеитом в СК вместе с G α существенно чаще по сравнению с КГ обнаруживались провоспалительный цитокин IL-6 и провоспалительный хемокин IL-8.

У пациентов с клинической ремиссией увеита эта тенденция сохранялась, однако одновременно в СК появлялся противовоспалительный цитокин IL-4, который, по-видимому, способствовал купированию клинических симптомов воспаления. Остающаяся после наступления клинической ремиссии высокая частота системного синтеза IL-6 и IL-8 могла быть обусловлена слабым воспалительным процессом, сохраняющимся после наступления клинической ремиссии, и нуждается в коррекции терапии.

Заключение

В целом у пациентов с ББ и увеитами дисбаланс системной продукции хемокинов был более выражен по сравнению с группой больных без вовлечения глаз.

Список литературы / References

1. Лисицына Т.А., Алекберова З.С., Голыева Р.Г., Давыдова Г.А. Болезнь Бехчета: клинические проявления, современные принципы диагностики и терапии // Научно-практическая ревматология, 2019. Т. 57, № 5. С. 553-563. [Lisitsyna T.A., Alekberova Z.S., Goloeva R.G., Davydova G.A. Behcet's disease: clinical manifestations, current principles of diagnosis and therapy. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2019, Vol. 57, no. 5, pp. 553-563. (In Russ.)].
2. Москалев А.В., Рудой А.С., Апчел А.В., Зуева В.О., Казимова О.Э. Особенности биологии трансформирующего ростового фактора β и иммунопатология // Вестник Российской военно-медицинской академии, 2016. Т. 2, № 54. С. 206-216. [Moskalev A.V., Rudoy A.S., Apchel A.V., Zueva V.O., Kazimova O.E. Features of biology of transforming growth factor β and immunopathology. *Vestnik Rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii = Vestnik of Russian Military Medical Academy*, 2016, Vol. 2, no. 54, pp. 206-216. (In Russ.)].
3. Прохорова О.В., Олина А.А., Толибова Г.Х., Траль Т.Г. Стромальный клеточный фактор роста: патоморфологический и клинический потенциал // РМЖ. Мать и дитя, 2020. Т. 3, № 3. С. 198-204. [Prokhorova O.V., Olina A.A., Tolibova G.Kh., Tral T.G. Stromal cell-derived factor: pathological and clinical potentialities. *RMZh. Mat i ditya = Russian Journal of Woman and Child Health. Mother and Child*, 2020, Vol. 3, no. 3, pp. 198-204. (In Russ.)].
4. Сорожкина Е.С., Балацкая Н.В., Давыдова Г.А., Лисицына Т.А. Скрининг цитокинов в сыворотке крови больных с поражением глаз при болезни Бехчета // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, Специальный выпуск. С. 225. [Sorozhkina E.S., Balatskaya N.V., Davidova G.I., Lisitsyna T.A. Cytokine screen in serum of BD patients with eye lesions. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, Special Iss., p. 225. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-0.
5. Akkurt Z.M., Bozkurt M., Uçmak D., Yüksel H., Uçak H., Sula B., Gürsel Özkurt Z., Yildiz M., Akdeniz D., Arica M. Serum cytokine levels in Behçet's disease. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2015, Vol. 29, no. 4, pp. 317-320.
6. Bechara C., Chai H., Lin P.H., Yao Q., Chen C. Growth related oncogene-alpha (GRO-alpha): roles in atherosclerosis, angiogenesis and other inflammatory conditions. *Med. Sci. Monit.*, 2007, Vol. 13, no. 6, RA87-90.
7. Durmazlar S.P., Ulkar G.B., Eskioglu F., Tatlican S., Mert A., Akgul A. Significance of serum interleukin-8 levels in patients with Behçet's disease: high levels may indicate vascular involvement. *Int. J. Dermatol.*, 2009, Vol. 48, no. 3, pp. 259-264.
8. Erdem H., Pay S., Serdar M., Simşek I., Dinç A., Muşabak U., Pekel A., Turan M. Different ELR (+) angiogenic CXC chemokine profiles in synovial fluid of patients with Behçet's disease, familial Mediterranean fever, rheumatoid arthritis, and osteoarthritis. *Reumatol. Int.*, 2005, Vol. 26, no. 2, pp. 162-167.
9. Ksiaa I., Abroug N., Kechida M., Zina S., Jelliti B., Khohtali S., Attia S., Khairallah M. Eye and Behçet's disease. *J. Fr. Ophthalmol.*, 2019, Vol. 42, no. 4, pp. e133-e146.

10. Lisi S., Sisto M., Lofrumento D.D., d'Amore M., de Lucro R., Ribatti D. A potential role of the GRO- α /CXCR2 system in Sjögren's syndrome: regulatory effects of pro-inflammatory cytokines. *Histochem. Cell Biol.*, 2013, Vol. 139, no. 2, pp. 371-379.
11. Lopalco G., Lucherini O.M., Vitale A., Talarico R., Lopalco A., Galeazzi M., Lapadula G., Cantarini L., Iannone F. Putative role of serum amyloid-A and proinflammatory cytokines as biomarkers for behcet's disease. *Medicine (Baltimore)*, 2015, Vol. 94, no. 42, e1858. doi: 10.1097/MD.0000000000001858.
12. Mendes-Frias A., Santos-Lima B., Furtado D.Z.S., Rupes F.J., Assunção A., Matias M.J., Gomes V., Gaifem J., Barbas G., Castro A.G., Capela C., Silvestre R. Dysregulation of glycerophospholipid metabolism during Behçet's disease contributes to a pro-inflammatory phenotype of circulating monocytes. *J. Transl. Autoimm.*, 2020, Vol. 3, 10056. doi: 10.1016/j.jtautj.2020.100056.
13. Mesquida M., Molins B., Llorenç V., Sainz de la Maza M., Hernandez M.V., Espinosa G., Adán A. Proinflammatory cytokines and C-reactive protein in uveitis associated with Behçet's disease. *Mediators Inflamm.*, 2014, 396204. doi: org/10.1155/2014/396204.
14. Sadeghi A., Davatchi F., Shahram F., Karimimoghadam A., Alikhani M., Pezeshgi A., Mazloomzadeh S., Sadeghi-Abdollahi B., Asadi-Khiavi M. Serum profiles of cytokines in Behcet's disease. *J. Clin. Med.*, 2017, Vol. 6, no. 5, 49. doi: 10.3390/jcm6050049
15. Tong B., Liu X., Xiao J., Su G. Immunopathogenesis of Behcet's disease. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 665. doi: 10.3389/fimmu.2019.00665.
16. Türkçüoğlu P., Arat Y.O., Kan E., Kan E.K., Chaudhry I.A., Koca S., Çeliker Ü., İlhan N. Association of disease activity with serum and tear IL-2 levels in Behçet disease. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, 2016, Vol. 24, no. 3, pp. 313-318.

Авторы:

Сорожкина Е.С. — научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кричевская Г.И. — к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Балацкая Н.В. — к.б.н., начальник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Куликова И.Г. — старший научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Sorozhkina E.S., Research Associate, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Krichevskaya G.I., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Balatskaya N.V., PhD (Biology), Head, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Kulikova I.G., Senior Research Associate, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Андрюшин А.Е. — научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Давыдова Г.А. — к.м.н., научный сотрудник отдела патологии сетчатки, врач-офтальмолог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Лисицына Т.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории сосудистой ревматологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, Россия

Andryushin A.E., Research Associate, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Davidova G.A., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Clinical Ophthalmologist, Department of Retinal and Optic Nerve Disorders, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Lisitsyna T.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Vascular Rheumatology, V. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russian Federation

Поступила 16.04.2021
Отправлена на доработку 26.04.2021
Принята к печати 18.05.2021

Received 16.04.2021
Revision received 26.04.2021
Accepted 18.05.2021

ВЛИЯНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЫ НА УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ И УСТОЙЧИВОСТЬ МИОКАРДА К ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ У КРЫС С СИНДРОМОМ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА

Борщев Ю.Ю.^{1,3}, Буровенко И.Ю.¹, Карасева А.Б.², Минасян С.М.^{1,5},
Процак Е.С.^{1,5}, Борщев В.Ю.⁵, Семенова Н.Ю.¹, Борщева О.В.¹,
Суворов А.Н.^{2,4}, Галагудза М.М.^{1,5}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ООО «НИЦ Пробиокод СП», Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Избыточная масса тела и ожирение являются одним из основных факторов сердечно-сосудистого риска, однако данные проспективных исследований зависимости рациона питания с высоким содержанием жиров и увеличения массы тела противоречивы. Разные типы жиров имеют разный метаболический эффект, и это обстоятельство обуславливает разницу в степени риска, связанного с увеличением массы тела. Необходимо экспериментальное изучение влияния качественного состава жиров в ежедневном рационе на иммунологический статус и устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению при биомедицинском моделировании.

Цель работы — изучение влияния качественного состава высокожировой диеты, применявшейся для индукции первичного висцерального ожирения (ПВО) у крыс с синдромом системной воспалительной реакции (ССВР), на устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению и уровни про- и противовоспалительных цитокинов.

Эксперименты были выполнены на взрослых крысах-самцах стока Вистар с ПВО, вызванным 28-дневным введением в рацион одного из четырех видов жиров: гидрогенизированных жиров (ГЖ),

Адрес для переписки:

Галагудза Михаил Михайлович
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ
197341, Россия, Санкт-Петербург, пр. Пархоменко, 15а.
Тел.: 8 (812) 702-37-00.
Факс: 8 (812) 702-37-01.
E-mail: galagudza@almazovcentre.ru

Address for correspondence:

Galagudza Michael M.
V. Almazov National Medical Research Centre
197341, Russian Federation, St. Petersburg,
Parkhomenko ave., 15a.
Phone: 7 (812) 702-37-00.
Fax: 7 (812) 702-37-01.
E-mail: galagudza@almazovcentre.ru

Образец цитирования:

Ю.Ю. Борщев, И.Ю. Буровенко, А.Б. Карасева, С.М. Минасян, Е.С. Процак, В.Ю. Борщев, Н.Ю. Семенова, О.В. Борщева, А.Н. Суворов, М.М. Галагудза «Влияние качественного состава высокожировой диеты на уровень цитокинов и устойчивость миокарда к ишемии-реперфузии у крыс с синдромом системного воспалительного ответа» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1089-1104. doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2166
© Борщев Ю.Ю. и соавт., 2021

For citation:

Yu. Yu. Borshchev, I. Yu. Burovenko, A. B. Karaseva, S. M. Minasyan, E. S. Protsak, V. Yu. Borshchev, N. Yu. Semenova, O. V. Borshcheva, A. N. Suvorov, M. M. Galagudza "Effect of the qualitative composition of a high-fat diet in rats with systemic inflammatory response syndrome upon myocardial resistance to ischemic-reperfusion injury and cytokine levels", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1089-1104. doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2166
DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2166

растительного масла (РМ), животного жира (ЖЖ) или молочного жира (МЖ). Модель ССВР включала сочетание химически индуцированного колита (ХИК) и внутрижелудочное введение смеси антимикробных препаратов (АМП) широкого спектра действия в течение трех дней. Через 5 дней проводили иммунологические и биохимические исследования, изучали состав кишечной микробиоты в фекалиях, морфологические изменения структуры толстой кишки, гемодинамические параметры и устойчивость миокарда к ишемическому реперфузионному повреждению на модели перфузии изолированного сердца по Лангендорфу.

У животных с ССВР произошло значимое увеличение концентрации провоспалительных цитокинов — фактора некроза опухолей- α , интерлейкинов (IL-1 α , IL-2, IL-8), а также уменьшение противовоспалительного цитокина трансформирующего фактора роста-1 β . ССВР сопровождалась выраженными нарушениями пищевого поведения и эвакуаторной функции желудочно-кишечного тракта. Минимальные изменения состава кишечной микробиоты, а также максимально выраженные признаки регенерации кишечного эпителия отмечены у крыс в группе с введением МЖ. Была отмечена тенденция к увеличению размера инфаркта во всех группах по сравнению с контролем, прямо коррелируя с увеличением продукции BDNF и IL-2, однако значимое увеличение размера инфаркта было обнаружено только в группе, получавшей молочный жир, что указывает на снижение устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению (ИРП).

Таким образом, наличие ССВР на фоне ПВО характеризуется контролируемым изменением маркеров воспаления и зависит от качества жиров в рационе. Степень ухудшения морфофункциональных характеристик изолированного сердца, в том числе снижение устойчивости к ИРП, коррелирует с концентрацией BDNF и IL-2 при изученном сроке наблюдения.

Ключевые слова: растительные жиры, животные жиры, синдром системной воспалительной реакции, цитокины, антибиотик-индуцированный дисбиоз, изолированное сердце, размер инфаркта

EFFECT OF THE QUALITATIVE COMPOSITION OF A HIGH-FAT DIET IN RATS WITH SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME UPON MYOCARDIAL RESISTANCE TO ISCHEMIC-REPERFUSION INJURY AND CYTOKINE LEVELS

Borshchev Yu.Yu.^{a,c}, Burovenko I.Yu.^a, Karaseva A.B.^b,
Minasyan S.M.^{a,e}, Protsak E.S.^{a,e}, Borshchev V.Yu.^e, Semenova N.Yu.^a,
Borshcheva O.V.^a, Suvorov A.N.^{b,d}, Galagudza M.M.^{a,e}

^a V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

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

^c Ltd "SRC PROBIOKOD SP", Moscow, Russian Federation

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

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

Abstract. Overweight and obesity are among the main factors of cardiovascular risk, but the prospective studies on the dependence between high-fat diets and weight gain yielded contradictory results. Different types of fats exert varying metabolic effects, and this fact leads to a difference in the risk associated with increasing body weight. The effects of fat quality in the daily diet on immunological status and resistance of myocardium to ischemic-reperfusion damage should be studied experimentally in biomedical models. The purpose of this work was to assess the effect of the qualitative composition of a high-fat diet used for induction of primary visceral obesity (PVO) in rats with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) upon myocardial resistance to ischemic-reperfusion injury, and levels of pro- and anti-inflammatory cytokines.

The experiments were performed on adult male Wistar rats with PVO caused by 28-day consumption of any fat types: hydrogenated fats (HF), vegetable oils (VO), animal fats (AF) or milk fat (MF). The SIRS model

included a combination of chemically induced colitis (CIC) and intragastric injection of a broad-spectrum antimicrobial agent (AMA) for three days. Five days later, immunological and biochemical studies were conducted, as well as composition of intestinal microbiota in faecal samples, morphological changes in the structure of the large intestine, hemodynamic parameters and myocardial resistance to ischemic-reperfusion injury were studied in the model of isolated heart perfusion, by Langendorff technique.

There was a significant increase in the concentration of anti-inflammatory cytokines in animals with SIRS, i.e., $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\alpha$, IL-2 , IL-8 , as well as a decrease in $\text{TGF-1}\beta$, an anti-inflammatory cytokine. SIRS was accompanied by severe dietary disorders and evacuatory function of the gastrointestinal tract. Minimal changes in the intestinal microbiota composition, as well as the most pronounced regeneration signs of intestinal epithelium was observed in rats in the group with MF injection. There was a trend for increasing size of infarction in all the groups as compared with control, directly correlating with increase in BDNF and IL-2 production. However, a significant increase in the infarction size was found only in the group receiving milkfat, thus suggesting a decrease in myocardial resistance to ischemic reperfusion injury (IRI).

Thus, the presence of SIRS in the primary obesity model is characterized by controllable change of inflammation markers and depends on the quality of dietary fats. The degree of morphofunctional deterioration of isolated heart, including a decrease in resistance to ischemia-reperfusion injury, correlates with the concentration of BDNF and IL-2 during the studied observation terms.

Keywords: vegetable fats, animal fats, systemic inflammatory response syndrome, cytokines, antibiotic-induced dysbiosis, isolated heart, infarction size

Введение

Эпидемиологические исследования показывают, что ожирение связано с более высокими рисками заболеваемости, нетрудоспособности и смертности [45]. Избыточная масса тела является фактором риска развития многих социально значимых заболеваний в странах Европы, в которых с ожирением ежегодно ассоциированы свыше 1 млн смертей и 12 млн лет жизни, утраченных в результате инвалидности [27]. В крупных проспективных эпидемиологических исследованиях подтверждена необходимость борьбы с ожирением и его последствиями. Последнее в особенности касается проблемы качественного состава потребляемого избыточного количества пищи, включая потребление дешевых жиров [30]. Следует учитывать, что среди внушительного числа факторов, определяющих развитие ожирения, качественный состав жиров в повседневном рационе занимает лидирующее место. С определенными допущениями можно утверждать, что ожирение развивается при увеличении калорийской ценности потребляемой пищи в том случае, если поступление энергии в течение длительного времени доминирует над ее расходом [35]. Данные проспективных исследований зависимости рациона питания с высоким содержанием жиров и увеличения массы тела противоречивы [39]. Разные варианты жиров обладают различным метаболическим действием, и это обстоятельство обуславливает неодинаковую степень риска, связанного с превышением нормальной

массы тела [40]. Анализ экспериментальных исследований на животных свидетельствует о том, что насыщенные жирные кислоты в основном депонируются в адипоцитах в виде триацилглицеридов, тогда как ненасыщенные жирные кислоты чаще подвергаются бета-окислению и утилизации. Значительно реже анализируются метаболические эффекты прочих типов жиров, отличающихся по своему составу, что в значительной степени связано с методическими сложностями, возникающими при определении добровольного потребления жирных кислот. Учитывая общепризнанный факт связи ожирения, а также развития сердечно-сосудистых заболеваний с изменениями состава кишечной микробиоты, в данном исследовании нами была предпринята попытка изучения влияния качественного состава жиров в ежедневном рационе на иммунологический статус и устойчивость миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению (ИРП) на модели ССВР у крыс [1, 2].

Целью данного исследования было определение влияния качественного состава жиров в ежедневном рационе на процесс воспаления в модели ССВР у крыс, вызванной химически индуцированным воспалением стенки толстой кишки и осложненной АИД. Дополнительно у животных изучали изменения толерантности миокарда к ИРП и оценивали изменения клеточной картины крови, а также ее биохимических показателей. Возникающие изменения анализировали во взаимосвязи с микробиологическим составом фекалий.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на крысах-самцах стока Wistar улучшенного конвенционального статуса массой 340–370 г в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных». Животных рандомизировали в одну из шести экспериментальных групп ($n = 10$ в каждой группе): 1 – контроль (КРТ): крысы получали стандартный корм без ограничений; 2 – СТК: у крыс на стандартном корме на 31-й день моделировали ССВР одноразовым введением в прямую кишку 1 мл смеси 3%-ного раствора уксусной кислоты и этанола (ХИК), вызывая химически индуцированный колит (ХИК), являющийся моделью острого воспаления толстой кишки (ОВТК). Далее в течение трех дней перорально вводили 1 мл смеси амоксициллина, метронидазола и кларитромицина в суточной дозе по 15 мг каждого препарата [1]. Через 5 дней, при продолжении скармливания соответствующего корма, животных вводили в состояние общей анестезии фораном, брали цельную кровь из задней полый вены для гематологического, биохимического и иммунологического анализа; 3 – ГЖ: у крыс на стандартной диете с моделированием ССВР в данной группе вызывали первичное висцеральное ожирение (ПВО) ежедневным введением *per os* в течение 37 дней по 2 г гидрогенизированных жиров и 1 г сахара; 4, 5, 6 – крысам данных групп осуществлялись те же манипуляции, что и в группе ГЖ, однако вместо гидрогенизированного жира вводили либо 2 г животного жира (группа ЖЖ), либо молочного жира (группа МЖ), либо растительного масла (группа РМ) соответственно.

Клинический анализ крови выполняли на автоматическом ветеринарном гематологическом анализаторе (URIT-3000 Vet Plus, URIT Medical Electronic, Китай). Концентрацию глюкозы (ГЛ), триглицеридов (ТГ), белка, мочевины (МКТ), мочевины (МЧН) и щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли с помощью биохимического анализатора (BioChem Analette, HTI, США). Уровень фактора некроза опухолей-альфа (TNF α), трансформирующего фактора роста бета-1 (TGF- β 1), мозгового нейротрофического фактора (BDNF), интерлейкинов (IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10), липополисахарида (LPS) оценивали иммуноферментным методом (MR-96A, Mindray, Китай). У 8 крыс из каждой группы осуществляли торакотомию и забор сердца для перфузии по Лангендорфу [3]. В ходе эксперимента осуществляли непрерывную запись частоты сердечных сокращений (уд/мин), коронарно-

го потока (мл/мин.), конечно-диастолического (КДДЛЖ, мм рт. ст.) и систолического (СДЛЖ, мм рт. ст.) давления в левом желудочке на персональном компьютере с помощью программы PhysExp 3.0 [4]. Период тотальной ишемии составлял 30 минут, после чего следовала реперфузия продолжительностью 90 мин. Затем осуществляли количественную гистохимическую детекцию размера инфаркта путем окраски срезов сердца трифенилтетразолием хлоридом (1%). Размер инфаркта выражали в процентах от общей площади среза и вычисляли среднее значение для данного сердца по результатам анализа 5 срезов. Посмертно измерялась масса висцерального жира и внутренних органов. Осуществляли отбор проб фекалий для исследования количественного состава микрофлоры толстой кишки. Использовали метод ПЦР-РВ с применением реагентов для выделения ДНК (QIAamp DNA Stool Mini Kit, США, Интерлаб-сервис) и наборов «Колонофлор-16» (ООО «Альфалаб», Санкт-Петербург). Для гистологического контроля проводили забор фрагментов толстой кишки в области видимого поражения. Фиксация осуществлялась в 10%-ном растворе забуференного формалина. Обезвоживание и пропитывание парафином проводили по стандартизированной методике в автоматическом гистологическом процессоре Excelsior AS (Thermo, США) в готовом растворе IsoPREP («Биовитрум», Россия) и парафиновой среде HISTOMIX («Биовитрум», Россия). С использованием ротационного микротомы HM 325 (Thermo, США) изготавливали срезы толщиной 3–5 мкм, которые в дальнейшем депарафинировали, дегидратировали, окрашивали гематоксилином-эозином в соответствии с рекомендациями производителя («Биовитрум», Россия). Оценку клинического состояния животных, потребления корма и воды, а также массы тела животных производили ежедневно с 9 до 10 утра.

Для каждого из определяемых показателей рассчитывали среднее значение (M) и ошибку среднего ($\pm m$). Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни (программный пакет STATISTICA 9.0). Корреляционный анализ ряда показателей проводился на основе критерия Спирмена. Для проверки различий микробного состава между группами крыс был использован критерий Краскела–Уоллиса. В качестве данных для анализа использовались десятичные логарифмы полученных значений КОЕ/г для каждой из определяемых групп бактерий методом ПЦР-РВ. Значимыми считались различия при $p < 0,05$.

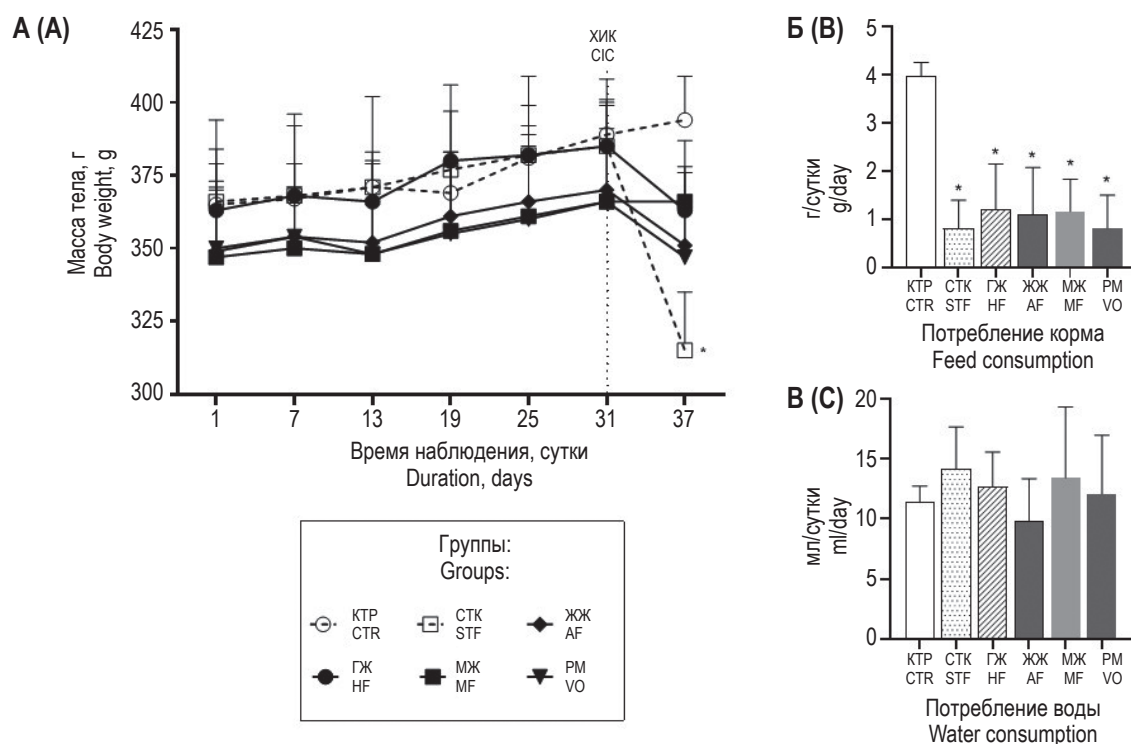


Рисунок 1. Динамика изменения массы тела крыс в группе, потребление воды, корма из расчета г, мл на 100 грамм массы тела крыс

Примечание. КТР – контроль, СТК – стандартный корм, ГЖ – гидрогенизированный жир, ЖЖ – животный жир, МЖ – молочный жир, РМ – растительные масла. * – достоверные отличия при $p < 0,05$ по отношению к КТР.

Figure 1. Dynamics of changes in body weight of rats in a group, water consumption, food consumption based on g, ml per 100 grams of rats' body weight

Note. CTR, control; STF, standard feed; HF, hydrogenated fat; AF, animal fat; MF, milk fat; VO, vegetable oil. *, significant ($p < 0.05$) differences relative to the control group (CTR).

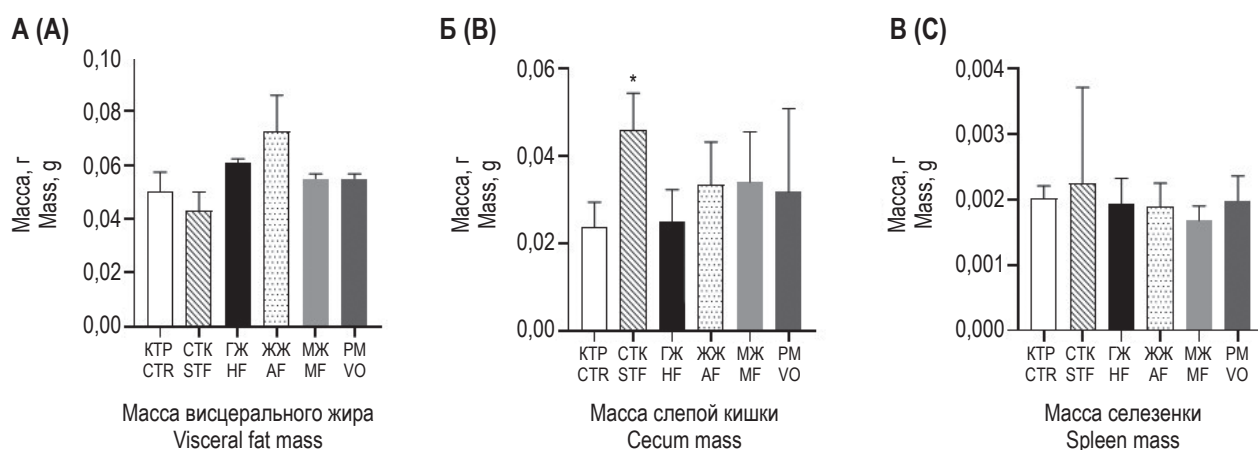


Рисунок 2. Коэффициент отношения массы внутренних органов к массе тела

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Coefficient of the ratio of internal organs mass to body mass

Note. As for Figure 1.

Результаты

Масса тела крыс, получавших жируглевую диету, на момент моделирования ССВР существенно не отличалась от контроля, однако через 7 дней после моделирования ХИК масса тела у крыс в группах СТК уменьшилась на 20% ($p < 0,05$). При этом у животных, получавших дополнительно различные жиры, этот показатель снизился не более чем на 6% (рис. 1А).

У крыс в группах с ЖУД потребление корма и воды в течение опыта было близко к показателям в группе КТР. В группах СТК и МЖ после ХИК потребление воды увеличилось на 25% и 19%, а в группе ЖЖ уменьшилось на 14% по отношению к КТР ($p > 0,05$). Потребление корма снизилось в 3 и более раз во всех группах после ХИК ($p < 0,05$), причем в группах СТК и РМ это снижение было максимальным, а в группе МЖ — минимальным (рис. 1Б, В).

Для объективной оценки изменения массы органов мы вычисляли коэффициент отношения массы органа к массе тела у крыс в группе без массы внутренних органов, т.к. отек внутренних органов и нарушение транзита химуса вносили существенный вклад. У крыс в группах ГЖ и ЖЖ масса висцерального жира была увеличенной на 21% и 45% соответственно, а для групп МЖ и РМ — на 10%, что показывает эффективность предложенной нами методики дозированной ЖУД для моделирования ПВО и влияние качества жиров на динамику изменения массы тела (рис. 2А, Б). Картина изменения отношения массы печени, почек и селезенки к массе тела показана на рисунке 2В.

Показатели крови

Гематологические показатели в исследованных группах животных отличались увеличением числа лейкоцитов на 100% в группах СТК и ГЖ и на 40% в группах ЖЖ и РМ по отношению к контролю. Также в группах ГЖ и ЖЖ наблюдалось увеличение числа тромбоцитов более чем на 20%. В группах ГЖ, ЖЖ, МЖ, РМ концентрация глюкозы в крови стала больше от 40% до 61%, с наименьшим показателем для группы РМ. Моделирование ССВР вызвало кратное увеличение уровня ТГ во всех опытных группах по отношению к контролю, однако в группе ГЖ это значение было минимальным. Статистически значимым стало снижение концентрации общего белка во всех группах с ХИВЗТК, что согласуется со снижением потребления корма ($p < 0,05$). Уровень мочевой кислоты в группах с моделированием ССВР увеличился более чем в 2 раза в группах СТК, ЖЖ и РМ ($p < 0,05$). В группе ГЖ значе-

ние этого показателя увеличилось незначительно. Существенное, почти 2-кратное увеличение уровня мочевины и щелочной фосфатазы отмечено в крови у крыс из группы СТК, но статистически эта разница не проявилась (табл. 1).

Уровень $\text{TNF}\alpha$ был значимо выше во всех группах после ХИВЗТК, без проявления специфической зависимости от качества жиров в диете, тогда как показатели концентрации других провоспалительных цитокинов ($\text{IL-1}\alpha$, IL-2 , IL-8) существенно отличались в подопытных группах в зависимости от вводимых жиров. Статистически значимое увеличение в крови $\text{IL-1}\alpha$ более чем в 2 раза отмечено в группах СТК и МЖ, тогда как в группах ГЖ и РМ этот показатель был немногим больше, чем в контроле, а в группе ЖЖ даже меньше на 25%. Тенденция к снижению концентрации IL-6 по отношению к контролю проявилась во всех опытных группах. Парадоксальностью отмечена различная направленность изменений показателей концентрации IL-8 : в группах СТК и МЖ он увеличился в 5 и 2 раза соответственно, в группах ГЖ, ЖЖ и РМ уменьшился более чем в 2 раза ($p < 0,05$) (табл. 2). Для противовоспалительных цитокинов IL-10 и $\text{TGF-}\beta 1$ также не отмечено однозначности тенденций. Снижение уровня $\text{TGF-}\beta 1$ в крови стало максимальным в группе СТК, почти в 6 раз, а у крыс в группах с введением жиров от 3 до 4 раз ($p < 0,05$). Уровень ЛПС в группе СТК увеличился более чем в 20 раз, а в группах с ЖУД — от 3 до 10 раз ($p < 0,05$).

Концентрация IL-2 кратно увеличилась в крови у крыс во всех опытных группах, за исключением группы ГЖ, причем аналогичные тенденции изменений характерны и для уровня BDNF (рис. 3А, Б).

Состав кишечной микрофлоры

В группе СТК на фоне воспаления и терапии антибиотиками было снижено общее число бактерий по отношению к группе КТР. Число лактобацилл в фекалиях снижено в группах СТК, ЖЖ и МР, при этом в группах ГЖ и МЖ число лактобацилл не отличалось от контрольной группы. Уровень бифидобактерий в данном эксперименте был повышен во всех группах относительно контроля. В группах ГЖ, ЖЖ и МР обнаружено повышенное количество *E. coli*, хотя численность этих бактерий не отличалась от контроля в группе СТК. В этой же группе, получавшей антибиотик после ХИК, отмечено сниженное число *Bacteroides fragilis* и *Faecalibacterium prausnitzii*, а также представителей *Citrobacter spp.*/*Enterobacter spp.*, но при этом в группах с жировой диетой такого эффекта не наблюдалось (за

ТАБЛИЦА 1. БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ КРЫС В ГРУППАХ ПО ОКОНЧАНИИ ЭКСПЕРИМЕНТА (n = 10 В КАЖДОЙ ГРУППЕ)

TABLE 1. BIOCHEMICAL BLOOD PARAMETERS OF RATS IN GROUPS AT THE END OF THE EXPERIMENT (n = 10 IN EACH GROUP)

Группа Group	Глюкоза (мг/дл) Glucose (mg/dl)	ТГ (ммоль/л) TG (mmol/l)	Белок (г/л) Protein (g/l)	Мочевая к-та (нмоль/л) Uric Acid (nmol/l)	Мочевина (ммоль/л) Urea (mmol/l)	ЩФ (ед/л) ALP (U/l)
КТР CTR	11±2	0,33±0,05	65±2	38,0±14,2	6,4±1,9	25±6
СТК STF	12±4	1,21±0,76	52±2*	98,0±9,1*	11,4±2,9	48±15
ГЖ HF	18±4	0,71±0,54	56±2*	52,0±18,1	7,3±1,3	37±12
ЖЖ AF	17±8	1,17±0,51	53±3*	117±32*	7,6±2,1	43±14
МЖ MF	17±2	0,73±0,19	53±2*	70±34	8,3±1,1	27±6
МР VO	16±3	0,86±0,31	54±2*	87±16*	7,1±2,0	59±28

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой КТР.

Note. *, $p < 0.05$ compared with the CTR group.

исключением группы ЖЖ, в которой было также снижено число бактериоидов). Отмечена тенденция к появлению протей на фоне приема антимикробных препаратов, но достоверных различий с контрольной группой не обнаружено. В группах СТК, ГЖ, ЖЖ и МЖ протей был обнаружен у 33% животных, а в группе МР – у 60%, в то время как в группе КТР эти бактерии не были найдены. Изменений в уровне *Akkermansia muciniphila* не было найдено, несмотря на то, что в группе, получающей антимикробные препараты, эти бактерии не были обнаружены ни у одного из животных. Такой результат, возможно, связан с тем, что в группах как контрольных крыс, так и получающих жировую диету, также встречались животные, у которых отсутствовали аккермансии, поэтому для статистически значимых различий необходимо увеличение размера выборок. *Enterococcus spp.* методом ПЦР-РВ были выявлены редко, всего у 16% всех животных, поэтому статистически значимых различий здесь также не было обнаружено. У одного животного из группы МЖ были найдены *Clostridium difficile* в количестве 2×10^5 КОЕ/г фекалий. Ни в одном образце не были обнаружены *Parvimonas micra*, *Candida spp.*, *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus* и энтеропатогенные *Escherichia coli*. Таким об-

разом, в группе МЖ наблюдаются наименьшие изменения состава микробиоты относительно интактных крыс.

Гистологическое исследование тонкого и толстого кишечника

Для образцов из группы КТР отмечается нормальная гистоархитектоника ткани. В образцах из группы СТК наблюдается тотальное разрушение всех слоев кишечника, вплоть до мышечного слоя. На слизистой толстой кишки в образцах группы ГЖ определяется воспалительная инфильтрация разной степени выраженности, местами до 50-70% с фрагментами реэпителизации однослойным кишечным эпителием. Аналогичным образом можно описать большинство образцов из группы ЖЖ. В группе МЖ грануляционная ткань отечна, инфильтрация не плотная, разреженная, мышечный слой затронут не более чем на 10%, отмечены признаки реэпителизации. Для группы МР характерна инфильтрация на все слои, включая серозную оболочку, с некрозом крипт более чем на 2/3.

Гемодинамические и морфофункциональные характеристики изолированного сердца

Гемодинамические параметры значимо не отличались между различными группами. При этом была отмечена тенденция к более выраженной ишемической контрактуре в группах с моделированием ССВР по сравнению с контролем

ТАБЛИЦА 2. ИФА ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ КРЫС В ГРУППАХ ПО ОКОНЧАНИИ ЭКСПЕРИМЕНТА (n = 10 В КАЖДОЙ ГРУППЕ)

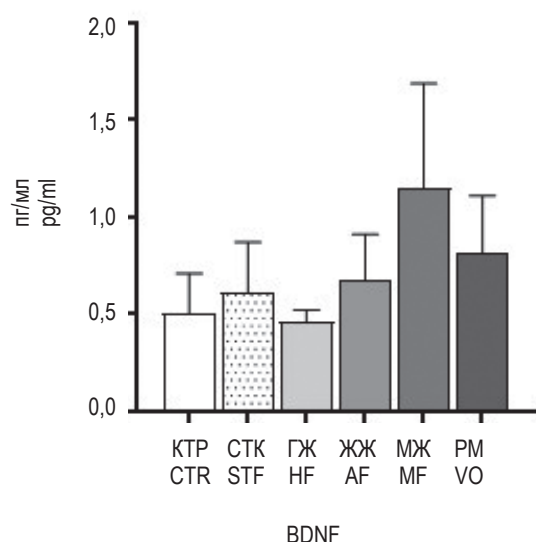
TABLE 2. ELISA BLOOD INDICES OF RATS IN GROUPS AT THE END OF THE EXPERIMENT (n = 10 IN EACH GROUP)

Группа Group	IL-1 α (пг/мл) IL-1 α (pg/ml)	TNF α (пг/мл) TNF α (pg/ml)	IL-6 (пг/мл) IL-6 (pg/ml)	IL-8 (пг/мл) IL-8 (pg/ml)	IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/ml)	TGF- β 1 (пг/мл) TGF- β 1 (pg/ml)	LPS (нг/мл) LPS (ng/ml)
КТР CTR	45 $\pm$ 18	7 $\pm$ 2	96 $\pm$ 22	28 $\pm$ 6	19 $\pm$ 2	24 $\pm$ 8	6 $\pm$ 1
СТК STF	106 $\pm$ 21*	28 $\pm$ 9*	64 $\pm$ 22	122 $\pm$ 36*	23 $\pm$ 4	4 $\pm$ 1*	130 $\pm$ 37*
ГЖ HF	51 $\pm$ 16	20 $\pm$ 3*	62 $\pm$ 16	13 $\pm$ 6	19 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3	17 $\pm$ 8*
ЖЖ AF	34 $\pm$ 6	20 $\pm$ 2*	82 $\pm$ 22	10 $\pm$ 2*	19 $\pm$ 2	7 $\pm$ 2*	25 $\pm$ 10*
МЖ MF	112 $\pm$ 25*	19 $\pm$ 1*	63 $\pm$ 7	69 $\pm$ 15*	22 $\pm$ 3	6 $\pm$ 2*	49 $\pm$ 15*
PM VO	73 $\pm$ 23	24 $\pm$ 8	81 $\pm$ 38	9 $\pm$ 4*	22 $\pm$ 5	8 $\pm$ 3	58 $\pm$ 24*

Примечание. * – p < 0,05 по сравнению с группой КТР.

Note. *, p < 0.05 compared with the CTR group.

А (A)



Б (B)

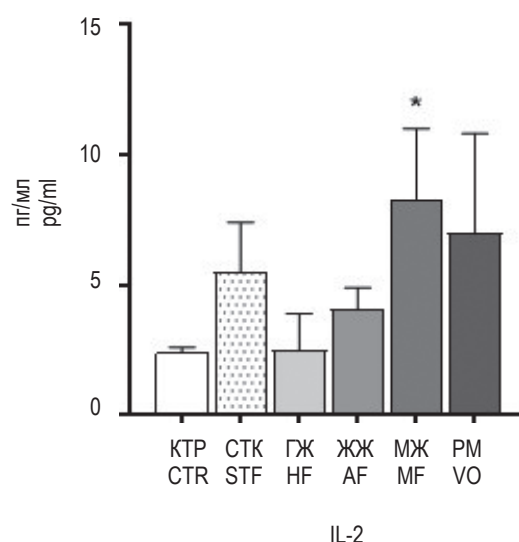


Рисунок 3. Показатели ИФА концентрации BDNF и IL-2 в крови

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. ELISA parameters of BDNF and IL-2 concentration in blood

Note. As for Figure 1.

(рис. 5А). СДЛЖ в группе РМ было несколько более высоким в начале периода реперфузии, и равным таковому в группе КТР в конце реперфузии. Однако СДЛЖ в группе ГЖ было меньше на 10% по отношению к группе КТР во всех контрольных точках (рис. 5Б). КДЛЖ в группах РМ и МЖ было несколько выше по отношению к контролю в начале и конце реперфузии и меньше в группе СТК (рис. 5В).

Во всех группах с моделированием ССВР была отмечена тенденция к увеличению размера инфаркта по отношению к контролю. В группе КТР размер инфаркта составил $37 \pm 10\%$, а в группе МЖ было зафиксировано значимо более высокое значение размера инфаркта — $65 \pm 8\%$ ($p < 0,05$). В группах СТК, ГЖ и ЖЖ была отмечена минимальная тенденция к увеличению размера инфаркта по сравнению с контролем ($46 \pm 14\%$, $45 \pm 9\%$ и $49 \pm 13\%$ соответственно), которая была статистически незначимой по сравнению с контролем (рис. 5Д).

Корреляционный анализ по Спирмену выявил, что связь между представленными иммунологическими показателями и размером инфаркта в большинстве случаев оценивается от умеренной до заметной и высокой. Однако только для BDNF и IL-2 связь между исследуемыми при-

знаками определена, как прямая, статистически значимая, с высокой и весьма высокой, соответственно, силой связи по шкале Чеддока ($p < 0,05$).

Обсуждение

Составными частями новой экспериментальной модели ССВР для исследований устойчивости миокарда к ИРП являются ХИК и АИД, и каждая из них требует детального исследования параметров, поддающихся модулированию [2]. В контролируемых микробных условиях улучшенного конвенционального вивария нами была изучена предполагаемая связь устойчивости ИРП миокарда и изменений состава кишечной микробиоты через управление дисбактериозом качеством жиров в повседневной диете. Из числа классических критериев дисбактериоза, сформулированных в трудах А.М. Уголева, в данной модели нами были использованы: различный состав жировой диеты, создающий высокую концентрацию жиров во всех отделах ЖКТ в течение суток, острое воспалительное заболевание толстой кишки, изменение перистальтики кишечника, применение АМП и отказ от корма [9].

В последние годы убедительно продемонстрирован недостаток кардиометаболической пользы

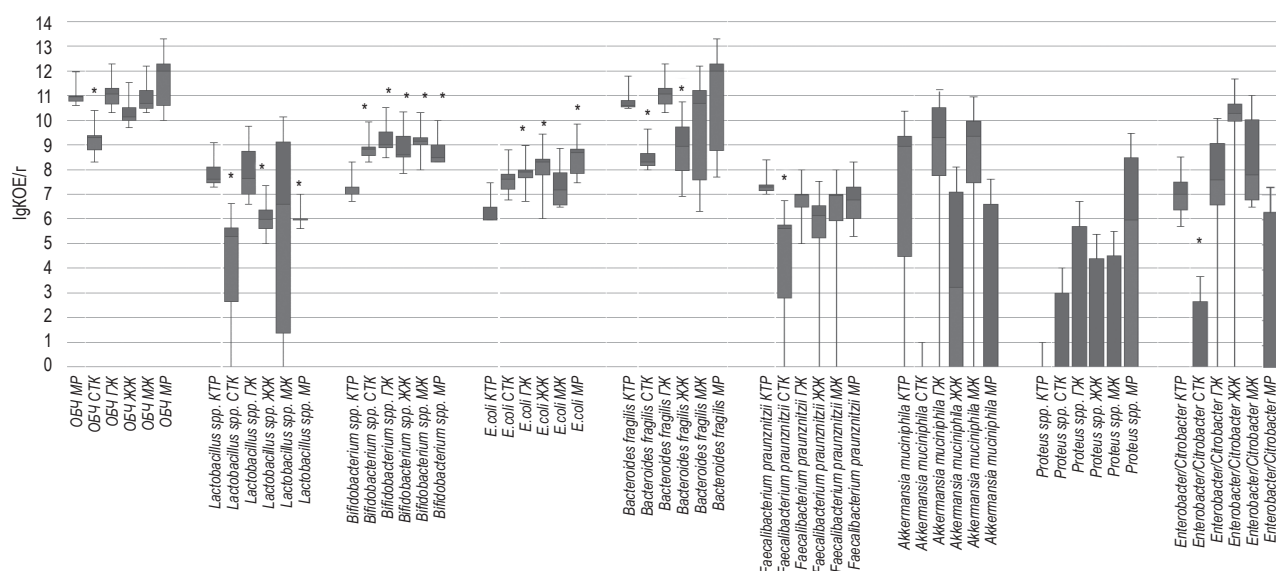


Рисунок 4. Состав кишечной микробиоты крыс из различных групп, в зависимости от состава жировой диеты, определенный при помощи ПЦР-РВ

Примечание. См. примечание к рисунку 1. * – достоверные ($p < 0,05$) отличия относительно контрольной группы (КТР).

Figure 4. Composition of intestinal microbiota in rats from different groups, depending on fat diet composition, determined by RT-PCR

Note. As for Figure 1. *, significant ($p < 0.05$) differences relative to the control group (CTR).

рациона питания с низким содержанием жиров, и в 2015 г. впервые заявлено, что рекомендации по правильному питанию не должны фокусироваться на снижении общего содержания жира в рационе [18]. Максимальное уменьшение массы тела при моделировании ССВР происходит у крыс без введения в рацион жиров, а максимальное увеличение массы депозитов висцерального жира — при введении в рацион ЖЖ или ГЖ. Учитывая данные рекомендации и цель работы, основное внимание было обращено на изучение иммуотропной роли различных жиров в повседневном рационе экспериментальных животных при формировании ПВО и изменении состава кишечной микробиоты после моделирования ССВР. Исследования бактериального генома (микробиома) показали: у тучных субъектов, как у животных, так и у людей, на фоне избытка жирной пищи микробное разнообразие меньше, чем у лиц с нормальной массой тела [41]. Нами было показано снижение представительства *Lactobacillus spp.*, при моделировании ССВР на фоне стандартной диеты, при снижении общего бактериального числа (ОБЧ). В большинстве групп отмечено увеличение *E. coli*, а после антибиотикотерапии, помимо эшерихий, отмечена манифестация *Proteus spp.*, что согласуется данными о существующем антагонизме между не-

которыми штаммами *Lactobacillus spp.* и *E. coli* в единой экосистеме [29]. В целом, несмотря на наличие общих и специфических изменений состава кишечной микробиоты под влиянием различных жиров в диете, в связи с иммунологическими маркерами и увеличением зоны некроза миокарда изолированного сердца, можно констатировать, что в пределах чувствительности метода ПЦР-РВ, минимальные изменения микробиоты отмечены в группах МЖ и ГЖ. Интересно наблюдение того факта, что в этих же группах также отмечены наиболее близкие к контролю значения концентрации щелочной фосфатазы, что можно оценивать как следствие минимальной клеточной деструкции в кишечнике и отсутствие токсической нагрузки на печень. Сведения о селективной стимуляции различными жирами определенных штаммов микроорганизмов для объективной оценки их непосредственного влияния на иммунную и сердечно-сосудистую систему отсутствуют, поэтому корректнее использовать литературные данные о сердечно-сосудистых влияниях различных типов жиров. Несмотря на массу сведений о вреде насыщенных жиров на сердечно-сосудистое здоровье, эти утверждения остаются спорной темой. Биологическое и метаболическое разнообразие не поддерживает подход по группированию всех насыщенных жирных

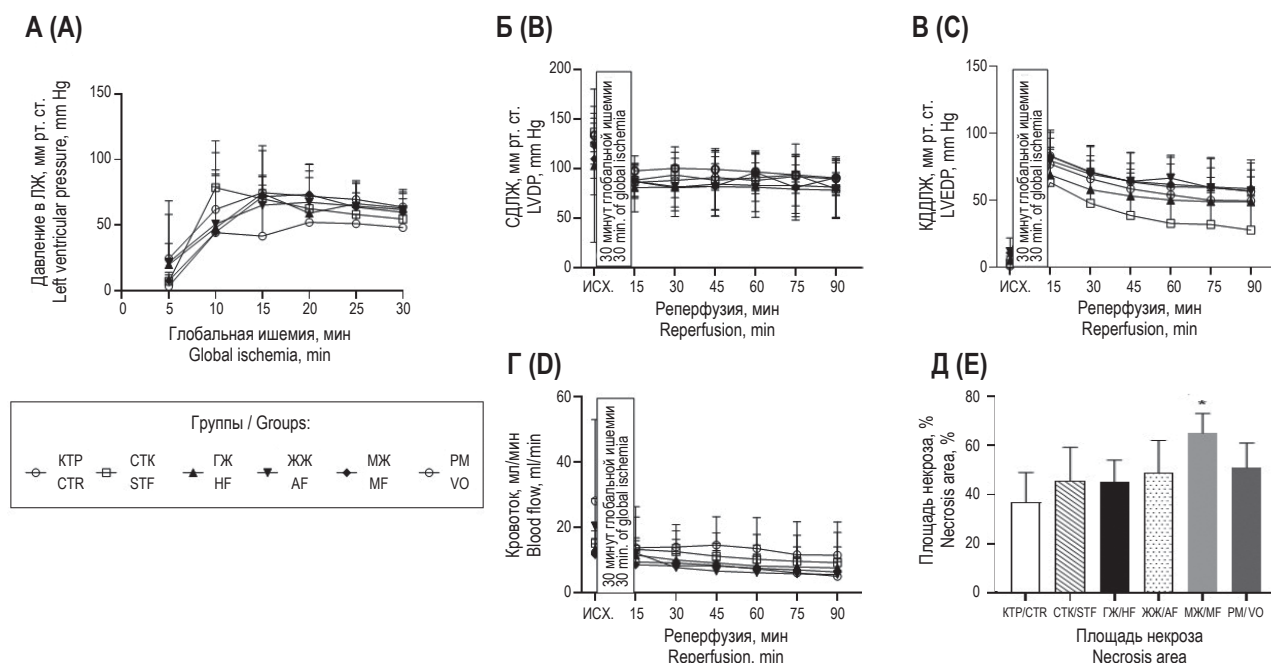


Рисунок 5. Гемодинамические показатели и площадь некроза миокарда изолированного сердца

Примечание. См. примечание к рисунку 1. * – достоверные ($p < 0,05$) отличия относительно контрольной группы (КТР).

Figure 5. Hemodynamic parameters and area of myocardial necrosis of an isolated heart

Note. As for Figure 1.*, significant ($p < 0.05$) differences relative to the control group (CTR).

кислот на основе одной химической характеристики: отсутствие двойных связей [32]. Общее содержание насыщенного жира в рационе кажется относительно нейтральными для ИБС, а по сравнению с рафинированными углеводами более полезными [17, 26], в то время как воздействие общего содержания мононенасыщенного жира остается неопределенным [31]. Хотя мононенасыщенный жир (преимущественно олеиновая кислота, 18:1) традиционно считается кардиозащитным жиром, данные, подтверждающие это утверждение, недостаточно доказательны [12, 15, 38]. Среди прочих, полиненасыщенные n-6 (омега-6) и n-3 (омега-3) жирные кислоты обладают наибольшей доказанной кардиопозитивностью [31, 47]. Однако, хотя экологические исследования свидетельствуют о пользе увеличения потребления альфа-линолевой кислоты [16], результаты испытаний функций тромбоцитов, воспаления, эндотелиальной функции и артериальной совместимости, а также наблюдательного исследования ассоциации с исходами ССЗ и диабета, были смешанными и неубедительными [23, 33]. Трансжирные кислоты (ТЖА) представляют собой моно- или полиненасыщенные жиры с одной или несколькими двойными связями в транс-положении, могут потребляться из промышленно произведенных гидрогенизированных растительных масел и являются пищевыми добавками с явными неблагоприятными последствиями [22, 43].

Несмотря на различную оценку кардиотропности исследованных жиров по размеру площади инфаркта миокарда, биохимические исследования крови в данной работе не выявили каких-либо специфических особенностей в опытных группах у крыс с ССВР, что, вероятно, определяет приоритет иммунологических механизмов в данной экспериментальной модели. IL-1 и TNF α продуцируются в ответ на внедрение патогенов и повреждение тканей и стимулируют развитие местной воспалительной реакции, которая направлена на элиминацию патогена и заживление тканей [19, 46]. Экспрессия mRNA и уровни продукции белков IL-1 α и IL-1 β повышаются в очаге на самых ранних стадиях раневого процесса [21, 36]. Уменьшение показателей IL-1 α в группах ГЖ и ЖЖ выявило возможность липидной модуляции этого ключевого провоспалительного цитокина, что заметно коррелирует со снижением LPS в этих группах и более низкими показателями ИРП миокарда. У IL-1 существует около 50 различных биологических функций, а мишенями служат клетки практически всех органов и тканей [20], и его действие может реали-

зовываться как на системном, так и на местном уровне. Анализ изменения показателей TNF α во всех группах, по сравнению с контролем, показывает отсутствие модулирующего влияния различных жиров на этот провоспалительный цитокин при его значительном увеличении в группе на стандартном корме. TNF и рецепторы TNF играют важную роль в защите организма от инфекций, главным образом от внутриклеточных инфекций. Основными продуцентами TNF являются макрофаги, но и другие клетки могут продуцировать TNF при воспалении, например нейтрофилы. Однородность изменений данного цитокина во всех группах может быть связана с высокой микробиологической чистотой проведения эксперимента и транзитом ЛПС кишечной нормобиоты, близкой по составу для всех групп, во внутреннюю среду через поврежденный кишечный барьер.

IL-8 играет ключевую роль в индукции миграции нейтрофилов в очаге воспаления, является одним из наиболее важных хемокинов, который принимает участие в регуляции воспалительного ответа [8]. IL-8 вызывает повышение концентрации внутриклеточного Ca²⁺, полимеризацию актина, изменение формы нейтрофилов для процесса миграции, дегрануляцию лейкоцитов [34, 37]. В нашем исследовании показано существенное увеличение уровня IL-8, заметно коррелирующее с изменением уровня IL-1 α . Однако в группах ГЖ и РМ, с преобладанием полиненасыщенных жиров в составе рациона, определены не только выпадение из прямой связи значений для данных цитокинов, но и незначительные увеличения площади некроза миокарда по отношению к контролю.

IL-6 синтезируется Т-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами, клетками эндотелия, фибробластами и другими клетками. Экспрессия гена IL-6 происходит под действием вирусов, бактерий, а также провоспалительных цитокинов. В нашей работе отмечена тенденция снижения уровня IL-6, что может быть объяснено улучшенным конвенциональным статусом животных и проявлением иммунорегуляторных и противовоспалительных свойств этого цитокина при остром воспалении в эксперименте [42].

Учитывая острую воспалительную фазу, представляется объяснимым для данного срока наблюдения в данной модели и отсутствие изменений показателей для IL-10, наиболее важного противовоспалительного цитокина, который является ингибитором воспаления и цитокинового каскада. Подобное объяснение, вероятно, может быть дано и наблюдаемому снижению уровня

TGF- β 1 в сыворотке крови крыс, опираясь на сведения из литературы, что при сепсисе и инсульте такая картина может отражать изменение иммуновоспалительного статуса пациентов [5].

IL-2 влияет на многие популяции иммунокомпетентных клеток, активизирует Т-, В-лимфоциты, натуральные киллеры, повышает продукцию гамма-интерферона, усиливает миграцию костномозговых предшественников ЕК и их дифференцировку в зрелые формы [7, 14]. IL-2, являясь индуктором эффекторных реакций и клеток памяти, также поддерживает Treg-клетки, таким образом он выполняет две разные функции, участвуя в регуляции различных этапов иммунных ответов [11]. Например, согласно клиническим наблюдениям, одним из цитокинов, способных уменьшать последствия травматического повреждения мозга и обладающих нейропротекторной и нейрорепаративной активностью при черепно-мозговой травме, является рекомбинантный IL-2, что, по-видимому, связано с его способностью усиливать синтез и выделение BDNF [6].

Стресс является также причиной изменения уровней IL-2 и его высокоаффинного рецептора, причем при легком стрессе концентрация данного цитокина и экспрессия его рецептора повышаются, а при выраженном — угнетаются [24]. По-видимому, недостаточность продукции IL-2 при стрессе может приводить к угнетению синтеза и выделению BDNF с последующим снижением его концентрации в сыворотке крови [10]. Рассмотрение роли различных жиров с т.з. модулирования стрессогенности приводит к предположению о возможной селективной профилактике воспалительных заболеваний качеством жиров в диете с учетом устойчивости миокарда к ИПП. К подобным рассуждениям подводят сведения о парадоксах ожирения: на фоне увеличения риска заражения госпитальными инфекциями, юные пациенты с избыточным весом и ожирением ($30 < \text{ИМТ} < 35$) были связаны со снижением риска пневмонии, или ожирение у взрослых больных рассматривалось как независимый фактор риска при распространении пневмонии, *Clostridium difficile* колита, бактеремии или ране-

вых инфекций [13, 25, 28]. Более того, ожирение рассматривается в качестве благоприятного предиктора смертности от сепсиса при хирургическом перитоните, включая сокращение срока госпитального ухода, по сравнению с пациентами с ИМТ < 21 [44].

Заключение

В нашем исследовании обнаружена существенная модуляция уровня IL-2 составом жиров в диете. Так, гидрогенизированный и животный жир вызвали тенденцию к снижению этого цитокина после моделирования ССВР до контрольного значения, а молочный и растительный жиры способствовали достоверному увеличению. Учитывая сведения об обратной связи стрессирующего воздействия с величиной IL-2 и BDNF, а также нейропротективной функции последнего, возникает предположение о снижении уровня стресса в модели ССВР посредством полиненасыщенных жиров в диете и увеличения под влиянием насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, что требует дополнительных исследований. Также необходим более тщательный метагеномный и метаболомный поиск вероятного микробного индуктора IL-2 и BDNF.

Максимальное увеличение уровня провоспалительных цитокинов IL-1 α , IL-2, IL-8, TNF α , BDNF, максимальная степень репарации в очаге повреждения кишечной стенки у крыс в группе с введением молочного жира в сочетании с максимальным показателем ИПП изолированного сердца показывает пример возможного повреждающего действия на миокард цитокинов, возмещаемых в процессе репарации кишечного эпителия и реализации нейротрофических эффектов. Полученные в данной работе сведения показывают возможность кардиотропного управления цитокиновой манифестацией в условиях ССВР с помощью изменения состава липидов в повседневной диете. Необходимы дальнейшие исследования для поиска молекулярных механизмов изменения аффинности и авидности к системным цитокинам на локальном уровне для последующей трансляции в клиническую медицину.

Список литературы / References

1. Борщев Ю.Ю., Буровенко И.Ю., Карасева А.Б., Минасян С.М., Борщев В.Ю., Семенова Н.Ю., Борщева О.В., Половинкин В.В., Родионов Г.Г., Суворов А.Н., Галагудза М.М. Моделирование синдрома системной воспалительной реакции химической индукцией травмы толстого кишечника у крыс // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 87-98. [Borshchev Yu.Yu., Burovenko I.Yu., Karaseva A.B., Minasyan S.M., Borshchev V.Yu., Semenova N.Yu., Borshcheva O.V., Polovinkin V.V., Rodionov G.G., Suvorov A.N., Galagudza M.M. Modeling of systemic inflammatory response syndrome by chemical induction of colon injury in rats. *Meditsinskaya*

immunologiya = *Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 87-98. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MOS-1839.

2. Борщев Ю.Ю., Ермоленко Е.И. Метаболический синдром и микроэкология кишечника // Трансляционная медицина, 2014. № 1. С. 19-28. [Borshchev Yu.I., Ermolenko E.I. Metabolic syndrome and intestinal microecology. *Translyatsionnaya meditsina* = *Translational Medicine*, 2014, no. 1, pp. 19-28. (In Russ.)]

3. Королев Д.В., Александров И.В., Галагудза М.М., Сыренский А.В., Сонин Д.Л., Егорова Е.И. Автоматизация получения и обработки данных физиологического эксперимента // Регионарное кровообращение и микроциркуляция, 2008. Т. 7, № 2 (26). С. 79-84. [Korolev D.V., Alexandrov I.V., Galagoudza M.M., Syrensky A.V., Sonin D.L., Egorova E.I. Automation of data acquisition and processing in physiological experiments. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. = *Regional Hemodynamics and Microcirculation*, 2008, Vol. 7, no. 2 (26), pp. 79-84. (In Russ.)]

4. Минасян С.М., Бадриханова Л.Р., Галагудза М.М., Курапеев Д.И. Сравнительное исследование защитного эффекта гипотермии, ишемического preconditionирования и модифицированных кардиоплегических растворов при ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция, 2008. Т. 7, № 2 (26). С. 72-78. [Minasyan S.M., Badrihanova L.R., Galagudza M.M., Kurapeev D.I. Comparative research of protective effect of a hypothermia, ischemic preconditioning and the modified cardioplegic solutions at ischemia-reperfusion of the rat's isolated heart. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya* = *Regional Hemodynamics and Microcirculation*, 2008, Vol. 7, no. 2, pp. 72-78. (In Russ.)]

5. Москалев А.В., Рудой А.С., Апчел А.В., Зуева В.О., Казымова О.Э. Особенности биологии трансформирующего ростового фактора β и иммунопатология // Вестник российской военно-медицинской академии, 2016. № 2 (54). С. 206-216. [Moskalev A.V., Rudoy A.S., Apchel A.V., Zueva V.O., Kazimova O.E. Features of biology of transforming growth factor β and immunopathology. *Vestnik rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii* = *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2016, no. 2 (54), pp. 206-216. (In Russ.)]

6. Серебряная Н.Б., Липатова Л.В., Сивакова Н.А., Василенко А.В. Рекомбинантный интерлейкин IL-2 человека как агент антиэпилептической терапии // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 3. С. 723-726. [Serebryanaya N.B., Lipatova L.V., Sivakova N.A., Vasilenko A.V. The recombinant human interleukin-2 (IL-2) as the agent of antiepileptic therapies. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal* = *Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 3, pp. 723-726. (In Russ.)]

7. Симбирцев А.С. Интерлейкин-2 и рецепторный комплекс интерлейкина-2 в регуляции иммунитета // Иммунология, 1998. № 3. С. 3-8. [Simbirtsev A.S. Interleukin-2 and interleukin-2 receptor complex in the regulation of immunity. *Immunologiya* = *Immunologiya*, 1998, no. 3, pp. 3-8. (In Russ.)]

8. Симбирцев А.С. Интерлейкин-8 и другие хемокины // Иммунология, 1999. № 4. С. 9-14. [Simbirtsev A.S. Interleukin-8 and other chemokines. *Immunologiya* = *Immunologiya*, 1999, no. 4, pp. 9-14. (In Russ.)]

9. Уголев А.М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция. Л.: Наука, 1972. 356 с. [Ugolev A.M. Membrane digestion. Polysubstrate processes, organization and regulation]. Leningrad: Nauka, 1972. 356 p.

10. Фомичева Е.Е., Шанин С.Н., Филатенкова Т.А., Серебряная Н.Б. IL-2 как регулятор уровней стресс-гормонов и нейротропного фактора BDNF при экспериментальной черепно-мозговой травме // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 4. С. 647-656. [Fomicheva E.E., Shanin S.N., Filatenkova T.A., Serebryanaya N.B. IL-2 and regulation of stress hormones and BDNF neurotropic factor levels after experimental traumatic brain injury (TBI). *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 4, pp. 647-656. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IAR-1973.

11. Abbas A.K., Trotta E., Simeonov D., Marson A., Bluestone J.A. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci. Immunol.*, 2018, Vol. 3, Iss. 25, pii: eaat1482. doi: 10.1126/sciimmunol.aat1482.41.

12. Alhazmi A., Stojanovski E., McEvoy M., Garg M.L. Macronutrient intakes and development of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2012, no. 31, pp. 243-258.

13. Braun E.S., Crawford F.W., Desai M.M., Meek J., Kirley P.D., Miller L., Anderson E.J., Oni O., Ryan P., Lynfield R., Bargsten M., Bennett N.M., Lung K.L., Thomas A., Mermel E., Lindegren M.L., Schaffner W., Price A., Chaves S.S. Obesity not associated with severity among hospitalized adults with seasonal influenza virus infection. *Infection*, 2015, Vol. 43, no. 5, pp. 569-575.

14. Carrero J.J., Park S.H., Axelsson J., Lindholm B., Stenvinkel P. Cytokines, atherogenesis, and hypercatabolism in chronic kidney disease: a dreadful triad. *Semin Dial.*, 2009, Vol. 22, no. 4, pp. 381-386.

15. Chowdhury R., Warnakula S., Kunutsor S., Crowe F., Ward H.A., Johnson L., Franco O.H., Butterworth A.S., Forouhi N.G., Thompson S.G., Khaw K.T., Mozaffarian D., Danesh J., Di Angelantonio E. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.*, 2014, no. 160, pp. 398-406.

16. Degirolamo C., Shelness G.S., Rudel L.L. LDL cholesteryl oleate as a predictor for atherosclerosis: evidence from human and animal studies on dietary fat. *J. Lipid Res.*, 2009, 50 Suppl. (Suppl.), pp. 434-439.

17. Jakobsen M.U., Dethlefsen C., Joensen A.M., Stegger J., Tjønneland A., Schmidt E.B., Overvad K. Intake of carbohydrates compared with intake of saturated fatty acids and risk of myocardial infarction: importance of the glycemic index. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010, Vol. 91, no. 6, pp. 1764-1768.
18. Dietary Guidelines Advisory Committee; Scientific Report of the 2015 Dietary Guidelines Advisory Committee, 2015. Available at: <http://www.health.gov/dietaryguidelines/2015-scientific-report/>.
19. Dinarello C.A. Proinflammatory cytokines. *Chest*, 2000, Vol. 118, no. 2, pp. 503-508.
20. Dinarello C.A., Cannon J.G., Mier J.W., Bernheim H.A., LoPreste G., Lynn D.L., Love R.N., Webb A.C., Auron P.E., Reuben R.C. Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1. *J. Clin. Invest.*, 1986, Vol. 77, no. 6, pp. 1734-1739.
21. Fahey T.J. 3rd, Sherry B., Tracey K.J., van Deventer S., Jones W.G. 2nd, Minei J.P., Morgello S., Shires G.T., Cerami A. Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. *Cytokine*, 1990, Vol. 2, no. 2, pp. 92-99.
22. Frieden T.R., Berwick D.M. The "Million Hearts" initiative – preventing heart attacks and strokes. *N. Engl. J. Med.*, 2011, Vol. 365, no. 13, e27. doi: 10.1097/01.NPR.0000476372.04620.7a.
23. Geleijnse J.M., de Goede J., Brouwer I.A. Alpha-linolenic acid: is it essential to cardiovascular health? *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2010, no. 12, pp. 359-367.
24. Himmerich H., Fischer J., Bauer K., Kirkby K.C., Sack U., Krügel U. Stress-induced cytokine changes in rats. *Eur. Cytokine Netw.*, 2013, Vol. 24, no. 2, pp. 97-103.
25. Huttunen R., Karppe M., Syrjänen J. Obesity and nosocomial infections. *J. Hosp. Infect.*, 2013, Vol. 85, no. 1, pp. 8-16.
26. Jakobsen M.U., O'Reilly E.J., Heitmann B.L., Pereira M.A., Balter K., Fraser G.E., Goldbourt U., Hallmans G., Knekt P., Liu S., Pietinen P., Spiegelman D., Stevens J., Virtamo J., Willett W.C., Ascherio A. Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009, no. 89, pp. 1425-1432.
27. James W.P.T., Jackson-Leach R., Mhurchu C.N., Kalamara E., Shayeghi M., Rigby N.J., Nishida C., Rodgers A. Overweight and obesity (high body mass index). In: Ezzati M et al., eds. Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attribution to selected major risk factors, Vol. 1. Geneva, World Health Organization, 2004, pp. 497-596.
28. Kaspersen K.A., Pedersen O.B., Petersen M.S., Hjalgrim H., Rostgaard K., Møller B.K., Juul-Sørensen C., Kotzé S., Dinh K.M., Erikstrup L.T., Sørensen E., Thøner L.W., Burgdorf K.S., Ullum H., Erikstrup C. Obesity and risk of infection: results from the Danish Blood Donor Study. *Epidemiology*, 2015, Vol. 26, no. 4, pp. 580-589.
29. Kumar M., Dhaka P., Vijay D., Vergis J., Mohan V., Kumar A., Kurkure N.V., Barbuddhe S.B., Malik S.V., Rawool D.B. Antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* against multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2016, Vol. 48, no. 3, pp. 265-270.
30. Marmot M., Wilkinson R., eds. Social Determinants of Health. 2nd edition ed. Oxford University Press, 2005. Available at: <https://oxford.universitypressscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780198565895.001.0001/acprof-9780198565895>.
31. Mozaffarian D., Micha R., Wallace S. Effects on coronary heart disease of increasing polyunsaturated fat in place of saturated fat: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Med.*, 2010, no. 7, e1000252. doi: 10.1371/journal.pmed.1000252.
32. Mozaffarian D. Diverging global trends in heart disease and type 2 diabetes: the role of carbohydrates and saturated fats. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2015, Vol. 3, no. 8, pp. 586-588.
33. Pan A., Chen M., Chowdhury R., Wu J.H., Sun Q., Campos H., Mozaffarian D., Hu F.B. alpha-Linolenic acid and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2012, no. 96, pp. 1262-1273.
34. Peveri P., Walz A., Dewald B., Baggiolini M. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, 1988, Vol. 167, pp. 1547-1259.
35. Prentice A.M., Jebb S.A. Energy intake/physical activity interactions in the homeostasis of body weight regulation. *Nutr. Rev.*, 2004, Vol. 62, pp. S98-S104.
36. Sato Y., Ohshima T. The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation (II). *Int. J. Legal. Med.*, 2000, Vol. 113, pp. 140-145.
37. Schroeder J., Mrowietz U., Morita E., Christophers E. Purification and biochemical characterization of a human monocyte derived neutrophil activating peptide that lacks interleukin-1 activity. *J. Immunol.*, 1987, Vol. 139, pp. 3474-3483.
38. Schwingshackl L., Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and metaanalysis of cohort studies. *Lipids Health Dis.*, 2014, Vol. 13, 154.
39. Seidell J.C. Dietary fat and obesity: an epidemiologic perspective. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, Vol. 67 (Suppl. 3), pp. 546S-550S.
40. Storlien L.H., Huang X.F., Lin S., Xin X., Wang H.Q., Else P.L. Dietary fat subtypes and obesity. *World Rev. Nutr. Diet.*, 2001, Vol. 88, pp. 148-154.

41. Tordjman J., Guerre-Millo M., Clement K. Adipose tissue inflammation and liver pathology in human obesity. *Diabetes Metab.*, 2008, Vol. 34, no. 6 (Pt 2), pp. 658-663.
42. Ulich T.R., Yin S., Guo K., Yi E.S., Remick D., del Castillo J. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. II. Interleukin-6 and transforming growth factor beta inhibit acute inflammation. *Am. J. Pathol.*, 1991, Vol. 138, no. 5, pp. 1097-1101.
43. US Food and Drug Administration, FDA Cuts Trans Fat in Processed Foods, 2015. Available at: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm372915.htm>.
44. Utzolino S., Ditzel C.M., Baier P.K., Hopt U.T., Kaffarnik M.F. The obesity paradox in surgical intensive care patients with peritonitis. *J. Crit. Care*, 2014, Vol. 29, no. 5, pp. 887.e1-5.
45. Visscher T.L., Seidell J.C. The public health impact of obesity. *Annu. Rev. Public Health*, 2001, Vol. 22, pp. 355-375.
46. Werner S., Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.*, 2003, Vol. 83, pp. 835-870.
47. Wu J.H., Micha R., Imamura F., Pan A., Biggs M.L., Ajaz O., Djousse L., Hu F.B., Mozaffarian D. Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Nutr.*, 2012, Vol. 107, Suppl. 2, pp. S214-S227.

Авторы:

Борщев Ю.Ю. — заведующий научно-исследовательским отделом токсикологии Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург; генеральный директор ООО «НИЦ Пробиокод СП», Москва, Россия

Буровенко И.Ю. — младший научный сотрудник НИО токсикологии ЦДТИ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Карасева А.Б. — научный сотрудник НИО молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Минасян С.М. — к.м.н., старший научный сотрудник НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Процак Е.С. — студент ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; лаборант-исследователь ГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Borshchev Yu. Yu., Head, Department of Toxicology, Institute of Experimental Medicine, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg; General Director, Ltd "SRC PROBIOCOD SP", Moscow, Russian Federation

Burovenko I. Yu., Junior Research Associate, Department of Toxicology, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Karaseva A. B., Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Minasyan S. M., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Microcirculation and Myocardial Metabolism, V. Almazov National Medical Research Centre; Senior Research Associate, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Protsak E. S., Student, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg; Laboratory Research Assistant, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

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

Семенова Н.Ю. — научный сотрудник НИО патоморфологии ЦДТИ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Борщева О.В. — младший научный сотрудник НИО токсикологии ЦДТИ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Суворов А.Н. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующий научно-исследовательским отделом молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; заведующий кафедрой фундаментальной медицины и медицинских технологий» ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Галагудза М.М. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ; профессор, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Borshchev V. Yu., Student, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Semenova N. Yu., Research Associate, Department of Pathomorphology, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Borshcheva O. V., Junior Research Associate, Department of Toxicology, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Suvorov A. N., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Research Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine; Head, Department of Fundamental Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Galagudza M. M., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Institute of Experimental Medicine, V. Almazov National Medical Research Center; Professor, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 30.11.2020
Принята к печати 10.01.2021

Received 30.11.2020
Accepted 10.01.2021

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОНЦЕНТРАЦИИ IL-1 β В СЫВОРОТКЕ КРОВИ, СООТНОШЕНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ И ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ PD-L1 В ТКАНИ ОПУХОЛИ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ СОЛИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Орлова Р.В., Жукова Н.В., Малкова А.М., Каледина Е.А., Губаль А.Р., Шаройко В.В.

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

Резюме. Принцип действия ингибиторов контрольных точек основан на активации Т-клеточного противоопухолевого иммунитета, в связи с чем поиск маркеров функциональной активности лимфоцитов до начала терапии весьма актуален. Определение экспрессии молекул PD-L1 опухоли отражает иммуносупрессивную активность злокачественных клеток и используется в качестве предиктивного маркера в клинической практике. Соотношение нейтрофилов и лимфоцитов в опухолевой ткани и в периферической крови также может свидетельствовать об активности адаптивного иммунитета и коррелирует с эффективностью терапии. Было показано, что высокий уровень интерлейкина-1 бета в микроокружении опухоли связан с иммуносупрессией лимфоцитов и, возможно, отражает активность микроокружения опухоли. Целью данной работы является изучение взаимосвязи между опухолевой экспрессией PD-L1, концентрацией сывороточного интерлейкина-1 бета и соотношения нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови.

Перед началом терапии ингибиторами контрольных точек у пациентов с различными солидными опухолями ($n = 50$) был определен сывороточный уровень интерлейкина-1 бета методом ИФА («ИФА-Бест», г. Новосибирск, Россия), экспрессия PD-L1 в опухоли иммуногистохимическим методом, общий анализ крови с помощью цитометрии. Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism 6 (Graph Pad Software, США) с использованием статистических методов Фишера, Манна–Уитни и Спирмена.

Среднее значение индекса соотношения нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови составило $2,65 \pm 0,21$ (95% CI 2,22–3,07). Значение индекса более 3,5 было обнаружено у 18% (9/50) пациентов. Среднее значение уровня экспрессии PD-L1 составило $23,02 \pm 4,52\%$ (95% CI 13,86–32,18). Экспрессия PD-L1 в ткани опухоли была выявлена у 60,1% (25/40) пациентов, среди которых повышенная экспрессия более 50% была определена в 20,0% (5/25) случаев. Была обнаружена положи-

Адрес для переписки:

Малкова Анна Михайловна
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
196070, Россия, Санкт-Петербург, ул. Победы, 4, кв. 21.
Тел.: 8 (905) 264-79-90.
E-mail: anya.malkova.95@mail.ru

Address for correspondence:

Malkova Anna M.
St. Petersburg State University,
196070, Russian Federation, St. Petersburg, Pobedy str., 4,
apt 21.
Phone: 7 (905) 264-79-90.
E-mail: anya.malkova.95@mail.ru

Образец цитирования:

Р.В. Орлова, Н.В. Жукова, А.М. Малкова, Е.А. Каледина, А.Р. Губаль, В.В. Шаройко «Сравнительный анализ концентрации IL-1 β в сыворотке крови, соотношения нейтрофилов и лимфоцитов периферической крови и уровня экспрессии PD-L1 в ткани опухоли у пациентов с различными солидными опухолями» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1105-1114.
doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2197

© Орлова Р.В. и соавт., 2021

For citation:

R.V. Orlova, N.V. Zhukova, A.M. Malkova, E.A. Kaledina, A.R. Gubal, V.V. Sharoyko "Comparative analysis of IL-1 β blood serum concentration, neutrophil-to-lymphocytes ratio in peripheral blood, and the levels of PD-L1 expression in malignant tissues of the patients with various solid tumors", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1105-1114.
doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2197

DOI: 10.15789/1563-0625-CAO-2197

тельная слабая корреляция концентрации интерлейкина-1 бета с количеством лейкоцитов ($r = 0,34$; $p = 0,019$) и NLR ($r = 0,32$; $p = 0,029$). Степень экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани также имела положительную слабую корреляцию с концентрацией интерлейкина-1 бета в сыворотке крови ($r = 0,33$; $p = 0,037$) и индексом соотношения нейтрофилов и лимфоцитов ($r = 0,33$; $p = 0,034$). В группе пациентов с экспрессией PD-L1 > 5% среднее значение концентрации интерлейкина-1 бета составило $1,65 \pm 0,62$ пг/мл, а среднее значение индекса — $4,26 \pm 0,94 \times 10^9/\text{л}$, что превышает значения группы с недетектируемым PD-L1, но различия не были статистически достоверными.

Полученный результат может свидетельствовать о влиянии иммуносупрессивных свойств опухоли на состояние иммунитета пациента. Комплексное определение экспрессии PD-L1 опухоли, концентрации интерлейкина-1 бета в сыворотке и соотношения нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови может использоваться в качестве оценки иммунного статуса пациента перед началом лечения ингибиторами контрольных точек.

Ключевые слова: IL-1 β , соотношение нейтрофилов и лимфоцитов, PD-L1, корреляция, солидные опухоли, иммунная терапия

COMPARATIVE ANALYSIS OF IL-1 β BLOOD SERUM CONCENTRATION, NEUTROPHIL-TO-LYMPHOCYTES RATIO IN PERIPHERAL BLOOD, AND THE LEVELS OF PD-L1 EXPRESSION IN MALIGNANT TISSUES OF THE PATIENTS WITH VARIOUS SOLID TUMORS

Orlova R.V., Zhukova N.V., Malkova A.M., Kaledina E.A., Gubal A.R., Sharoiko V.V.

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

Abstract. The action of checkpoint inhibitors is based on activation of T cell antitumor immunity, and, therefore, the search for markers of lymphocyte functional activity before starting the therapy is highly relevant. Determination of the PD-L1 expression in tumor tissues reflects immunosuppressive activity of malignant cells, and it is used as a predictive marker in clinical practice. The ratio of neutrophils to lymphocytes in tumor tissue and in peripheral blood can also indicate the activity of adaptive immunity and correlates with the efficacy of therapy. It has been shown that a high level of interleukin 1 beta in the tumor microenvironment is associated with immunosuppression of lymphocytes and, possibly, reflects the activity of the tumor microenvironment. The aim of this work is to study the relationship between tumor expression of PD-L1, the concentration of serum interleukin-1 beta and the ratio of neutrophils and lymphocytes in peripheral blood.

Before starting therapy with checkpoint inhibitors in patients with various solid tumors ($n = 50$), the serum level of interleukin-1 beta was determined by ELISA (ELISA-Best, Novosibirsk, Russia), expression of PD-L1 in the tumor by immunohistochemical method, complete blood count was performed using cytometry. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism 6 (Graph Pad Software, USA) using the statistical methods of Fisher, Mann–Whitney, and Spearman.

The average value of the index of the ratio of neutrophils and lymphocytes (NLR) in peripheral blood was 2.65 ± 0.21 (95% CI 2.22–3.07). The index value of more than 3.5 was found in 18% (9/50) of patients. The mean value of the PD-L1 expression level was $23.02 \pm 4.52\%$ (95% CI 13.86–32.18). Expression of PD-L1 in tumor tissue was detected in 60.1% (25/40) of patients, among whom an increased expression of more than 50% was detected in 20.0% (5/25) of cases. A positive weak correlation was found between the concentration of interleukin 1 beta and the number of leukocytes ($r = 0.34$; $p = 0.019$) and index ($r = 0.32$; $p = 0.029$). The level of PD-L1 expression in tumor tissue also had a weak positive correlation with the serum interleukin 1 beta concentration ($r = 0.33$; $p = 0.037$) and the neutrophil-lymphocyte ratio ($r = 0.33$; $p = 0.034$). In the group of patients with PD-L1 expression > 5%, the mean value of the concentration of interleukin 1 beta was 1.65 ± 0.62 pg/ml, and the mean value of the index was $4.26 \pm 0.94 \times 10^9/\text{l}$, which exceeds the values groups with undetectable PD-L1, but the differences were not statistically significant.

The obtained result may indicate the influence of the immunosuppressive properties of the tumor on the state of the patient's immunity. Comprehensive determination of tumor PD-L1 expression, serum interleukin 1 beta concentration and the ratio of neutrophils and lymphocytes in peripheral blood can be used as an assessment of the patient's immune status before starting treatment with checkpoint inhibitors.

Keywords: IL-1 β , neutrophil-to-lymphocyte ratio, PD-L1, correlation, solid tumors, immune therapy

Исследование было поддержано грантом № 20-015-00498/20 от 19.02.2020.

Введение

Несмотря на многообещающие экспериментальные результаты, терапия ингибиторами контрольных точек (ТИКТ) оказывается неэффективной в 60% случаев [2, 29]. В связи с этим поиск критериев назначения ТИКТ является весьма важной задачей для создания более персонализированного подхода при формировании групп пациентов.

Среди лабораторных показателей активно обсуждается важность определения экспрессии рецепторов и лигандов иммунных контрольных точек (ИКТ). Гиперэкспрессия ИКТ отражает иммуносупрессивную способность злокачественных клеток, однако определение данного маркера рекомендовано только при назначении пембролизумаба для некоторых опухолевых заболеваний (немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак головы и шеи, шейки матки, уротелиальная, эзофагеальная карциномы) [34]. Для НМРЛ и меланомы было выявлено референсное значение уровня экспрессии более 50%, при котором ожидается ответ на терапию, отсутствие экспрессии считается при значении менее 5% [28, 30]. Сложность выявления диагностической значимости данных маркеров при оценке эффективности иммунотерапии заключается в высокой зависимости результатов от индивидуальных особенностей опухолевой ткани, различных методов и реагентов для определения рецепторов [11, 36]. Согласно данным метаанализов по изучению эффективности терапии при метастатической меланоме и немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ), определение уровня экспрессии контрольных точек не позволяет объективно оценить прогностическую значимость этих маркеров [9, 20].

В качестве доступного предиктивного маркера было предложено определение соотношения нейтрофилов и лимфоцитов в периферической крови (NLR) [10]. У здоровых лиц данный показатель варьируется между 0,78 и 3,53 [13]. Согласно исследованию Jiang T. и соавт. при уровне NLR до лечения более 5,0 выживаемость при терапии ингибиторами рецептора, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4) и ингибиторами рецептора запрограммированной

гибели клеток-1 (PD-1) оказалась значительно ниже [19].

Одной из причин иммуносупрессии при онкологических заболеваниях является активность клеток и биологически активных веществ в микроокружении опухоли, представленное макрофагами, ассоциированными с опухолью, дендритными клетками, миелоидными супрессорными клетками, нейтрофилами, тучными клетками, натуральными киллерами, Т- и В-лимфоцитами, опухоль-ассоциированными фибробластами, эндотелиальными клетками [3]. Интерлейкин-1-бета (IL-1 β) является важнейшим участником ключевых регуляторных процессов в микроокружении опухоли. Цитокин влияет непосредственно на пролиферацию клеток самой опухоли, а также на иммуносупрессию, ангиогенез и метастазирование [1]. В различных исследованиях была показана гиперэкспрессия IL-1 β в тканях опухоли или его повышение уровня в сыворотке крови пациентов с раком груди, легких, поджелудочной железы, гепатоцеллюлярной карциномой, колоректальным раком и др., однако среди исследований корреляции концентрации цитокина в ткани и в крови можно выделить только одно, не выявившее повышение IL-1 β вообще [5, 37]. Некоторые исследования показали взаимосвязь повышенного уровня IL-1 β с метастазированием, неблагоприятным прогнозом, а также неэффективностью терапии цитостатиками [22]. Т.о. существуют противоречивые данные о его значимости в клинической практике, более того, на сегодняшний день данных о диагностической значимости определения интерлейкина-1-бета при терапии ингибиторами контрольных точек получено не было.

Целью исследования является сравнительный анализ концентрации IL-1 β в сыворотке крови, соотношения нейтрофилов и лимфоцитов периферической крови и уровня экспрессии PD-L1 в ткани опухоли.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 50 пациентов с различными солидными опухолями, проходивших лечение в Городском клиническом онкологическом диспансере (Санкт-Петербург). В связи с прогрессированием заболевания данным пациентам была назначена терапия ингибитора-

ми контрольных точек. Все пациенты проходили стандартный комплекс клиничко-лабораторного и инструментального медицинского обследования, требуемый при диагностике онкологических заболеваний, включающий: сбор анамнеза, физикальную оценку клинической симптоматики, клинический и биохимический анализы крови, мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ), гистологическая верификация новообразования.

Согласно дизайну исследования, критериями включения являлись: возраст пациентов от 18 до 80 лет, онкологическое заболевание, требующее системной терапии. Критериями исключения являлись наличие ВИЧ-инфекции, сифилиса, декомпенсированного сахарного диабета.

Уровень IL-1 β в сыворотке крови был определен с помощью метода ИФА с использованием набора «Интерлейкин-1-бета, ИФА-БЕСТ» (г. Новосибирск). Все измерения проводились на планшетном ИФА спектрофотометре BIO-TEK ELx800 (Thermo Fisher Scientific, США). Линейный диапазон концентраций составляет 0-250 пг/мл. Верхний предел значений 11,00 пг/мл (Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения

концентрации человеческого интерлейкина-1-бета. ЗАО «Вектор-Бест». Новосибирск, 15.10.08. 23 с.).

Клинический анализ крови был осуществлен с помощью метода цитометрии на автоматическом гематологическом анализаторе модульного типа XN 1000 (Sysmex, Япония), уровень экспрессии PDL1 был определен иммуно-гистохимическим методом (ИГХ) (<http://www.cancergenome.ru/mutations/PD-L1/>). Результаты данных исследований были получены из историй болезни пациентов.

Статистический анализ осуществлялся с использованием программы GraphPad Prism 6 (Graph Pad Software, США) с использованием непараметрических критериев Фишера, Манна-Уитни, корреляционного анализа Спирмена. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости тестируемой гипотезы $p < 0,05$.

Результаты

В исследовании приняли участие 50 пациентов, среди которых большинство проходило лечение в связи с наличием метастатической мела-

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОВ (n = 50)

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS (n = 50)

Характеристика Characteristic		Количество пациентов Number of patients % (n)
Возраст Age	20-40	8% (4)
	40-50	10% (5)
	50-60	18% (9)
	60-70	34% (17)
	70-80	26% (13)
	80-90	4% (2)
Локализация первичного очага Localization of the primary focus	Меланома Melanoma	52% (26)
	НМРЛ NSLC	16% (8)
	Гастроинтестинальные опухоли Gastrointestinal cancers	10% (5)
	Опухоли мочеполовой системы Tumors of the genitourinary system	10% (5)
	Опухоли головы и шеи Head and neck cancer	6% (3)
	Опухоли женской репродуктивной системы Tumors of the female reproductive system	4% (2)
	Без выявленного первичного очага No identified primary focus	2% (1)
Пол Gender	Мужчины Men	52% (26)
	Женщины Women	48% (24)

номы — 52% (26/50). Более подробное описание выборки представлено в таблице 1.

Результаты клинического анализа крови были доступны у 50 пациентов. На основе данных о количестве нейтрофилов и лимфоцитов был подсчитан индекс NLR. Среднее значение индекса составило $2,65 \pm 0,21$ (95% CI 2,22–3,07). Значение индекса более 3,5 было обнаружено у 18% (9/50) пациентов.

Результаты ИГХ анализа были доступны у 41 пациента. Среднее значение уровня экспрессии PD-L1 составило $23,02 \pm 4,52\%$ (95% CI 13,86–32,18). Экспрессия PD-L1 в ткани опухоли была выявлена у 60,1% (25/40) пациентов, среди которых повышенная экспрессия более 50% была определена в 20,0% (5/25) случаев.

Была обнаружена положительная слабая корреляция концентрации IL-1 β с количеством лейкоцитов ($r = 0,34$; $p = 0,019$) и NLR ($r = 0,32$; $p = 0,029$) (рис. 1).

Степень экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани также имела положительную слабую корреляцию с концентрацией IL-1 β в сыворотке крови ($r = 0,33$; $p = 0,037$) (рис. 2) и NLR ($r = 0,33$; $p = 0,034$) (рис. 3). В группе пациентов с экспрессией PD-L1 > 5% среднее значение концентрации IL-1 β составило $1,65 \pm 0,62$ пг/мл, а среднее значение NLR — $4,26 \pm 0,94 \times 10^9/\text{л}$, что превышает

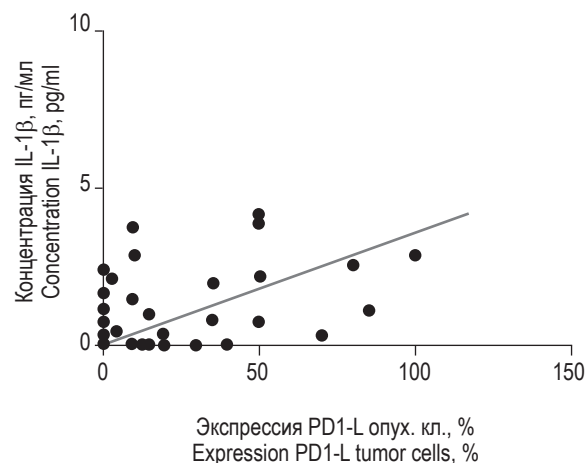


Рисунок 2. Результаты корреляционного анализа концентрации IL-1 β в сыворотке крови и экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани

Примечание. Положительная слабая корреляция степени экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани с концентрацией IL-1 β в сыворотке крови ($r = 0,33$; $p = 0,037$).

Figure 2. Results of correlation analysis of IL-1 β concentration in blood serum and PD-L1 expression in tumor tissue

Note. Positive weak correlation of the degree of PD-L1 expression in tumor tissue with the concentration of IL-1 β in the blood serum ($r = 0,33$; $p = 0,037$).

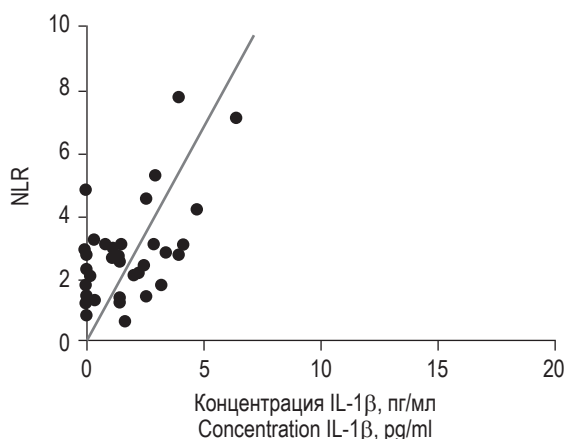


Рисунок 1. Результаты корреляционного анализа концентрации IL-1 β в сыворотке крови и индекса NLR

Примечание. Положительная слабая корреляция концентрации IL-1 β с количеством лейкоцитов ($r = 0,34$; $p = 0,019$) и NLR ($r = 0,32$; $p = 0,029$).

Figure 1. Results of the correlation analysis of the concentration of IL-1 β in the blood serum and the NLR index

Note. Positive weak correlation of IL-1 β concentration with leukocyte count ($r = 0,34$; $p = 0,019$) and NLR ($r = 0,32$; $p = 0,029$).

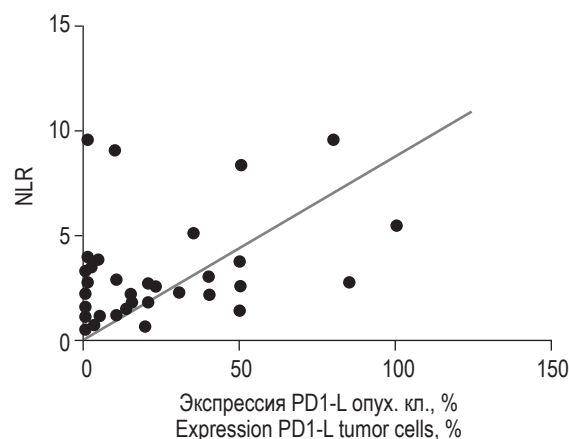


Рисунок 3. Результаты корреляционного анализа индекса NLR и экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани

Примечание. Положительная слабая корреляция степени экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани с NLR ($r = 0,33$; $p = 0,034$).

Figure 3. Results of correlation analysis of NLR index and PD-L1 expression in tumor tissue

Note. Positive weak correlation of the degree of PD-L1 expression in tumor tissue with NLR ($r = 0,33$; $p = 0,034$).

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ IL-1 β В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИЕЙ ОПУХОЛИ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

TABLE 2. RESULTS OF DETERMINING THE CONCENTRATION OF IL-1 β IN THE BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH DIFFERENT TUMOR LOCALIZATION (LITERATURE REVIEW)

	Первый автор, год First author, year	Локализация опухоли Tumor localization	Количество пациентов Number of patients	Результат Results of the study
Определение концентрации IL-1β в сыворотке Determination of Serum IL-1 β Concentration	Erplein, 2013	Желудок Stomach	180	Статистически значимого отличия от показателей здоровых доноров не обнаружено No statistically significant difference from the indicators of healthy donors was found
	Chen, 2015	Кишка Gut	99	
	Takashi Ueda, 1994		24	
	Kantola, 2012		148	
	Błogowski, 2014	Поджелудочная железа Pancreas	43	
	Montero, 2009	Почка Kidney	103	Повышен Increased p < 0,0001
	Tazaki, 2011	Простата Prostate	39	
	Barrera, 2015	Легкие Lungs	110	
	Jiang, 2015	Меланома Melanoma	51	
	Yurkovetsky, 2007		179	
Определение экспрессии IL-1β в опухолевой ткани Determination of IL-1 β expression in tumor tissue	Miller, 2000	Грудь Breast	26	Экспрессия Expression 88%
	Xu Le, 2015	Почка Kidney	267	127 пациентов с высокой экспрессией 127 highly expressed patients
	Maynard, 2019	Простата Prostate	Нет данных No data	Статистически значимого отличия от показателей здоровых доноров не обнаружено No statistically significant difference from the indicators of healthy donors was found
Комплексное определение Complex definition	Yamaoka, 2001	Желудок Stomach	70	Статистически значимого отличия от показателей здоровых доноров не обнаружено No statistically significant difference from the indicators of healthy donors was found

значения группы с недетектируемым PD-L1, но различия не были статистически достоверными.

Обсуждение

Согласно результатам проведенного исследования, концентрация IL-1 β в сыворотке крови пациентов с солидными опухолями до начала ТИКТ оказался в пределах нормы.

Полученные результаты совпадают с большинством исследований концентрации цитокина в сыворотке крови пациентов с различными опухолевыми заболеваниями до начала системной терапии (табл. 2). Однако стоит отметить исследования, выявившие повышенный уровень интерлейкина до терапии, а также ассоциацию с более тяжелым течением заболевания и прогрессированием опухоли при НМРЛ и меланоме [4, 18]. Также повышенный уровень цитокина был определен при раке простаты [32]. При этом другие работы показали повышенную экспрессию IL-1 β в тканях опухоли почки и молочной железы [24, 35].

Таким образом, диагностическая значимость определения IL-1 β в сыворотке крови на данный момент является открытым вопросом и требует дальнейшего изучения с более строгим дизайном исследования и желательным сравнением с экспрессией цитокина в опухолевой ткани.

В исследовании была установлена положительная корреляционная взаимосвязь степенью экспрессии PD-L1 в опухолевой ткани, концентрацией IL-1 β в сыворотке и индексом NLR в периферической крови. Описанная корреляционная взаимосвязь может быть объяснена действием цитокина в микроокружении опухоли. Гиперпродукция IL-1 β в тканях опухоли способствует дифференциации инфильтрирующих опухоль макрофагов в макрофаги 2-го типа, синтезирующих противовоспалительные цитокины IL-4, IL-10, IL-13 и трансформирующий ростовой фактор бета (TGF- β), а также активации миелоидных супрессорных клеток, индуцирует иммуносупрессивные свойства у Т-регуляторных клеток [6, 8, 21, 26, 27, 33]. Кроме того, IL-1 β индуцирует миграцию и пролиферацию миелоидных клеток в опухолевый очаг, из-за чего относительное количество опухоль-инфильтрирующих

лимфоцитов (TILs) снижается [16]. Высокий уровень TILs ассоциирован с эффективностью терапии ингибиторами контрольных точек и находится в обратной зависимости с индексом NLR периферической крови [17]. Таким образом, можно предположить, что IL-1 β напрямую и/или опосредованно влияет на адаптивный противоопухолевый иммунный ответ.

Было показано, что экспрессия PD-L1 на инфильтрирующих опухоль миелоидных клетках и опухолевых клетках может быть индуцирована при гиперпродукции IL-1 β в микроокружении опухоли [15]. Это может объяснять IL-1 β -зависимое увеличение экспрессии PD-L1 в ткани опухоли, что требует дальнейшего верификации.

Полученные результаты могут свидетельствовать о влиянии иммуносупрессивных свойств опухоли и ее микроокружения на состояние адаптивного иммунитета пациента и имеют научную значимость.

Выводы

В исследуемой выборке пациентов концентрация IL-1 β в сыворотке крови находилась в пределах нормы, поэтому сейчас сложно определить клиническую значимость цитокина для оценки состояния адаптивного иммунитета пациента.

Наличие положительной корреляции концентрации IL-1 β в сыворотке крови, значения индекса NLR и степени экспрессии PD-L1 опухолевой тканью позволяет предположить, что комплексное определение описанных лабораторных показателей может быть использовано для оценки иммунного статуса пациента перед началом терапии ингибиторами контрольных точек для разработки алгоритмов персонализированного подхода противоопухолевой терапии.

Благодарности

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе материала сотрудникам Городского клинического онкологического диспансера.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Apte R.N., Dotan S., Elkabets M., White M.R., Reich E., Carmi Y., Song X., Dvozkin T., Krelin Y., Voronov E. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev.*, 2006, Vol. 25, no. 3, pp. 387-408.
2. Azoury S.C., Straughan D.M., Shukla V. Immune checkpoint inhibitors for cancer therapy: clinical efficacy and safety. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2015, Vol. 15, no. 6, pp. 452-462.
3. Baghban R., Roshangar L., Jahanban-Esfahlan R., Seidi K., Ebrahimi-Kalan A., Jaymand M., Kolahian S., Javaheri T., Zare R. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun. Signal.*, 2020, Vol. 18, no. 1, 59. doi: 10.1186/s12964-020-0530-4.

4. Barrera L., Montes-Servín E., Barrera A., Ramírez-Tirado L.A., Salinas-Parra F., Bañales-Méndez J.L., Sandoval-Ríos M., Arrieta Ó. Cytokine profile determined by data-mining analysis set into clusters of non-small-cell lung cancer patients according to prognosis. *Ann. Oncol.*, 2015, Vol. 26, no. 2, pp. 428-435.
5. Bent R., Moll L., Grabbe S., Bros M. Interleukin-1 beta – A friend or foe in malignancies? *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 8, 2155. doi: 10.3390/ijms19082155.
6. Błogowski W., Deskur A., Budkowska M., Sałata D., Madej-Michniewicz A., Dąbkowski K., Dołęgowska B., Starzyńska T. Selected cytokines in patients with pancreatic cancer: a preliminary report. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 5, e97613. doi: 10.1371/journal.pone.0097613.
7. Bunt S.K., Sinha P., Clements V.K., Leips J., Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 1, pp. 284-290.
8. Chen Z.Y., He W.Z., Peng L.X., Jia W.H., Guo R.P., Xia L.P., Chao N.Q. A prognostic classifier consisting of 17 circulating cytokines is a novel predictor of overall survival for metastatic colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer*, 2015, Vol. 136, no. 3, pp. 584-592.
9. Davis A.A., Patel V.G. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US food and drug administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer*, 2019, Vol. 7, no. 1, 278. 10.1186/s40425-019-0768-9
10. de Angulo G., Yuen C., Palla S.L., Anderson P.M., Zweidler-McKay P.A. Absolute lymphocyte count is a novel prognostic indicator in ALL and AML: implications for risk stratification and future studies. *Cancer*, 2008, Vol. 112, no. 2, pp. 407-415.
11. Duruisseaux M., Rouquette I., Adam J., Cortot A., Cazes A., Gibault L., Damotte D., Lantuejoul S. Efficacy of PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors and PD-L1 testing in thoracic cancers. *Ann. Pathol.*, 2017, Vol. 37, no. 1, pp. 61-78.
12. Epplein M., Xiang Y.B., Cai Q., Peek R.M., Li H., Correa P. Circulating cytokines and gastric cancer risk. *Cancer Causes Control*, 2013, Vol. 24, no. 12, pp. 2245-2250.
13. Forget P., Khalifa C., Defour J.P., Latinne D., van Pel M.C., de Kock M. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Res. Notes*, 2017, Vol. 10, 12. 10.1186/s13104-016-2335-5.
14. Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 4, pp. 253-268.
15. Guo B., Fu S., Zhang J., Liu B., Li Z. Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. *Sci Rep.*, 2016, Vol. 6, pp. 1-12.
16. Hagemann T., Lawrence T., McNeish I., Charles K.A., Kulbe H., Thompson R.G., Robinson S.C., Balkwill F.R. “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF-κB. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 6, pp. 1261-1268.
17. He Q.F., Xu Y., Li J., Huang Z.M., Li X.H., Wang X. CD81 T-cell exhaustion in cancer: mechanisms and new area for cancer immunotherapy. *Brief Funct. Genomics*, 2019, Vol. 18, no. 2, pp. 99-106.
18. Jiang H., Gebhardt C., Umansky L., Beckhove P., Schulze T.J., Utikal J., Umansky V. Elevated chronic inflammatory factors and myeloid-derived suppressor cells indicate poor prognosis in advanced melanoma patients. *Int. J. Cancer*, 2015, Vol. 136, no. 10, pp. 2352-2360.
19. Jiang T., Qiao M., Zhao C., Li X., Gao G., Su C., Ren S., Zhou C. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with outcome of advanced-stage cancer patients treated with immunotherapy: a meta-analysis. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2018, Vol. 67, no. 5, pp. 713-727.
20. Jr P.A., Santoro I., Tadokoro H., Lopes G., Filardi B.A., Barreto C.M.N. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small cell lung cancer: a network meta-analysis. *Eur. J. Cancer*, 2015, Vol. 8, no. 4, pp. 479-488.
21. Kantola T., Klintrup K., Väyrynen J.P., Vornanen J., Bloigu R., Karhu T., Herzig K.-H., Näpänkangas J., Mäkelä J., Karttunen T.J., Tuomisto A., Mäkinen M.J. Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer*, 2012, Vol. 107, no. 10, pp. 1729-1736.
22. Litmanovich A., Khazim K., Cohen I. The role of Interleukin-1 in the pathogenesis of cancer and its potential as a therapeutic target in clinical practice. *Oncol. Ther.*, 2018, Vol. 6, pp. 109-127.
23. Maynard J.P., Ertunc O., Kulac I., Baena-Del Valle J.A., DeMarzo A.M., Sfanos K.S. IL-8 expression is associated with prostate cancer aggressiveness and androgen receptor loss in primary and metastatic prostate cancer. *Mol Cancer Res.*, 2020, Vol. 18, no. 1, pp. 153-165.
24. Miller L.J., Kurtzman S.H., Anderson K., Wang Y., Stankus M., Renna M., Lindquist R., Bar44rows G., Kreutzer D.L. Interleukin-1 family expression in human breast cancer: Interleukin-1 receptor antagonist. *Cancer Invest.*, 2000, Vol. 18, no. 4, pp. 293-302.
25. Montero A.J., Diaz-Montero C.M., Millikan R.E., Liu J., Do K.A., Hodges S., Jonasch E., McIntyre B.W., Hwu P., Tannir N. Cytokines and angiogenic factors in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with interferon-alpha: association of pretreatment serum levels with survival. *Ann. Oncol.*, 2009, Vol. 20, no. 10, pp. 1682-1687.
26. Murray P.J. Macrophage polarization. *Ann. Rev. Physiol.*, 2017, Vol. 79, pp. 541-566.
27. Oh H., Grinberg-Bleyer Y., Liao W., Maloney D., Wang P., Wu Z., Wang J., Bhatt D.M., Heise N., Schmid R.M., Hayden M.S., Klein U., Rabadan R., Ghosh S. An NF-κB transcription-factor-dependent lineage-specific transcriptional program promotes regulatory t cell identity and function. *Immunity*, 2017, Vol. 47, no. 3, pp. 450-465.

28. Patnaik A., Kang S.P., Rasco D., Papadopoulos K.P., Ellassaiss-Schaap J., Beeram M., Drengler R., Chen C., Smith L., Espino G., Gergich K., Delgado L., Daud A., Lindia J.A., Li X.N., Pierce R.H., Yearley J.H., Wu D., Laterza O., Lehnert M., Iannone R., Tolcher A.W. Phase I study of pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2015, Vol. 21, no. 19, pp. 4286-4293.
29. Robert C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, 3801. doi: 10.1038/s41467-020-17670-y.
30. Schmid-Bindert G., Jiang T. First-line nivolumab (anti-PD-1) monotherapy in advanced NSCLC: the story of immune checkpoint inhibitors and "the sorcerers apprentice". *Transl. Lung Cancer Res.*, 2015, Vol. 4, no. 3, pp. 215-216.
31. Song X., Krelm Y., Dvorkin T., Bjorkdahl O., Segal S., Dinarello C.A., Voronov E., Apte R.N. CD11b + / Gr-1 + immature myeloid cells mediate suppression of T Cells in mice bearing tumors of IL-1 β -Secreting Cells. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 12, pp. 8200-8208.
32. Tazaki E., Shimizu N., Tanaka R., Yoshizumi M., Kamma H., Imoto S., Goya T., Kozawa K., Nishina A., Kimura H. Serum cytokine profiles in patients with prostate carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 2011, Vol. 2, no. 5, pp. 887-891.
33. Ueda T., Shimada E., Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. *J. Gastroenterol.*, 1994, Vol. 29, no. 4, pp. 423-429.
34. Vaddepally R.K., Kharel P., Pandey R., Garje R., Chandra A.B. Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence. *Cancers*, 2020, Vol. 12, no. 3, 738. 10.3390/cancers12030738
35. Xu L., Zhu Y., An H., Liu Y., Lin Z., Wang G. Clinical significance of tumor-derived IL-1 β and IL-18 in localized renal cell carcinoma: associations with recurrence and survival. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, 2015, Vol. 33, no. 2, pp. 68.e9-e16.
36. Xu Y., Wan B., Chen X., Zhan P., Zhao Y., Zhang T., Liu H., Afzal M.Z., Dermime S., Hochwald S.N., Hofman P., Borghaei H., Lin D., Lv T., Song Y. The association of PD-L1 expression with the efficacy of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy and survival of non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Transl. Lung Cancer Res.*, 2019, Vol. 8, no. 4, pp. 413-428.
37. Yamaoka Y., Kodama T., Kita M., Imanishi J., Kashima K., Graham D.Y. Relation between cytokines and *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Helicobacter*, 2001, Vol. 6, no. 2, pp. 116-124.
38. Yurkovetsky Z.R., Kirkwood J.M., Edington H.D., Marrangoni A.M., Velikokhatnaya L., Winans M.T., Gorelik E., Lokshin A.E. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha2b. *Clin Cancer Res.*, 2007, Vol. 13, no. 8, pp. 2422-2428.

Авторы:

Орлова Р.В. — д.м.н., профессор, заведующая отделением Городского клинического онкологического диспансера, медицинский факультет ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Жукова Н.В. — к.м.н., доцент, заведующая отделением Городского клинического онкологического диспансера, медицинский факультет ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Orlova R.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department, City Clinical Oncological Center, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Zhukova N.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of Department, City Clinical Oncological Center, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Малкова А.М. — младший научный сотрудник, медицинский факультет ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Каледина Е.А. — ординатор, медицинский факультет ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Губаль А.Р. — к.х.н., младший научный сотрудник, химический факультет ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Шаройко В.В. — д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник, химический факультет ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Malkova A.M., Junior Research Associate, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Kaledina E.A., Clinical Resident, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Gubal A.R., PhD (Chemistry), Junior Research Associate, Faculty of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Sharoiko V.V., PhD, MD (Biology), Professor, Leading Research Associate, Faculty of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 29.01.2021

Отправлена на доработку 20.04.2021

Принята к печати 23.04.2021

Received 29.01.2021

Revision received 20.04.2021

Accepted 23.04.2021

РОЛЬ МУТАЦИИ ГЕНА ПРОТИВОМИКРОБНОГО ПЕПТИДА DEFB126 В ПАТОГЕНЕЗЕ МУЖСКОГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО БЕСПЛОДИЯ

Хасанова Е.М., Ганковская Л.В., Бурмакина В.В.

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

Резюме. Мужское бесплодие является мультифакториальным заболеванием, и выявление этиопатогенетических механизмов, ведущих к его развитию, является актуальной проблемой. Часто установить причину снижения репродуктивной функции сперматозоидов не представляется возможным, что объясняет высокий процент постановки диагноза «идиопатическое бесплодие». Предполагается, что мутация гена противомикробного пептида семейства β -дефензинов DEFB126 негативно сказывается на оплодотворяющей способности сперматозоидов на разных уровнях: ухудшается их способность к миграции сквозь слой цервикальной слизи, снижается способность связываться с эпителием верхних отделов женского репродуктивного тракта, а также повышается подверженность инфекциям репродуктивного тракта ввиду нарушения местной защитной функции дефензинов. Таким образом, целью исследования явилось изучение роли полиморфного маркера rs11468374 гена противомикробного пептида DEFB126 в патогенезе мужского идиопатического бесплодия.

Выборка пациентов с нарушением репродуктивной функции включала 54 человека в возрасте от 34 до 42 лет, группу контроля составили 19 доноров эякулята без острых или хронических заболеваний в возрасте 28–36 лет. Проведено исследование уровней экспрессии гена DEFB126, проанализированы частоты распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 среди мужчин московской популяции и ассоциация этих показателей с показателями подвижности сперматозоидов испытуемых.

Было показано снижение экспрессии гена DEFB126 в более чем семь раз у пациентов с бесплодием в сравнении с донорами группы контроля. Анализ распределения частот аллелей и генотипов по полиморфному маркеру rs11468374 гена DEFB126 выявил, что среди мужчин с бесплодием мутантный аллель встречается в почти два раза чаще в сравнении с контролем. Среди доноров группы сравнения мужчин с генотипом гена DEFB126 del/del выявлено не было, в то время как среди пациентов этот показатель составил 16,1%. Подвижность сперматозоидов пациентов с генотипом DEFB126 del/del была ниже нормы в 5,2 раза.

Таким образом, полученные нами данные могут быть использованы для углубления знаний о механизмах патогенеза мужского идиопатического бесплодия и совершенствования методов его диагностики, а также развития персонализированного подхода в терапии нарушения мужской репродуктивной функции. Показанная нами ассоциация носительства мутантного аллеля del и снижения уровня подвижности сперматозоидов пациентов свидетельствует о роли данного полиморфизма в патогенезе мужского бесплодия. Снижение уровня экспрессии гена DEFB126 в группе пациентов с бесплодием также подтверждает вклад дефензина в патогенез заболевания.

Ключевые слова: противомикробный пептид, DEFB126, HBD126, аллельный полиморфизм, экспрессия генов, идиопатическое бесплодие, подвижность сперматозоидов, спермограмма

Адрес для переписки:

Хасанова Елена Минсалимовна
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1.
Тел.: 8 (916) 301-93-57.
E-mail: joimolino@gmail.com

Address for correspondence:

Khasanova Elena M.
N. Pirogov Russian National Research Medical University
117997, Russian Federation, Moscow, Ostrovityanov str., 1.
Phone: 7 (916) 301-93-57.
E-mail: joimolino@gmail.com

Образец цитирования:

Е.М. Хасанова, Л.В. Ганковская, В.В. Бурмакина
«Роль мутации гена противомикробного пептида DEFB126 в патогенезе мужского идиопатического бесплодия» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1115-1124.
doi: 10.15789/1563-0625-ROA-2342
© Хасанова Е.М. и соавт., 2021

For citation:

E.M. Khasanova, L.V. Gankovskaya, V.V. Burmakina
“Role of antimicrobial peptide DEFB126 mutation in pathogenesis of male idiopathic infertility”, Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1115-1124.
doi: 10.15789/1563-0625-ROA-2342
DOI: 10.15789/1563-0625-ROA-2342

ROLE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE DEFB126 MUTATION IN PATHOGENESIS OF MALE IDIOPATHIC INFERTILITY

Khasanova E.M., Gankovskaya L.V., Burmakina V.V.

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

Abstract. Male infertility is a multifactorial disease, and elucidation of etiopathogenetic mechanisms of its progression is a topical issue. High percentage of the “idiopathic infertility” diagnosis is largely caused by inability to establish etiology of decrease in reproductive spermatogenic function. Mutation of β -defensin DEFB126 gene is supposed to affect the fertilizing ability of spermatozoa at different levels: it may decrease their ability to migrate through the cervical mucus and reduce binding capacity to epithelial layer of upper female reproductive tract, and it may also increase susceptibility for infections of reproductive tract, due to impairment of local protective function of defensins. Thus, the aim of the present study was to examine possible role of rs11468374 gene polymorphism of the *DEFB126* gene in pathogenesis of male idiopathic infertility. Patients and methods: The group of patient with decreased fertility included 54 male subjects, ages 34 to 42, with a control group of 19 ejaculate donors without acute or chronic disease aged 28 to 36. The indicators of sperm motility in the Moscow population were compared with individual levels of DEFB126 gene expression, as well as with estimated distribution frequency of rs11468374 alleles and genotypes among the subjects.

As compared with the control group, the infertile patients exhibited a more than seven-fold reduction of *DEFB126* gene expression. Analysis of distribution frequency for alleles and genotypes rs11468374 polymorphic marker of the *DEFB126* gene revealed that the mutant allele is detected almost twice as often in males with infertility, as compared with control group. No cases with the *DEFB126 del/del* genotype were found among the control group, in contrary to 16.1% in the group of patients. The patients with *DEFB126 del/del* genotype exhibited 5.2-fold reduction of sperm motility. Thus, the data obtained may be used to extend our knowledge on the pathogenetic mechanisms of male idiopathic infertility and to improve techniques for its diagnostics, as well as to provide personalized approach to the treatment of male reproductive disorders. The association between carriage of *del* mutant allele and decreased level of sperm motility suggests a role of this polymorphism in pathogenesis of male infertility. A general decrease in the level of *DEFB126* gene expression in the patients affected by infertility also presumes a contribution of defensin 126 to pathogenesis of the disorder.

Keywords: antimicrobial peptide, *DEFB126*, *HBD126*, gene polymorphism, gene expression, idiopathic infertility, sperm motility, spermogram

Введение

Противомикробные пептиды представляют собой гетерогенную группу молекул, являющихся первой линией защиты организма от патогенов [7]. Это небольшие, состоящие из 12–50 аминокислотных остатков молекулы с различными физико-химическими свойствами и структурой. Наиболее важными противомикробными пептидами млекопитающих являются дефензины [13, 18, 23, 26]. Описано 3 подсемейства дефензинов: α -, β - and θ -дефензины, в организме человека продуцируются α - и β -дефензины [4]. Противомикробные пептиды семейства β -дефензинов являются важными гуморальными компонентами системы врожденного иммунитета и широко экспрессируются эпителиальными клетками слизистых оболочек респираторного и гастроинтестинального трактов, кожи, рта, глаза, а также мужского и женского урогенитальных трактов [3, 18]. Спектр их функций охватывает такие процессы, как обеспечение прямой противомикробной активности в отношении широкого спектра чужеродных микроорганизмов, влияние на хемотаксис, стимуляцию пролиферации клеток и вы-

работку ими цитокинов, а также участие в процессах репродукции [20, 27].

Было показано, что несколько молекул семейства β -дефензинов (*DEFB118*, *DEFB125–127*), гены которых картированы на коротком плече 20 хромосомы, специфически и на высоком уровне экспрессируются в мужском репродуктивном тракте и мужскими половыми клетками, однако их роли и функции остаются не до конца изученными [27, 33].

Противомикробный пептид *DEFB126* (*HBD126*) является важным структурным компонентом гликокаликса сперматозоидов млекопитающих и представляет собой гомодимер, связанный с мембраной гидрофобными аминокислотными остатками, с молекулярной массой 13 кДа и длиной 111 аминокислот. β -дефенсин *DEFB126* и состоит из типичного для этого семейства молекул богатого цистеином бета-дефензинового остова и специфического высоко гликозилированного длинного пептидного конца [29]. Карбоксильный конец протеина имеет порядка 20 сайтов О-гликозилирования и содержит гликаны, богатые сиаловыми кислотами [19]. Как член семейства β -дефензинов, *DEFB126* демонстрирует

противомикробную активность *in vitro* и способность связывать липополисахарид [24]. Противомикробную активность дефензины проявляют, связываясь с плазматическими мембранами бактерий и разрушая их [3, 24]. Подтверждают защитную функцию белка эксперименты, продемонстрировавшие антимикробную активность *in vitro* рекомбинантного *DEFB126* человека и его крысиного аналога *Defb22* [16, 21]. Существуют единичные исследования, показывающие, что спектр функций *DEFB126* также охватывает такие процессы, как обеспечение эффективного продвижения сперматозоида в женском половом тракте, препятствие распознаванию сперматозоидов компонентами женской иммунной системы и успешное оплодотворение яйцеклетки [35, 36, 37].

В последние годы коллективом ученых под руководством Tollner T.L. было продемонстрировано, что идентифицированный в структуре гена дефензина человека *DEFB126* полиморфизм dbSNP (rs11468374), представляющий собой дуплектидную делецию во втором экзоне (2-nt *del/del*), вовлечен в патогенез снижения мужской репродуктивной функции [30]. Предполагается, что мутация гена *DEFB126* ассоциирована со значительным изменением структуры гликокаликса и снижением количества О-гликанов в структуре его молекул и встречается среди мужчин разных популяций, опосредуя нарушения их фертильной функции невыясненного генеза [11, 14, 30, 35].

В связи с этим **целью исследования** явилось изучение роли полиморфного маркера rs11468374 гена противомикробного пептида *DEFB126* в патогенезе мужского идиопатического бесплодия. Для достижения поставленной цели нами были определены уровни экспрессии гена *DEFB126* в клетках подвижной фракции эякулята мужчин, имеющих нарушения фертильной функции, исследованы распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 среди мужчин московской популяции и ассоциация этих показателей с показателями подвижности сперматозоидов испытуемых.

Материалы и методы

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ (протокол заседания №192 от 27 января 2020 г.). Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании и согласие на обработку персональных данных, после чего были получены образцы эякулята.

Исследуемые группы

В исследование были включены 73 человека. В основную группу вошли 54 пациента с нарушением фертильной функции неустановленного генеза (средний возраст — $38,6 \pm 4,5$ лет). Кон-

трольную группу составили 19 здоровых доноров спермы репродуктивного возраста (средний возраст составил $32,8 \pm 4,7$ года). Материал был предоставлен Н.Г. Митюшиной (клиника вспомогательных репродуктивных технологий и лечения бесплодия «ВитроКлиник», руководитель сети центров репродукции, врач-репродуктолог, к.м.н. Базанов П.А.).

Критериями включения в основную группу являлись: мужской фактор бесплодия неустановленного генеза, подписание информированного согласия на участие в исследовании, возраст пациента от 28 до 45 лет.

Критериями исключения из основной группы являлись: наличие острых и обострения хронических заболеваний, гидроцеле, варикоцеле, паховой грыжи и других заболеваний, негативно влияющих на репродуктивную функцию, установленный женский фактор бесплодия в паре, употребление алкоголя и курение.

В группу контроля включались доноры с нормальными параметрами спермограммы и без каких-либо нарушений со стороны репродуктивной системы, соматических заболеваний, острых или обострения хронических заболеваний на момент участия в эксперименте.

Сбор эякулята и анализ подвижности сперматозоидов проводился в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения по исследованию и обработке эякулята [9]. Подвижность сперматозоидов оценивали методом фазово-контрастной микроскопии [9]. В зависимости от направления движения и скорости половые клетки принято делить на 4 категории — А, В, С, D. К категории А относятся сперматозоиды,двигающиеся по прямолинейной траектории с высокой скоростью, к категории В — так же прямолинейнодвигающиеся клетки, однако с меньшей скоростью. Категорию С составляют сперматозоиды, имеющие аномалии строения шейки или хвоста, в связи с чем они двигаются вокруг своей оси или хаотично, и к категории D относятся неподвижные клетки. Таким образом, согласно рекомендациям ВОЗ, показатель подвижности складывается из процентного содержания в эякуляте сперматозоидов категорий А и В, и в норме составляет 50%.

Получение подвижной фракции сперматозоидов

В соответствии с рекомендациями, описанными в «Руководстве ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека», с использованием коммерческого набора SPERMGRAD™ (Vitrolife Sweden AB) в строгом соответствии с протоколом производителя методом центрифугирования эякулята в градиенте плотностей производили отделение фракции подвижных сперматозоидов от округлых клеток, лейкоцитов, дегенерирующих половых клеток и клеточного дебриса.

Для получения двуслойного градиента, состоящего из 45%-ных и 90%-ных растворов, 100%-ный раствор SpermGrad (Vitrolife Sweden AB) разводили с использованием pH-стабильной среды G-MOPS (Vitrolife Sweden AB). В чистые пробирки для центрифугирования с коническим дном сначала вносили 1 мл 90%-ного раствора, затем медленно наслаивали на него 1 мл 45%-ного раствора. Затем осторожно, не нарушая сепарации слоев, путем наслаивания на градиент, вносили 1 мл разжиженного эякулята, и центрифугировали при 600 g в течение 20 минут. Далее пастеровской пипеткой осторожно удаляли надосажок, содержащий семенную плазму, верхнюю интерфазу, 45%-ный слой и нижнюю интерфазу, а осадок, содержащий 90%-ный слой и целевые клетки, переносили в другую стерильную коническую пробирку для центрифугирования, добавляли 2 мл буфера для гамет SpermRinse (Vitrolife Sweden AB) и центрифугировали при 600 g 11 минут. Затем удаляли супернатант, наслаивали на осадок 1 мл буфера SpermRinse и инкубировали в течение 2 часов при +37 °C в атмосфере 6% CO₂.

После определения подвижности сперматозоидов и выделения подвижной фракции сперматозоидов, биоматериал в течение часа транспортировали в лабораторию кафедры иммунологии МБФ (зав. каф. д.м.н., проф. Ганковская Л.В.), где определяли экспрессию и полиморфный маркер rs11468374 гена *DEFB126*.

Анализ экспрессии и полиморфного маркера гена *DEFB126*

Для выделения нуклеиновых кислот из полученной фракции сперматозоидов использовали набор реактивов для выделения ДНК/РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля «АмплиПРАИМ Рибо-сорб» (ИнтерЛабСервис, Россия) строго в соответствии с протоколом производителя. Полученные образцы хранили при -70 °C. Далее осуществлялась постановка реакции обратной транскрипции (ОТ) в объеме 25 мкл с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» («Синтол», Россия) для синтеза копий кДНК на основе выделенной матричной РНК. Затем полученную кДНК использовали в постановке полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Реакционную смесь готовили из реактивов «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» («Синтол», Россия), согласно рекомендациям фирмы-производителя. Реакцию ПЦР-РВ проводили в амплификаторе Rotor-Gene Q (QIAGEN Hiden, Германия). Уровень экспрессии гена *DEFB126* оценивался по методу 2^{-ΔΔCt} в относительных единицах относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства β-актина *ACTB* (рис. 1, 2, 3) [6, 8]. Необходимые праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия).

Программа ПЦР для исследования экспрессии гена *DEFB126* состояла из следующих этапов:

- денатурация 95 °C — 5 мин, амплификация (отжиг 94 °C — 20 с, элонгация 64 °C — 30 с) — 35 циклов;

- финальная экстенция 72 °C 5 мин.

Для определения мутации гена человека *DEFB126* rs11468374 проводилась постановка ПЦР-РВ. Последовательности аллель-специфичных праймеров для определения мутации в гомозиготном состоянии *del/del DEFB126* и для определения аллеля дикого типа в гомозиготном состоянии *wt/wt DEFB126* были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Программа для определения полиморфизма гена *DEFB126* rs11468374 представлена ниже:

- денатурация 94 °C — 3 мин;

- амплификация (отжиг 94 °C — 60 с, элонгация 60 °C — 20 с, экстенция 72 °C — 1 мин) 35 циклов;

- финальная экстенция 72 °C 7 минут.

Статистическая обработка данных проведена с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2016, STATISTICA 10.0 и GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, США). Данные были проверены на нормальность распределения, определены их дисперсии. Сравнение исследуемых групп проводили с использованием непараметрического аналога дисперсионного анализа — критерия Краскела—Уоллиса и U-критерия Манна—Уитни.

Частоту встречаемости мутантного аллеля и аллеля дикого типа определяли прямым подсчетом. Для оценки степени различий в частоте встречаемости генотипов между исследуемыми группами использовался точный критерий χ^2 Пирсона. При этом рассчитывали коэффициент отношения шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом (DI), а также p-значение. Соответствие распределения генотипов в обследованных группах каноническому распределению Харди—Вайнберга оценивали с помощью критерия χ^2 . Уровень достоверности принимали 0,05.

Результаты

Оценка подвижности сперматозоидов и экспрессии гена *DEFB126* у пациентов с нарушением репродуктивной функции

На первом этапе исследования нами были проанализированы показатели подвижности сперматозоидов и определены уровни экспрессии гена *DEFB126* среди пациентов с нарушением фертильной функции и доноров здоровой группы.

Сперматозоиды пациентов с нарушением репродуктивной функции демонстрировали нарушение подвижности различной степени выраженности, чем объясняется разброс этого показателя

(рис. 1). Достоверных различий выявлено не было без изучения генотипа.

Экспрессия гена противомикробного пептида *DEFB126* у пациентов основной группы была снижена в 7,48 раза в сравнении с группой контроля ($p = 0,0001$).

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 гена *DEFB126*

Далее нами был исследован аллельный полиморфизм rs11468374 гена *DEFB126* (табл. 1).

Полученное распределение генотипов по полиморфизму rs11468374 среди обследованных мужчин соответствовало ожидаемому распределению Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 1,98$, $p = 0,159$ в исследуемой группе и $\chi^2 = 1,82$, $p = 0,176$ в контрольной группе). Согласно полученным данным, у обследованных пациентов с нарушением фертильной функции ($n = 56$) в сравнении с группой контроля ($n = 19$) частота встречаемости мутантного аллеля *del* в популяции возрастает в 1,9 раза – с 23% до 45% (табл. 1).

Среди мужчин с бесплодием носителями нормального генотипа *wt/wt* явились 25% обследованных, в то время как среди доноров контрольной группы этот показатель в 2 раза больше и составляет 52,6%. Генотип *wt/del* встречается у 58,9% мужчин основной группы и у 47,4% контрольной группы. Примечательно, что неблагоприятный мутантный генотип *del/del* был обнаружен только среди бесплодных мужчин (16,1%), мужчин-носителей мутации в гомозиготном положении среди контрольной группы обнаружено не было (табл. 1).

Достоверное увеличение частоты носительства мутантного аллеля *del* в основной группе пациентов с бесплодием ($\chi^2 = 6,073$, $p = 0,013$, OR = 3,15; 95% CI 1,04–9,52) свидетельствует об ассоциации данного аллеля с повышенным риском нарушения репродуктивной функции мужчин.

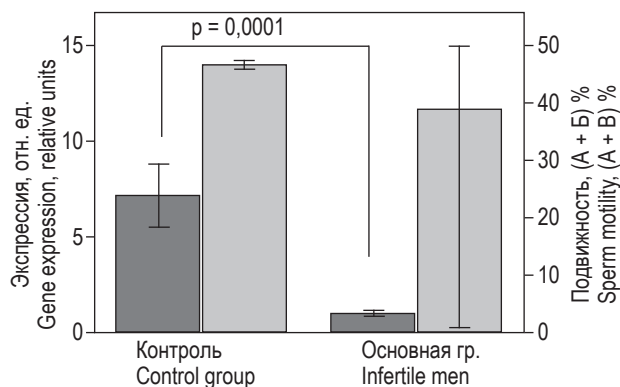


Рисунок 1. Уровни экспрессии гена *DEFB126* и уровни подвижности сперматозоидов обследуемых мужчин

Примечание. Серым цветом выделены колонки, демонстрирующие уровень экспрессии, голубым – уровень подвижности.

Figure 1. Expression levels of the *DEFB126* gene and levels of sperm motility in the examined men

Note. Columns showing the level of expression are highlighted in grey, and the level of mobility is highlighted in blue.

Исследование уровней экспрессии гена *DEFB126* в зависимости от генотипа пациентов по полиморфному маркеру rs11468374

При наличии генетической мутации *DEFB126 del* в ходе транскрипции гена образуются aberrantные мРНК, лишённые стоп-кодона, которые быстро разрушаются вследствие непрерывной работы клеточных механизмов контроля качества образующихся мРНК – nonstop-деградации (nonstop mediated decay). В связи с этим на следующем этапе исследования мы распределили больных на группы в зависимости от определенного генотипа по полиморфному маркеру rs11468374 гена *DEFB126* и провели оценку уровней экспрессии этого гена в полученных группах.

В начале мы провели сравнение уровня экспрессии целевого гена в сперматозоидах группы больных с генотипом *DEFB126 del/del* с экспрессией здоровых доноров с генотипами *DEFB126 wt/wt* и *DEFB126 wt/del* (рис. 2).

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА RS11468374 ГЕНА *DEFB126* В ОБСЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ МУЖЧИН

TABLE 1. FREQUENCIES OF DISTRIBUTION OF ALLELES AND GENOTYPES OF THE POLYMORPHIC MARKER RS11468374 OF THE *DEFB126* GENE IN THE EXAMINED GROUPS OF MEN

Обследуемая группа Group	Аллель Allele		Генотип Genotype					
	wt	del	wt/wt		wt/del		del/del	
	%	%	n	%	n	%	n	%
Мужчины с бесплодием Infertile men	54	45	14	25	33	58,9	9	16,1
Контрольная группа Control group	76	23	10	52,6	9	47,4	0	0

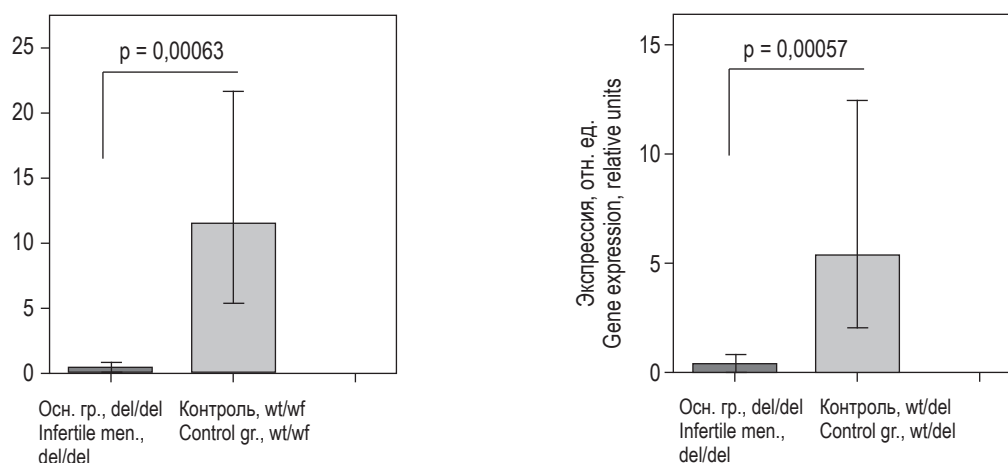


Рисунок 2. Левый график: уровень экспрессии гена *DEFB126* пациентов основной группы с бесплодием (генотип *DEFB126 del/del*) и контрольной группы (генотип *DEFB126 wt/wt*). Правый график: уровень экспрессии гена *DEFB126* у пациентов основной группы с бесплодием (генотип *DEFB126 del/del*) и контрольной группы (генотип *DEFB126 wt/del*)

Примечание. Уровень значимости принимался $< 0,05$.

Figure 2. Left graph: the level of *DEFB126* gene expression in patients of the main group with infertility (*DEFB126 del/del* genotype) and control group (*DEFB126 wt/wt* genotype). Right graph: the level of *DEFB126* gene expression in patients of the main group with infertility (genotype *DEFB126 del/del*) and control group (genotype *DEFB126 wt/del*)

Note. The significance level was taken < 0.05 .

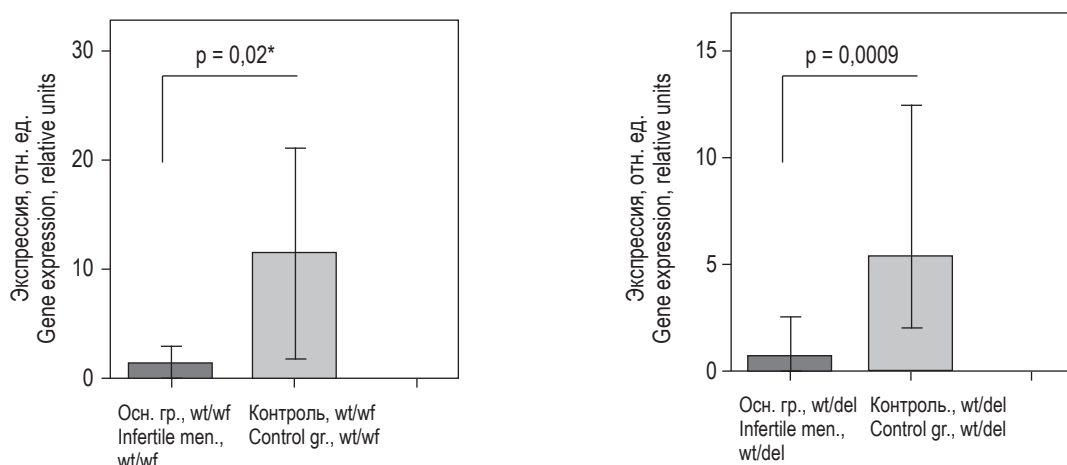


Рисунок 3. Левый график: уровень экспрессии гена *DEFB126* у пациентов основной группы с бесплодием (генотип *DEFB126 wt/wt*) и контрольной группы (генотип *DEFB126 wt/wt*). Правый график: уровень экспрессии гена *DEFB126* у пациентов основной группы с бесплодием (генотип *DEFB126 wt/del*) и контрольной группы (генотип *DEFB126 wt/del*)

Примечание. * – уровень значимости принимался $< 0,05$.

Figure 3. Left graph: the level of *DEFB126* gene expression in patients of the main group with infertility (*DEFB126 wt/wt* genotype) and the control group (*DEFB126 wt/wt* genotype). Right graph: the level of *DEFB126* gene expression in patients of the main group with infertility (*DEFB126 wt/del* genotype) and control group (*DEFB126 wt/del* genotype)

Note. *, the significance level was taken < 0.05 .

Наиболее выраженной оказалась разница в уровнях экспрессии гена β -дефензина *DEFB126* у пациентов основной группы, являющихся носителями мутации в гомозиготном положении (генотип *DEFB126 del/del*), при сравнении с пациентами группы контроля с генотипом *DEFB126 wt/wt*: разница составила 12,32 раза, $p = 0,00063$ (рис. 2, левый график). В сравнении с донора-

ми здоровой группы с генотипом *DEFB126 wt/del* экспрессия была достоверно снижена в 10,64 раза, $p = 0,00057$ (рис. 2, правый график).

Далее мы сравнили экспрессию гена β -дефензина *DEFB126* среди пациентов основной группы с генотипом дикого типа *DEFB126 wt/wt* и донорами контрольной группы с аналогичным генотипом, и пациентами-носителями мутации в

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА *DEFB126*, Me±SD

TABLE 2. SPERM MOTILITY DEPENDING ON GENOTYPE *DEFB126*, Me±SD

Генотип Genotype	Группа Group	Основная группа (А+Б), % Infertile men (A+B), %	Контрольная группа (А+Б), % Control group (A+B), %
wt/wt		41,5±4,4	47,00±3,06*
wt/del		39,0±7,6	46,00±3,04
del/del		9,0±5,5*	—

гетерозиготном положении с группой контроля (генотип *DEFB126 wt/del*).

При изучении уровня экспрессии гена β -дефензина в сперматозоидах пациентов с нарушением репродуктивной функции и генотипом *DEFB126 wt/wt* было также обнаружено снижение этого показателя в 5,25 раза в сравнении с пациентами контрольной группы с генотипом *DEFB126 wt/wt* ($p = 0,02$) (рис. 3, левый график). Далее мы определили уровни экспрессии в группе пациентов-носителей мутантного аллеля *del* в гетерозиготном положении (генотип *DEFB126 wt/del*) и также обнаружили снижение уровня мРНК в 4,28 раза в сравнении с пациентами контрольной группы с аналогичным генотипом *DEFB126 wt/del* ($p = 0,0009$) (рис. 1, правый график).

Исследование уровней подвижности сперматозоидов в зависимости от генотипа пациентов по полиморфному маркеру rs11468374

На следующем этапе работы мы исследовали, как меняется степень выраженности астенозооспермии сперматозоидов у пациентов основной группы в зависимости от их генотипа по полиморфному маркеру rs11468374.

Было показано, что у пациентов с генотипом *DEFB126 del/del* наблюдается наиболее выраженная астенозооспермия: подвижность сперматозоидов снижена в 5,2 раза в сравнении с показателем подвижности доноров контрольной группы ($p = 0,000009$). Подвижность сперматозоидов пациентов с нарушением фертильной функции и нормальным генотипом *DEFB126 wt/wt* снижена незначительно (табл. 2). Таким образом, носительство неблагоприятного гомозиготного генотипа *DEFB126 del/del* достоверно ассоциировано со развитием астенозооспермии ($\chi^2 = 9,902$; $p = 0,008$).

Обсуждение

В последние годы бесплодие приобретает статус глобальной проблемы, с которой сталкивается до 15% пар при планировании семьи, и на сегодняшний день число пар, столкнувшихся с данным диагнозом, составляет 49 млн, что явля-

ется острой как медицинской, так и социальной проблемой [2]. Особенная актуальность проблемы заключается в том, что около 30–40% обследуемых мужчин сталкиваются с диагнозом идиопатического бесплодия, т. е. причинный фактор нарушения фертильной функции выявить не удается [1, 5, 10, 17]. Рутинное исследование эякулята в рамках спермограммы позволяет изучить морфо-функциональное состояние сперматозоидов, но не учитывает биохимические особенности этих клеток, и потому требуется расширение методов диагностики мужской репродуктивной дисфункции.

В ходе созревания в семенниках сперматозоиды претерпевают ряд морфологических, физиологических и биохимических пост-трансляционных модификаций, существенно сказывающихся на их функциональной активности [28]. Эти изменения влияют на подвижность клеток, их способность к миграции, капацитации и оплодотворению яйцеклетки в женских половых путях [14]. Появление на поверхности сперматозоидов белка *DEFB126* является пост-трансляционной модификацией, в ходе которой он синтезируется *de novo* в аппарате Гольджи, после чего мигрирует в составе секреторных везикул к клеточной поверхности и встраивается в мембрану [32]. Данные иммунофлюоресцентного анализа и электронной микроскопии показывают, что данный дефензин равномерно распределен по всей клеточной поверхности сперматозоида [34, 35].

Впервые роль молекулы *DEFB126* в репродуктивных процессах была предположена в ходе исследований, проведенных на сперматозоидах приматов: удаление с клеточной поверхности молекул белка дефензина вело к нарушению способности половых клеток самцов проходить через слой цервикального мукуса. Группа ученых во главе с Theodore L. Tollner продемонстрировала значительное сокращение числа сперматозоидов, способных продвигаться сквозь слой цервикальной слизи при оплодотворении, после удаления концевых остатков сиаловых кислот с поверхности гликокаликса, являющихся

компонентами карбоксильного конца молекулы DEFB126. При этом добавление растворимого белка DEFB126 к суспензии таких сперматозоидов вело к восстановлению структуры гликокаликса и способности клеток к миграции [36]. В ходе дальнейших исследований был обнаружен двунуклеотидный аллельный полиморфизм гена *DEFB126* (rs11468374), и авторами было выдвинуто предположение о том, что носительство мутантного генотипа *DEFB126 del/del* ассоциировано со значительным изменением структуры гликокаликса и снижением количества сиаловых кислот в структуре молекул DEFB126, что объясняет снижение способности к миграции сперматозоидов в женском репродуктивном тракте [29]. Полученные нами данные согласуются с гипотезами и результатами исследований прошлых лет: сперматозоиды пациентов с бесплодием с генотипом *DEFB126 del/del* демонстрируют снижение подвижности в 5,2 раза в сравнении с показателями доноров группы сравнения, что позволяет сделать вывод о том, что носительство неблагоприятного мутантного аллеля *del* ассоциировано с развитием астенозооспермии.

В своей работе мы изучили распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs11468374 гена *DEFB126* среди мужчин московской популяции, 89% обследуемых — представители славянской народности, 11% составили представители кавказской, прибалтийской и татарской народностей. Согласно полученному нами результату, распространение мутантного аллеля в изученной популяции подчиняется равновесию Харди–Вайнберга и частота его распределения составляет 0,45 (табл. 1) среди мужчин с нарушением фертильной функции. Подобное исследование было проведено в иранской, китайской, японской, нигерийской и британской популяциях, где также было установлено соответствие закону о генетическом равновесии, частота распределения мутантного аллеля составила 0,44–0,61 [14, 30].

Анализ распределения частот мутантного аллеля *del* показал, что у мужчин с бесплодием данный аллель встречается в 1,9 раза чаще, чем среди доноров группы сравнения. При исследовании частот распределения генотипов полиморфного маркера rs11468374 нами было показано, что 16,1% мужчин с бесплодием являются носителями неблагоприятного аллеля *del* в гомозиготном состоянии, в то время как среди доноров группы контроля мужчин с генотипом *DEFB126 del/del* обнаружено не было (табл. 1). Таким образом, мы продемонстрировали достоверную ассоциацию между носительством аллеля *del* и повышенным риском нарушения фертильной функции ($\chi^2 = 6,073$, $p = 0,013$, $OR = 3,15$; 95% CI 1,04–9,52). В исследовании, проведенном Vroeghien P.B. и соавт., было выявлено, что мутантный генотип *DEFB126 del/del* статистически чаще встречается

в группе пациентов с идиопатическим бесплодием в сравнении с контролем [14].

В дополнение нами впервые была изучена ассоциация между экспрессией гена *DEFB126* и носительством мутантного аллеля. Известно, что данный полиморфизм представляет собой делецию двух нуклеотидов во втором экзоне, и результатом этой мутации является сдвиг рамки считывания и образование мРНК, лишенной стоп-кодона [22]. При исследовании других генов, несущих мутации, при которых отсутствует стоп-кодон внутри рамки считывания, было показано, что экспрессия дефектных мРНК достоверно понижена в сравнении с уровнем соответствующей нормальной мРНК [12, 15]. Мы показали, что экспрессия гена *DEFB126* в группе мужчин с генотипом *DEFB126 del/del* достоверно снижена в 12,32 раза в сравнении с донорами контрольной группы с генотипом *DEFB126 wt/wt* (рис. 2). Однако также мы выявили, что у пациентов с нарушением репродуктивной функции с генотипом *DEFB126 wt/wt* экспрессия изучаемого гена достоверно снижена в 5,25 раза в сравнении с донорами с генотипом *DEFB126 wt/wt* (рис. 3). Можно предположить, что причинами снижения экспрессии в данной случае являются механизмы посттранскрипционной регуляции экспрессии генов и влияние микроРНК, что требует дальнейшего изучения.

Заключение

Анализируя данные проведенных исследований по изучению механизмов нарушения репродуктивной функции, известные на сегодняшний день, можно утверждать, что генетический механизм является сложным и не до конца изученным. Показанная нами ассоциация носительства мутантного аллеля *del* и снижения уровня подвижности сперматозоидов пациентов свидетельствует о роли данного полиморфизма в патогенезе мужского бесплодия. Снижение уровня экспрессии гена *DEFB126* в группе пациентов с бесплодием также подтверждает вклад дефензина в патогенез заболевания. Предложенное нами комплексное исследование на структурном и экспрессионном уровне гена *DEFB126* и его ассоциации с подвижностью сперматозоидов в эякуляте представляет собой новый подход к выявлению конкретной причины нарушения мужской репродуктивной функции и может быть использовано для усовершенствования диагностики мужского бесплодия. Дальнейшее изучение молекулярно-генетических механизмов снижения мужской фертильной функции и выявление предиктивных маркеров позволит проводить более качественную стратификацию пациентов на группы риска и предложить им персонализированный подход в терапии и назначении вспомогательных репродуктивных технологий.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Центру высочайшего редактирования и генетических технологий

для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России за возможность использования молекулярно-генетических технологий.

Список литературы / References

1. Винник Ю.Ю., Борисов В.В. Диагностика мужского бесплодия: современное состояние проблемы // Клиническая лекция. Consilium Medicum, 2017. Т. 19, № 7. С. 65-69. [Vinnik Yu.Yu., Borisov V.V. Diagnostics of men's infertility: current state of the problem. *Klinicheskaya leksiya. Consilium Medicum = Clinical Lecture. Consilium Medicum*, 2017, Vol. 19, no. 7, pp. 65-69. (In Russ.)]
2. Гамидов С.И., Иремашвили В.В., Тхагапсоева Р.А. Мужское бесплодие: современное состояние проблемы // Фарматека, 2009. № 9. С. 12-17. [Gamidov S.I., Iremashvili V.V., Tkhapsoeva R.A. Male infertility: current state of the problem. *Farmateka = Pharmateca*, 2009, no. 9, pp. 12-17. (In Russ.)]
3. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 640 с. [Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Ya. *Clinical immunology and allergology with the basics of general immunology*]. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 640 p.
4. Коновалова М.В., Зубарева А.А., Луценко Г.В., Свирщевская Е.В. Антимикробные пептиды в норме и при патологиях (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология, 2018. № 3. С. 236-243. [Konovalova M.V., Lutsenko G.V., Svirshchevskaya E.V., Zubareva A.A. Antimicrobial peptides in health and disease (review). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2018, Vol. 54, no. 3, pp. 238-244. (In Russ.)]
5. Лебедев Г.С., Голубев Н.А., Шадеркин И.А., Шадеркина В.А., Аполихин О.И., Сивков А.В., Комарова В.А. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000-2018 годы // Экспериментальная и клиническая урология, 2019. № 4. С. 4-12. [Lebedev G.S., Golubev N.A., Shaderkin I.A., Shaderkina V.A., Apolikhin O.I., Sivkov A.V., Komarova V.A. Male infertility in the Russian Federation: statistical data for 2000-2018. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology*, 2019, no. 4, pp. 4-12. (In Russ.)]
6. Меркушова Е.Д., Хасанова Е.М., Ганковская Л.В. Гиперэкспрессия генов инфламмосомного комплекса NLRP1 и цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-18 в биоптатах пораженной и непораженной кожи больных с псориазом // Иммунология, 2021. Т. 42, № 1. С. 58-65. [Merkushova E.D., Khasanova E.M., Gankovskaya L.V. Hyperexpression of NLRP1 inflammasome complex and cytokines IL-1 β , IL-18 genes in biopates of lesion and healthy skin of patients with psoriasis. *Immunologiya = Immunology*, 2021, Vol. 42, no. 1, pp. 58-65. (In Russ.)]
7. Мусин Х.Г. Антимикробные пептиды – потенциальная замена традиционным антибиотикам // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 3. С. 295-308. [Musin Kh.G. Antimicrobial peptides — a potential replacement for traditional antibiotics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 3, pp. 295-308. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-295-308.
8. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР «в реальном времени». М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 215 с. [Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. *Polymerase chain reaction "in real time"*]. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2009. 215 p.
9. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 5-е изд. М.: Капитал-Принт, 2012. 292 с. [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. World Health Organization]. Moscow: Capital-Print, 2012. 292 p.
10. Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2015, Vol. 13, no. 1, 37. doi:10.1186/s12958-015-0032-1.
11. Akgul Y., Word R.A., Ensign L.M., Yamaguchi Y., Lydon J., Hanes J., Mahendroo M. Hyaluronan in cervical epithelia protects against infection-mediated preterm birth. *J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 124, no. 12, pp. 5481-5489.
12. Ameri A., Machiah D.K., Tran T.T., Channell C., Crenshaw V., Fernstrom K., Khachidze M., Duncan A., Fuchs S., Howard T.E. Nonstop mutation in the factor (F)X gene of a severely haemorrhagic patient with complete absence of coagulation FX. *Thromb. Haemost.*, 2007, Vol. 98, no. 6, pp. 1165-1169.
13. Beisswenger C., Bals R. Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2005, Vol. 6, no. 3, pp. 255-264.
14. Boroujeni P.B., Ebrahimian S., Abedini M., Chayjan M.R., Hassani M., Gourabi H., Meybodi A.M. The role of DEFB126 variation in male infertility and assisted reproductive technique outcome. *Reprod. Biomed. Online*, 2019, Vol. 39, no. 4, pp. 649-657.
15. Chatr-Aryamontri A., Angelini M., Garelli E., Tchernia G., Ramenghi U., Dianzani I., Loreni F. Nonsense-mediated and nonstop decay of ribosomal protein S19 mRNA in Diamond-Blackfan anemia. *Hum. Mutat.*, 2004, Vol. 24, no. 6, pp. 526-533.
16. Diao H., Yu H.G., Sun F., Zhang Y.L., Tanphaichitr N. Rat recombinant β -defensin 22 is a heparin-binding protein with antimicrobial activity. *Asian J. Androl.*, 2011, Vol. 13, no. 2, pp. 305-311.
17. Dohle G.R., Colpi G.M., Hargreave T.B., Papp G.K., Jungwirth A., Weidner W. EAU guidelines on male infertility. *Eur. Urol.*, 2015, Vol. 48, no. 5, pp. 703-711.
18. Dorin J.R., McHugh B., Cox S., Davidson D. Mammalian Antimicrobial Peptides; defensins and cathelicidins. *Molecular Medical Microbiology – 2nd Edition*. Elsevier. (ed). 2014, pp. 539-566.

19. Drake P.M., Nathan J.K., Stock C.M., Chang P.V., Muench M.O., Nakata D., Reader J.R., Gip P., Golden K.P., Weinhold B., Gerardy-Schahn R., Troy F.A., Bertozzi C.R. Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune responses. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 10, pp. 6850-6858.
20. Gregory M.S. Innate immune system and the eye. In: *Encyclopedia of the Eye*. Academic Press, London, 2010, pp. 439-445.
21. Huang L., Leong S.S., Jiang R. Soluble fusion expression and characterization of bioactive human beta-defensin 26 and 27. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, Vol. 84, no. 2, pp. 301-308.
22. Isken O., Maquat L.E. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.*, 2007, Vol. 21, no. 15, pp. 1833-3856.
23. Izadpanah A., Gallo R.L. Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2005, Vol. 52, no. 3, pp. 381-390.
24. Liu H., Yu H., Gu Y., Xin A., Zhang Y., Diao H., Lin D. Human beta-defensin DEFB126 is capable of inhibiting LPS-mediated inflammation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, Vol. 97, no. 8, pp. 3395-3408.
25. Matzuk M.M., Lamb D. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat. Med.*, 2008, Vol. 14, no. 11, pp. 1197-1213.
26. Pazgier M., Hoover D.M., Yang D., Lud W., Lubkowski J. Human β -defensins. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006, Vol. 63, no. 11, pp. 1294-1313.
27. Rodriguez-Jimenez F.J., Krause A., Schulz S., Forssmann W.G., Conejo-Garcia J.R., Schreeb R. Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics*, 2003, Vol. 81, no. 2, pp. 175-183.
28. Tecle E., Gagneux P. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Mol. Reprod. Dev.*, 2015, Vol. 82, no. 9, pp. 635-650.
29. Tollner T.L., Bevins C.L., Cherr G.N. Multifunctional glycoprotein DEFB126--a curious story of defensin-clad spermatozoa. *Nat. Rev. Urol.*, 2012, Vol. 9, no. 7, pp. 365-375.
30. Tollner T.L., Venners S.A., Hollox E.J., Yudin A.I., Liu X., Tang G., Xing H., Kays R.J., Lau T., Overstreet J.W., Xu X., Bevins C.L., Cherr G.N. A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. *Sci. Transl. Med.*, 2011, Vol. 3, no. 92, 92ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.3002289.
31. Tollner T.L., Yudin A.I., Treece C.A., Overstreet J.W., Cherr G.N. Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. *Hum. Reprod.*, 2008, Vol. 23, no. 11, pp. 2523-2534.
32. Tulsiani D.R. Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2006, Vol. 250, no. 1-2, pp. 58-65.
33. Yamaguchi Y., Nagase T., Makita R., Fukuhara S., Tomita T., Tominaga T. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 5, pp. 2516-2523.
34. Yudin A.I., Tollner T.L., Treece C.A. Beta-defensin 22 is a major component of the mouse sperm glycocalyx. *Reproduction*, 2008, Vol. 136, no. 6, pp. 753-765.
35. Yudin A.I., Tollner T.L., Li M.W., Treece C.A., Overstreet J.W., Cherr G.N. ESP13.2, a member of the beta-defensin family, is a macaque sperm surface-coating protein involved in the capacitation process. *Biol. Reprod.*, 2003, Vol. 69, no. 4, pp. 1118-1128.
36. Yudin A.I., Generao S.E., Tollner T.L., Treece C.A., Overstreet J.W., Cherr G.N. Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. *Biol. Reprod.*, 2005, Vol. 73, no. 6, pp. 1243-1252.
37. Yudin A.I., Treece C.A., Tollner T.L., Overstreet J.W., Cherr G.N. The carbohydrate structure of DEFB126, the major component of the cynomolgus Macaque sperm plasma membrane glycocalyx. *J. Membr. Biol.*, 2005, Vol. 207, no. 3, pp. 119-129.

Авторы:

Хасанова Е.М. — ассистент кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

Бурмакина В.В. — студентка 5 курса МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Khasanova E.M., Assistant Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

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

Burmakina V.V., Student, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 18.04.2021

Принята к печати 26.04.2021

Received 18.04.2021

Accepted 26.04.2021

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ПРОФИЛАКТИКИ РТПХ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Михальцова Е.Д., Попова Н.Н., Дроков М.Ю., Капранов Н.М.,
Давыдова Ю.О., Васильева В.А., Дубняк Д.С., Масликова У.В.,
Гальцева И.В., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., **Савченко В.Г.**

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

Резюме. Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) — одно из наиболее частых осложнений при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Основными препаратами профилактики остаются ингибиторы кальциневрина (циклоsporин А, такролимус), метотрексат, микофенолата мофетил. С распространением режимов пониженной интенсивности кондиционирования широко стал применяться антитимоцитарный глобулин. Однако было отмечено «негативное» влияние на реконституцию Т-клеточного звена иммунитета, что увеличивает риск тяжелых инфекционных осложнений и рецидива заболевания. С увеличением количества трансплантаций от альтернативных (частично-совместимых и гаплоидентичных) доноров, в качестве профилактики начал широко использоваться циклофосфамид (ЦФ).

Цель — изучить восстановление клеточного звена иммунной системы у пациентов после алло-ТГСК при использовании различных схем профилактики РТПХ в том числе и режимах, в которых используется посттрансплантационный ЦФ.

В исследование было включено 44 пациента, разделенные на 2 группы: стандартная иммуносупрессивная терапия, антитимоцитарный глобулин, циклоsporин А, метотрексат, микофенолата мофетил. Вторая группа больных включала пациентов, которым в качестве иммуносупрессивной терапии применялся ЦФ в комбинации с другими препаратами (циклоsporин А, микофенолата мофетил, метотрексат). Методом многоцветной проточной цитометрии в контрольные сроки (+14, +30, +60, +90 дней) исследовался субпопуляционный состав лейкоцитов.

Абсолютное число CD4⁺ клеток у реципиентов КМ, получивших посттрансплантационный ЦФ, в сравнении с классической иммуносупрессивной терапией, было достоверно ниже на +14 и +30 дней.

Адрес для переписки:

Дроков Михаил Юрьевич
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ
125167, Россия, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4.
Тел.: 8 (495) 614-90-42.
E-mail: mdrokov@gmail.com

Address for correspondence:

Drokov Mikhail Yu.
National Research Center for Hematology
125167, Russian Federation, Moscow, Novy Zыkovsky lane, 4.
Phone: 7 (495) 614-90-42.
E-mail: mdrokov@gmail.com

Образец цитирования:

Е.Д. Михальцова, Н.Н. Попова, М.Ю. Дроков,
Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, В.А. Васильева,
Д.С. Дубняк, У.В. Масликова, И.В. Гальцева,
Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова, **В.Г. Савченко**
«Влияние режимов профилактики РТПХ на
восстановление клеточного звена иммунной системы
у пациентов после трансплантации аллогенных
гемопоэтических стволовых клеток» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1125–1136.
doi: 10.15789/1563-0625-IOG-2167

© Михальцова Е.Д. и соавт., 2021

For citation:

E.D. Mikhaltsova, N.N. Popova, M.Yu. Drokov,
N.M. Kapranov, Yu.O. Davydova, V.A. Vasilieva,
D.S. Dubnyak, U.V. Maslikova, I.V. Galtseva,
L.A. Kuzmina, E.N. Parovichnikova, **V.G. Savchenko**
“Impact of graft-versus-host disease prophylaxis on immune
reconstitution in patients after allogeneic hematopoietic
stem cell transplantation”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5,
pp. 1125–1136. doi: 10.15789/1563-0625-IOG-2167

DOI: 10.15789/1563-0625-IOG-2167

Однако на более поздних сроках (на +60, +90 дней) эти различия исчезали. Кроме того, у реципиентов КМ, у которых применялся ЦФ, абсолютное число CD8⁺ клеток было достоверно выше на +60 дней в сравнении с группой больных на стандартной профилактике. У реципиентов СКК реконструкция исследуемых субпопуляций лимфоцитов достоверно не отличалась, в зависимости от режима профилактики реакции «трансплантат против хозяина».

Применение ЦФ в комбинации с КМ, как источником стволовых клеток, приводит к значимому снижению числа клеток отдельных субпопуляций (CD4⁺; CD8⁺; NK-клетки) в ранние сроки после алло-ТГСК. Применение ЦФ в комбинации с СКК в качестве источника трансплантата иммунологически является более целесообразным

Ключевые слова: трансплантация костного мозга, реакция «трансплантат против хозяина», посттрансплантационный циклофосфамид, проточная цитометрия, гаплоидентичная трансплантация, иммунофенотипирование

IMPACT OF GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE PROPHYLAXIS ON IMMUNE RECONSTITUTION IN PATIENTS AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Mikhaltsova E.D., Popova N.N., Drovkov M.Yu., Kapranov N.M., Davydova Yu.O., Vasilieva V.A., Dubnyak D.S., Maslikova U.V., Galtseva I.V., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.

National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The graft-versus-host disease (GVHD) is among the most common complications after hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). The main tools for GVHD prevention remain calcineurin inhibitors (cyclosporin A, tacrolimus), methotrexate, mycophenolate mofetil. Upon implementation of reduced-intensity conditioning regimens, antithymocyte globulin was widely introduced. However, negative effects upon reconstitution of T-cell immunity have been noted, thus increasing risk of severe infectious complications and disease relapse. With extended practice of HSCT from alternative (partially matched or haploidentical) donors, cyclophosphamide was increasingly used. Our aim was to study reconstitution of immune cell subpopulations in the patients undergoing bone marrow transplantation (BMT), when using different GVHD prophylaxis regimens, including the schedules with post-transplant CP usage. The study concerned 44 cases classified into 2 groups. The first one included patients with standard immunosuppressive therapy, antithymocyte therapy, cyclosporine A, methotrexate, mycophenolate mofetil. The second group included the patients who received CP as immunosuppressive drug combined with other treatments (cyclosporine A, methotrexate, mycophenolate mofetil). At specified control terms, (D+14, +30, +60, +90) the blood leukocyte subpopulations were assayed by means of multicolor flow cytometry. Absolute counts of CD4⁺ cells in HSCT recipients treated with CP post-BMT proved to be sufficiently lower at D+14 and +30, than in those treated with classical immunosuppressive therapy. However, at later terms, (D+60, +90), these differences were not observed. Moreover, in CP-treated bone marrow recipients, absolute numbers of CD8⁺ cells was significantly higher, compared to the patients who received conventional GVHD prophylaxis. Reconstitution of the studied lymphocyte populations in hematopoietic cell recipients did not depend on the GVHD prophylaxis regimen. Usage of CP combined with bone marrow as a source of stem cells, brings about sufficient decrease of some cell populations (CD4⁺; CD8⁺; NK cells) at early terms post-transplant. Administration of CP combined with hematopoietic stem cells as the source of hematopoietic graft seems to be more reasonable.

Keywords: bone marrow transplantation, graft versus host disease, post-transplant cyclophosphamide, flow cytometry, haploidentical transplantation, immunophenotyping

Введение

Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) представляет собой одно из наиболее частых осложнений при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) [12]. Так, острая РТПХ возникает в ранний посттрансплантационный период в 40% случаев, а частота хронической РТПХ варьирует от 30-90% [35].

Патогенез острой и хронической РТПХ различный. Так, если для развития острой РТПХ первостепенным фактором является массивное повреждение тканей проводимым предтрансплантационным кондиционированием, которое приводит к активации антиген-презентирующих клеток и дальнейшей пролиферации донорских Т-лимфоцитов, то развитие хронической РТПХ обусловлено нарушением механизмов иммунологической толерантности с участием как Т-, так и В-клеточного компартмента [35]. Тем не менее, несмотря на различия в патогенезе, основой профилактики РТПХ является лимфодеплегия, с целью которой используются различные варианты комбинаций иммуносупрессивных препаратов.

Исторически первые схемы профилактики РТПХ были основаны на использовании одного препарата, так называемая монотерапия метотрексатом или циклоспорином. Однако в дальнейшем было показано, что сочетанное использование циклоспорина и метотрексата характеризуется значимо меньшей частотой развития острой РТПХ по сравнению с монотерапией [30].

Основное действие циклоспорина заключается в кальций-зависимой трансдукции сигнала после активации Т-клеточного рецептора, что приводит к подавлению активации гена IL-2 и снижению секреции IL-2 [26]. Его эффективность по сравнению с другим препаратом из этой группы – такролимусом – сопоставима [7].

Более широкое применение, по сравнению с метотрексатом, получил микофенолата мофетил (ММФ) – препарат, ингибирующий пролиферацию В- и Т-клеток и продукцию антител. Его основное действие заключается в ингибировании синтеза пуринов *de novo*, необходимого для пролиферации лимфоцитов. Эффективность схем профилактики с микофенолатом мофетилем обусловлена его синергизмом с циклоспорином и сравнительно меньшей токсичностью по сравнению с метотрексатом [34].

С введением в широкую практику режимов пониженной интенсивности, а также увеличением количества трансплантаций от неродственных полностью и частично совместимых доноров, с целью лимфоабляции стали широко использовать анти timoцитарный глобулин (АТГ). По данным множества рандомизированных исследо-

ваний, АТГ достоверно снижает риски развития РТПХ, однако различия в дозировке и составе этих препаратов затрудняет обобщение и анализ результатов [33]. Например, кроличий АТГ ассоциируется с более эффективной лимфоцитарной деплецией, но при этом увеличивает число и функциональную активность Т-регуляторных клеток по сравнению с лошадиным [3, 16]. Однако, несмотря на преимущество использования кроличьего АТГ при алло-ТГСК, лошадиный АТГ остается широко применяемым при алло-ТГСК у больных апластической анемией, хотя также допускается к использованию и при других нозологиях [21].

В последние годы, благодаря увеличивающемуся числу алло-ТГСК от частично совместимых и гаплоидентичных доноров, в качестве профилактики РТПХ широко применяют посттрансплантационный циклофосфамид (ЦФ) в дозе 50 мг/кг на +3, +4 дня после трансплантации [4]. Использование посттрансплантационного ЦФ в сочетании с циклоспорином и ММФ продемонстрировало высокую клиническую эффективность даже при выполнении гаплоидентичных алло-ТГСК и трансплантаций от частично совместимых доноров [4].

На сегодняшний день выбор иммуносупрессивной терапии основан преимущественно на клинических результатах, а протоколы профилактики существенно различаются в зависимости от центров, где выполняют трансплантации. Нужно отметить, что проводимая иммуносупрессивная терапия, индуцируя лимфодеплекцию в самые ранние сроки, оказывает и значимое влияние на последующую реконституцию иммунной системы после алло-ТГСК. В связи с этим целесообразным является не только выбор профилактики РТПХ, который основан на клинической эффективности и результатах алло-ТГСК, но также и иммунологически обоснованная профилактика РТПХ.

Целью данного исследования была оценка восстановления клеточного звена иммунной системы у пациентов с различными режимами профилактики РТПХ.

Материалы и методы

Характеристика пациентов

Из 62 больных, которым была выполнена алло-ТГСК в отделении интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ за период с декабря 2015 года по февраль 2017 года, в исследование было включено 44.

Все пациенты были разделены на две группы в зависимости от вида профилактики РТПХ. В первую группу (группа с пост-ЦФ) входили па-

циенты, получившие ЦФ в дозе 50 мг/кг/сут на +3, +4 дня после трансплантации в сочетании с другими иммуносупрессивными перпаратами (ЦСА, ММФ, МТХ). Во второй группе (группа без пост-ЦФ) были больные с так называемой стандартной иммуносупрессией, которая включала лошадиный АТГ в дозе 40 мг/кг в сочетании с другими иммуносупрессивными перпаратами (ЦСА, ММФ, МТХ).

Подробная характеристика больных, включенных в исследование, представлена в таблице 1.

Для исследования реконституции субпопуляций иммунокомпетентных клеток использовали

образцы периферической крови пациентов на сроках +14, +30, +60 и +90 дней после трансплантации. Исследование проводили методом многоцветной проточной цитометрии с использованием проточного цитометра BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Абсолютное число лейкоцитов (клеток в мкл) подсчитывали с помощью гематологического анализатора Abacus Junior 30 (Diatron, Венгрия). Количественную оценку субпопуляционного состава крови проводили двухплатформенным методом.

При иммунофенотипическом исследовании был использован метод «лизиса с отмывкой»,

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS INCLUDED IN THE STUDY

	Группа с пост-ЦФ Group with PT-CY (n = 20)	Группа без пост-ЦФ Group without PT-CY (n = 24)	P-значение P-value
Возраст, лет Age, years	34 (19-55)	37 (23-57)	> 0,05
Пол, n (%) Sex, n (%)			
Мужчины Male	13 (65%)	17 (70,8%)	> 0,05
Женщины Female	7 (35%)	7 (29,2%)	
Статус заболевания, n (%) Disease status, n (%)			
ПР1+ CR1+	10 (50%)	21 (87,5%)	0,02
ХФ Chronic phase	1 (5%)	—	
Вне ПР Without CR	9 (45%)	3 (12,5%)	
Диагноз, n (%) Disease, n (%)			
Апластическая анемия Aplastic anemia	—	2 (8,4%)	> 0,05
Бифенотипический ОЛ Biphenotypic AL	1 (5%)	—	
Лимфома Lymphoma	2 (10%)	2 (8,4%)	
МДС MDS	2 (10%)	—	
МПЗ MPD	—	1 (4,1%)	
ОЛЛ ALL	5 (25%)	6 (25%)	
ОМЛ AML	9 (45%)	13 (54,1%)	
ХМЛ CML	1 (5%)	—	

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

	Группа с пост-ЦФ Group with PT-CY (n = 20)	Группа без пост-ЦФ Group without PT-CY (n = 24)	Р-значение P-value
Вид алло-ТКМ, n (%) Allo-HSCT type, n (%)			
Родственная совместимая Match related	3 (15%)	9 (37,5%)	< 0,0001
Неродственная совместимая Match unrelated	2 (10%)	15 (62,5%)	
Неродственная частично совместимая Mismatch unrelated	13 (65%)	–	
Родственная несовместимая (гаплоидентичная) Mismatch related (haploidentical)	2 (10%)	–	
Режим кондиционирования, n (%) Conditioning regimen, n (%)			
Миелоаблативный Myeloablative	15 (75%)	14 (70,8%)	> 0,05
Пониженной интенсивности Reduced-intensity	5 (25%)	7 (29,2%)	
Источник трансплантата, n (%) Transplant source, n (%)			
КМ BM	14 (70%)	17 (70,8%)	> 0,05
СКК PBSC	6 (30%)	7 (29,2%)	

Примечание. ПР1⁺ – первая и последующие полные ремиссии, ХФ – хроническая фаза, ОЛ – острый лейкоз; МДС – миелодиспластический синдром; МПЗ – миелопролиферативное заболевание; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ХМЛ – хронический миелолейкоз; КМ – костный мозг, СКК – стволовые клетки крови.

Note. CR1⁺, complete remission; CP, chronic phase; AL, acute leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; MPD, myeloproliferative disorders; ALL acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; BM, bone marrow; PBSC, peripheral blood stem cells.

согласно инструкции производителя (Becton Dickinson, США). Для определения экспрессии поверхностных антигенов 100 мкл цельной крови вносили в пробирки и добавляли в требуемом объеме количество моноклональных антител. Смесь Multitest™ 6-Color TBNK включает в себя антитела к: CD3 (SK7), меченные флуоресцеин изотиоцианатом; CD16(B73.1) и CD56 (NCAM16.2), меченные фикоэритрином; CD45 (2D1 (HLe-1)), меченные PerCP-Cy™5.5; CD4 (SK3), меченные PE-Cy™7; CD19 (SJ25C1), меченные APC; CD8 (SK1), меченные APC-Cy7. Далее при комнатной температуре в темноте происходила инкубация в течение 15 минут. Спустя 15 минут после инкубации к клеточной взвеси добавляли лизирующий раствор Lysis Buffer (Becton Dickinson, США) в объеме 1 мл. Взвесь перемешивали и помещали на 15 минут в темное место при комнатной температуре. Далее пробы откручивали два раза по 3:30 мин.

При анализе точечных графиков группу клеток, несущих тот или иной антиген, изолировали с помощью инструмента выделения области (gate). Он заключался в последовательном выделении дискретных субпопуляций, несущих то или иное сочетание антигенов, которое было указано выше. Иммунофенотип анализируемых субпопуляций представлен в таблице 2.

Измерение проводили в процентах от CD45⁺ событий (определение отдельных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови выполнялось методом последовательного гейтирования). Далее производился пересчет на абсолютные значения с использованием абсолютно числа лейкоцитов в 1 мкл крови и процента от CD45⁺ событий.

Статистический анализ

Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения IBM SPSS v. 23 (США). С целью проверки нормальности распределения был использован критерий Шапиро-Уилка.

ТАБЛИЦА 2. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ И ИХ ИММУНОФЕНОТИП

TABLE 2. ANALYZED SUBPOPULATIONS OF LYMPHOCYTES AND THEIR IMMUNOPHENOTYPE

Субпопуляция Subpopulations	Иммунофенотип Immunophenotype
Т-клетки T cells	CD45 ⁺ CD3 ⁺
Т-хелперы T helpers	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺
Цитотоксические Т-клетки Cytotoxic T cells	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺
В-клетки B cells	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺
ДН-клетки (дважды негативные) DN cells (double negative cells)	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻
НК-клетки (натуральные киллеры) NK cells (Natural killer cells)	CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺

ро—Уилка. Принимая во внимание распределение, отличное от нормального, для последующей оценки различий между тремя и более независимыми выборками использован критерий Краскела—Уоллиса. Для оценки различий для двух независимых выборок был использован U-критерий Манна—Уитни. При анализе таблиц сопряженности, принимая во внимания малые выборки, использовался точный тест Фишера. В публикации данные были представлены как медианы, с указанием 25-го и 75-го перцентиля — Ме ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для оценки статистической значимости порог p был принят равным 0,05.

Результаты

Медиана восстановления лейкоцитов у реципиентов костного мозга, получивших стандартную иммуносупрессию без ЦФ, составила 21 день (15–47), а при использовании посттрансплантационного ЦФ — 25 дней (15–37). Для реципиентов СКК при стандартной иммуносупрессии и при использовании ЦФ медиана восстановления лейкоцитов не отличалась и составила 20 дней.

Учитывая известное влияние источника трансплантата на восстановление иммунной системы после трансплантации, дальнейший анализ выполняли с учетом этого фактора [23]. Мы сравнили реконституцию отдельных субпопуляций лимфоцитов в зависимости от проводимой профилактики РТПХ отдельно для реципиентов КМ и СКК. Было показано, что при использовании КМ в качестве источника трансплантата восстановление достоверно отличалось в зависимости от варианта профилактики РТПХ (табл. 3).

Абсолютное число CD4⁺ клеток у реципиентов костного мозга, получивших посттрансплантационный ЦФ, в сравнении с пациентами,

которым проводили классическую ИСТ, было достоверно ниже на +14-й и +30-й дни ($p = 0,033$ и $p = 0,012$ соответственно). Однако на более поздних сроках (на +60-й, +90-й дни) эти различия исчезали. Кроме того, у реципиентов КМ, у которых применялся ЦФ, абсолютное число CD8⁺ клеток было достоверно выше на +60-й день в сравнении с группой больных на стандартной профилактике ($p = 0,041$). Количество НК-клеток было значимо ниже у больных, у которых использовали костный мозг в качестве источника трансплантата и ЦФ схеме профилактики РТПХ, лишь на +30-й день, далее эти различия становились не значимыми.

У реципиентов СКК реконституция исследуемых субпопуляций лимфоцитов достоверно не отличалась в зависимости от режима профилактики РТПХ.

Обсуждение

Восстановление клеточного звена иммунной системы является ключевым аспектом аллотГСК, который во многом определяет течение посттрансплантационного периода. Известно, что развитие инфекционных осложнений, РТПХ, рецидивов опухолевого заболевания зачастую связано с несвоевременным восстановлением отдельных субпопуляций иммунокомпетентных клеток [11, 28]. Например, известна роль НК-клеточного звена иммунной системы в обеспечении противоопухолевого контроля [32].

Основной характеристикой НК-клеток является их цитолитическая активность. Для реализации эффекторной функции этим клеткам не нужно присутствие молекул главного комплекса гистосовместимости, в отличие от Т-лимфоцитов, что и позволяет этим клеткам

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ПРОФИЛАКТИКИ РТПХ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), кл/мкл

TABLE 3. IMPACT OF GVHD PROPHYLAXIS REGIMENS ON IMMUNE RECONSTITUTION, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), cells/ μ l

Субпопуляции лимфоцитов, день после алло-ТГСК Subpopulations of lymphocytes, day after allo-HSCT		С ЦФ на +3-й, +4-й день после алло-ТГСК With CY for +3, +4 days after allo-HSCT (n = 14)	Без ЦФ Without CY (n = 17)	Р-значение P-value
День 14 Day 14	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺	5,3 (0,25-18,02)	29,25 (22,25-40,41)	0,03
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	26,19 (5,65-131,24)	11,34 (5,91-28,21)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	0,24 (0,17-1,64)	0,09 (0,03-0,41)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	1,66 (0,97-27,19)	1,76 (0,44-1,99)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10,26 (1,92-112,41)	5,4 (0,46-25,09)	> 0,05
День 30 Day 30	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺	7,3 (4,24-15,19)	29,88 (25,37-35,76)	0,01
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	30,96 (17,32-59,51)	54,85 (14,46-82,64)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	0,26 (0,12-0,60)	0,4 (0,11-0,80)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	1,99 (1,12-5,20)	2,64 (1,15-17,23)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	8,79 (1,53-17,81)	32,12 (11,37-128,36)	0,02
День 60 Day 60	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺	31,19 (10,35-58,42)	35,36 (24,30-66,94)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	171,1 (111,68-445,63)	36 (14,75-117,94)	0,04
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	9,39 (3,17-19,20)	27,69 (3,23-49,12)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	1,55 (0,60-10,84)	4,4 (2,44-17,75)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	48,33 (27,47-87,78)	60,38 (38,42-148,00)	> 0,05
День 90 Day 90	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺	49,55 (16,21-78,81)	63,11 (42,09-103,71)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	69,2 (0,00-676,94)	31,11 (0,00-125,63)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	24,36 (2,11-101,66)	30,36 (10,06-65,59)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	3,56 (1,42-11,22)	5,63 (4,64-11,04)	> 0,05
	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	82,97 (65,40-119,91)	86,47 (45,05-132,25)	> 0,05

реализовать первичный иммунный ответ против антигена [17]. Однако нужно отметить, что эта популяция иммунокомпетентных клеток является короткоживущей, в связи с этим иммунный ответ, индуцированный с участием только НК-клеток, без вовлечения Т-клеток, может обеспечить ограниченный по времени противоопухолевый контроль. С другой стороны, аллореактивность НК-клеток, под которой понимают несовместимость по лигандам к KIR-рецепторам между донором и реципиентом [18], обеспечивает контроль минимальной резидуальной болезни и развития рецидивов, что особенно важно в раннем посттрансплантационном периоде, когда еще не произошло полного восстановления адаптивного Т-клеточного иммунитета [13].

Интересным феноменом является то, что с аллореактивностью НК-клеток не связано развитие РТПХ. Одно из первых исследований показало, что трансплантация аллогенного костного мозга вместе с активированными интерлейкином-2 НК-клетками способствует приживлению трансплантата без развития РТПХ [22]. Трансфузия донорских активированных НК-клеток в день 0 при трансплантации аллогенного костного мозга от несовместимого по HLA донора сопровождается лучшей выживаемостью по сравнению с трансплантацией без дополнительного введения НК-клеток, за счет не только более мощной реакции трансплантат против опухоли, но и за счет значимо меньшей частоты развития острой РТПХ тяжелой степени [2]. Такие результаты объясняются тем, что аллореактивные НК-клетки,

трансплантированные реципиенту, ингибируют пролиферацию Т-лимфоцитов, что и препятствует развитию острой РТПХ [24]. В связи с этим иммуноадаптивная терапия донорскими НК-клетками у пациентов после алло-ТГСК представляется иммунологически обоснованной, без увеличения рисков РТПХ, и сегодня находит все большее применение при трансплантациях от гаплоидентичных доноров с использованием посттрансплантационного циклофосфида [19].

Исследования демонстрируют, что реконституция НК-клеток во многом определяется не влиянием непосредственно самих режимов профилактики на НК-клеточный компартмент, а зависит от Т-клеточного пула [8, 9]. Одно из предположений заключается в том, что для пролиферации и НК-клеток, и Т-клеток необходимым условием является выработка IL-15, который в норме вырабатывается фагоцитами в ответ на попадание чужеродного антигена, что приводит к пролиферации клеток первичного иммунного ответа, а также индуцирует и Т-клеточный иммунный ответ. В условиях лимфопении IL-15 вырабатывается самими Т-клетками, что является необходимым для пролиферации и активации Т-клеток и реализации иммунного ответа против антигена [6]. Другими словами, в раннем посттрансплантационном периоде, период глубокой лимфопении создает своеобразную «конкуренцию» за IL-15, которую «выигрывают» Т-клетки [10]. В связи с этим становится понятным, почему применение АТГ в режимах профилактики РТПХ не оказывает влияния на НК-клеточный компартмент и полное восстановление субпопуляций НК-клеток наблюдается уже в течение первого месяца после алло-ТГСК, в то время как глубокая деплеция субпопуляций Т-клеток, индуцируемая АТГ, сопровождается отсроченным восстановлением адаптивного Т-клеточного иммунитета [5, 29].

Посттрансплантационный ЦФ характеризуется воздействием не только на субпопуляции CD4⁺, CD8⁺Т-клеток, но и оказывает влияние на восстановление и НК-клеток [27]. Было показано, что влияние ЦФ обусловлено тем, что он преимущественно уничтожает «молодые» НК-клетки (имеющие на своей поверхности только один KIR-рецептор — single-KIR⁺ НК-клетки), являющиеся аллореактивными НК-клетками, так как они не экспрессируют альдегиддегидрогеназу — фермент, который вырабатывается стволовыми клетками и Т-регуляторными клетками, что делает их резистентными к действию ЦФ [15, 31].

С другой стороны, учитывая, что аллореактивные НК-клетки не индуцируют развитие острой

РТПХ, более глубокая деплеция НК-клеток после ЦФ также представляет собой иммунологическое обоснование для проведения иммуноадаптивной терапии донорскими НК-клетками в раннем посттрансплантационном периоде. Однако, согласно нашим данным, использование ЦФ как индуктора толерантности оказывает значимое влияние на реконституцию НК-клеток, а также CD4⁺Т-клеток, только у реципиентов КМ, в то время как при использовании СКК достоверных различий в восстановлении клеточных субпопуляций не отмечается. Следует отметить, что выбор источника гемопоэтических стволовых клеток сам по себе влияет на восстановление иммунокомпетентных клеток. Известно, что более быстрое восстановление наблюдается у реципиентов СКК, за счет исходно большего разнообразия клеточных субпопуляций, которые трансплантируются реципиенту [1].

Не менее значимым является и восстановление Т-клеточного звена иммунной системы, от которого в большей степени зависит долгосрочный результат алло-ТГСК. Среди факторов, которые влияют на реконституцию Т-клеток, помимо источника ГСК, выделяют возраст пациентов, предшествующее химиотерапевтическое и/или лучевое воздействие, вариант предтрансплантационного кондиционирования, профилактики острой РТПХ [14]. Так, например, в настоящее время у пациентов старше 25-30 лет не используют миелоаблативное кондиционирование не только по причине высокой токсичности, так как современные протоколы сопроводительной терапии позволяют выхаживать соматически тяжелых пациентов, а в связи с его практически необратимым воздействием на ткань тимуса, что у взрослых приводит к невозможности восстановить Т-клеточный иммунитет [14]. Введение АТГ в свое время позволило заменить миелоаблативный режим на режим пониженной интенсивности, что улучшило выживаемость взрослых больных [25]. С другой стороны, действие АТГ заключается в тотальной лимфодеплеции, и не только циркулирующего пула Т-клеток, но и лимфоидной ткани, включая и воздействие его на тимус, что сопровождается отсроченной реконституцией Т-клеточного компартмента [16].

Действие ЦФ является более селективным. Его введение на +3-й, +4-й день после алло-ТГСК иммунологически обосновано, так как он деплетирует пул циркулирующих аллореактивных Т-клеток, который сформировался к этому времени у реципиента, и не оказывает влияние на клетки памяти, регуляторные Т-клетки и тимус, что обеспечивает возможность для пол-

ного восстановления адаптивного Т-клеточного иммунитета у взрослых пациентов после алло-ТГСК [20].

Таким образом, можно заключить, что иммунологически более обосновано использование профилактики РТПХ с использованием ЦФ. В совокупности с результатами нашей работы, использование ЦФ с целью профилактики РТПХ кажется более целесообразным в случае использования СКК в качестве источника трансплантата, так как в таком случае ЦФ не пролонгирует восстановление NK-клеток и субпопуляций CD4⁺, CD8⁺-Т-клеток на ранних сроках после алло-ТГСК в условиях, когда полноценный

противоопухолевый иммунный контроль еще полностью не сформирован.

Заключение

Таким образом, показано, что применение ЦФ в комбинации с костным мозгом как источником стволовых клеток приводит к значимому снижению числа клеток отдельных субпопуляций (CD4⁺, CD8⁺, NK-клетки) в ранние сроки после алло-ТГСК. При использовании СКК в качестве источника трансплантата таких различий выявлено не было. Применение ЦФ в комбинации с СКК в качестве источника трансплантата иммунологически является более целесообразным.

Список литературы / References

1. Ando T., Tachibana T., Tanaka M., Suzuki T., Ishiyama Y., Koyama S., Ogusa E., Numata A., Matsumoto K., Kanamori H., Nakajima H. Impact of graft sources on immune reconstitution and survival outcomes following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Adv.*, 2020, Vol. 4, no. 2, pp. 408-419.
2. Asai O., Longo D.L., Tian Z.G., Hornung R.L., Taub D.D., Ruscetti F.W., Murphy W.J. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.*, 1998, Vol. 101, no. 9, pp. 1835-1842.
3. Bacigalupo A. ATG in allogeneic stem cell transplantation: standard of care in 2017? Counterpoint. *Blood Adv.*, 2017, Vol. 1, no. 9, pp. 569-572.
4. Bacigalupo A., Dominietto A., Ghiso A., di Grazia C., Lamparelli T., Gualandi F., Bregante S., van Lint M.T., Geroldi S., Luchetti S., Grasso R., Pozzi S., Colombo N., Tedone E., Varaldo R., Raiola A.M. Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and post-transplant cyclophosphamide for hematologic malignancies following a myeloablative conditioning: an update. *Bone Marrow Transplant.*, 2015, Vol. 50, Suppl. 2, no. S2, pp. S37-S39.
5. Bosch M., Dhadda M., Hoegh-Petersen M., Liu Y., Hagel L.M., Podgorny P., Ugarte-Torres A., Khan F.M., Luider J., Auer-Grzesiak I., Mansoor A., Russell J.A., Daly A., Stewart D.A., Maloney D., Boeckh M., Storek J. Immune reconstitution after anti-thymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy*, 2012, Vol. 14, no. 10, pp. 1258-1275.
6. Bourgeois C. T cell homeostasis in steady state and lymphopenic conditions. *Immunol. Lett.*, 2006, Vol. 107, no. 2, pp. 89-92.
7. Chhabra S., Liu Y., Hemmer M.T., Costa L., Pidala J.A., Couriel D.R., Alousi A.M., Majhail N.S., Stuart R.K., Kim D., Ringden O., Urbano-Ispizua A., Saad A., Savani B.N., Cooper B., Marks D.I., Socie G., Schouten H.C., Schoemans H., Abdel-Azim H., Yared J., Cahn J.Y., Wagner J., Antin J.H., Verdonck L.F., Lehmann L., Aljurf M.D., MacMillan M.L., Litzow M.R., Solh M.M., Qayed M., Hematti P., Kamble R.T., Vij R., Hayashi R.J., Gale R.P., Martino R., Seo S., Hashmi S.K., Nishihori T., Teshima T., Gergis U., Inamoto Y., Spellman S.R., Arora M., Hamilton B.K. Comparative analysis of calcineurin inhibitor-based methotrexate and mycophenolate mofetil-containing regimens for prevention of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2019, Vol. 25, no. 1, pp. 73-85.
8. Ciurea S.O., Mulanovich V., Saliba R.M., Bayraktar U.D., Jiang Y., Bassett R., Wang S.A., Konopleva M., Fernandez-Vina M., Montes N., Bosque D., Chen J., Rondon G., Alatrash G., Alousi A., Bashir Q., Korbling M., Qazilbash M., Parmar S., Shpall E., Nieto Y., Hosing C., Kebriaei P., Khouri I., Popat U., de Lima M., Champlin R.E. Improved early outcomes using a T Cell replete graft compared with T Cell depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2012, Vol. 18, no. 12, pp. 1835-1844.
9. Cooley S., McCullar V., Wangen R., Bergemann T.L., Spellman S., Weisdorf D.J., Miller J.S. KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation. *Blood*, 2005, Vol. 106, no. 13, pp. 4370-4376.
10. Cooper M.A., Bush J.E., Fehniger T.A., Vandeusen J.B., Waite R.E., Liu Y., Aguila H.L., Caligiuri M.A. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood*, 2002, Vol. 100, no. 10, pp. 3633-3638.
11. Düver F., Weißbrich B., Eyrich M., Wölfl M., Schlegel P.G., Wiegering V. Viral reactivations following hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients – a single center 11-year analysis. *PLoS ONE*, 2020, Vol. 15, no. 2, e0228451. doi: 10.1371/journal.pone.0228451.

12. Dvorak C.C., Wright N.B., Wong W.B., Kristovich K.M., Matthews E.W., Weinberg K.I., Amylon M.D., Agarwal R. Safety of hematopoietic stem cell transplantation in children less than three years of age. *Pediatr. Hematol. Oncol.*, 2008, Vol. 25, no. 8, pp. 705-722.
13. Gao F., Ye Y., Gao Y., Huang H., Zhao Y. Influence of KIR and NK cell reconstitution in the outcomes of hematopoietic stem cell transplantation. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11. 2022. doi: 10.3389/fimmu.2020.02022.
14. Hahn T., McCarthy P.L., Zhang M.J., Wang D., Arora M., Frangoul H., Gale R.P., Hale G.A., Horan J., Isola L., Maziarz R.T., van Rood J.J., Gupta V., Halter J., Reddy V., Tiberghien P., Litzow M., Anasetti C., Pavletic S., Ringden O. Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 2008, Vol. 26, no. 35, pp. 5728-5734.
15. Kastan M.B., Schlaffer E., Russo J.E., Colvin O.M., Civin C.I., Hilton J. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1990, Vol. 75, pp. 1947-1950.
16. Kekre N., Zhang Y., Zhang M.J., Carreras J., Ahmed P., Anderlini P., Atta E.H., Ayas M., Boelens J.J., Bonfim C., Deeg J.H., Kapoor N., Lee J.W., Nakamura R., Pulsipher M.A., Eapen M., Antin J.H. Effect of antithymocyte globulin source on outcomes of bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Haematologica*, 2017, Vol. 102, no. 7, pp. 1291-1298.
17. Kolb H.J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood*, 2008, Vol. 112, pp. 4371-4383.
18. Ludajic K., Balavarca Y., Bickeboller H., Rosenmayr A., Fae I., Fischer G.F., Kouba M., Pohlreich D., Kalls P., Greinix H.T. KIR genes and KIR ligands affect occurrence of acute GVHD after unrelated, 12/12 HLA matched, hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2009, Vol. 44, no. November 2008, pp. 97-103.
19. Luznik L., O'Donnell P.V., Symons H.J., Chen A.R., Leffell M.S., Zahurak M., Gooley T.A., Piantadosi S., Kaup M., Ambinder F., Huff C.A., Matsui W., Bolaños-Meade J., Borrello I., Powell J.D., Harrington E., Warnock S., Flowers M., Robert A., Sandmaier B.M., Storb R.F., Jones R.J., Fuchs E.J. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2009, Vol. 14, no. 6, pp. 641-650.
20. Luznik L., O'Donnell P.V., Symons H.J., Chen A.R., Susan M., Zahurak M., Gooley T.A., Piantadosi S., Kaup M., Ambinder F., Huff C.A., Matsui W., Bolaños-Meade J., Borrello I., Powell J.D., Harrington E., Warnock S., Flowers M., Brodsky R.A., Sandmaier B.M., Storb R.F., Jones R.J., Fuchs E.J. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2008, Vol. 14, pp. 641-650.
21. Mathisen M.S., Ravandi F. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.*, 201, Vol. 365, no. 19, 1842; author reply pp. 1843-1844.
22. Murphy W.J., Bennett M., Kumar V., Longo D.L. Donor-type activated natural killer cells promote marrow engraftment and B cell development during allogeneic bone marrow transplantation. *J. Immunol.*, 1992, Vol. 148, no. 9, pp. 2953-2960.
23. Ogonek J. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 507. doi: 10.3389/fimmu.2016.00507.
24. Olson J.A., Leveson-Gower D.B., Gill S., Baker J., Beilhack A., Negrin R.S. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 21, pp. 4293-4301.
25. Pihusch R., Holler E., Mühlbayer D., Göhring P., Stötzer O., Pihusch M., Hiller E., Kolb H.J. The impact of antithymocyte globulin on short-term toxicity after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2002, Vol. 30, no. 6, pp. 347-354.
26. Ram R., Storb R. Pharmacologic prophylaxis regimens for acute graft-versus-host disease: past, present and future. *Leuk. Lymphoma*, 2013, Vol. 54, no. 8, pp. 1591-1601.
27. Retière C., Willem C., Guillaume T., Vié H., Gautreau-Rolland L., Scotet E., Saulquin X., Gagne K., Béné M.C., Imbert B.M., Clemenceau B., Peterlin P., Garnier A., Chevallier P. Impact on early outcomes and immune reconstitution of highdose post-transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 14, pp. 11451-11464.
28. Servais S., Lengline E., Porcher R., Carmagnat M., de Latour R.P., Robin M., de Fontebune F.S., Clave E., Maki G., Granier C., Xhaard A., Dhedin N., Molina J.M., Toubert A., Moins-Teisserenc H., Socie G. Long-term immune reconstitution and infection burden after mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2014, Vol. 20, no. 4, pp. 507-517.
29. Servais S., Menten-Dedoyart C., Beguin Y., Seidel L., Gothot A., Daulne C., Willems E., Delens L., Humblet-Baron S., Hannon M., Baron F. Impact of pre-transplant anti-T Cell globulin (ATG) on immune recovery after myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 6, e0130026. doi: 10.1371/journal.pone.0130026.
30. Storb R., Deeg H.J., Whitehead J., Appelbaum F., Beatty P., Bensinger W., Buckner C.D., Clift R., Doney K., Farewell V., Hansen J., Hill R., Lum L., Martin P., McGuffin R., Sanders J., Stewart P., Sullivan K., Witherspoon R., Yee G., Thomas E.D. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 1986, Vol. 314, no. 12, pp. 729-735.
31. Tomita H., Tanaka K., Hisamatsu K., Hara A. The role of aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*, 201, Vol. 7, no. 10, pp. 11018-11032.

32. Ureshino H., Shindo T., Sano H., Kubota Y., Ando T., Kidoguchi K., Kusaba K., Itamura H., Kojima H., Kusunoki Y., Miyazaki Y., Kojima K., Tanaka H., Saji H., Oshima K., Kimura S. Reconstitution of NK cells expressing KIR3DL1 is associated with reduced NK cell activity and relapse of CML after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int. J. Hematol.*, 2020, Vol. 111, no. 5, pp. 733-738.
33. Walker I., Panzarella T., Couban S., Couture F., Devins G., Elemary M., Gallagher G., Kerr H., Kuruvilla J., Lee S.J., Moore J., Nevill T., Popradi G., Roy J., Schultz K.R., Szwajcer D., Toze C., Foley R. Pretreatment with anti-thymocyte globulin versus no anti-thymocyte globulin in patients with haematological malignancies undergoing haemopoietic cell transplantation from unrelated donors: a randomised, controlled, open-label, phase 3, multicentre trial. *Lancet Oncol.*, 2016, Vol. 17, no. 2, pp. 164-173.
34. Yu C., Seidel K., Nash R.A., Deeg H.J., Sandmaier B.M., Barsoukov A., Santos E., Storb R. Synergism between mycophenolate mofetil and cyclosporine in preventing graft-versus-host disease among lethally irradiated dogs given DLA-nonidentical unrelated marrow grafts. *Blood*, 1998, Vol. 91, no. 7, pp. 2581-2587.
35. Zecca M., Prete A., Rondelli R., Lanino E., Balduzzi A., Messina C., Fagioli F. Chronic graft-versus-host disease in children : incidence, risk factors, and impact on outcome. *Blood*, 2016, Vol. 100, no. 4, pp. 1192-1201.

Авторы:

Михальцова Е.Д. — к.м.н., научный сотрудник сектора по изучению иммунных воздействий и осложнений после ТКМ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Попова Н.Н. — врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Дроков М.Ю. — к.м.н., руководитель сектора по изучению иммунных воздействий и осложнений после ТКМ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Капранов Н.М. — медицинский физик лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Давыдова Ю.О. — врач клинической лабораторной диагностики лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Васильева В.А. — к.м.н., заведующая отделением иммунохимиотерапии с дневным стационаром для больных после ТКМ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Дубняк Д.С. — врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Масликова У.В. — врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Mikhailtsova E.D., PhD (Medicine), Research Associate, Sector for Studying Immune Effects and Complications of HSCT, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Popova N.N., Clinical Hematologist, Department of Intensive High-Dose Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Drokov M.Yu., PhD (Medicine), Head, Sector for Studying Immune Effects and Complications of HSCT, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Kapranov N.M., Medical Physicist, Laboratory of Blood and Marrow Cell Immunophenotyping, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Davydova Yu.O., Doctor of Laboratory Diagnostics, Laboratory of Blood and Marrow Cell Immunophenotyping, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Vasilieva V.A., PhD (Medicine), Head, Department of Immunochemotherapy with Daytime Hospital for posttransplant patients, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Dubnyak D.S., Clinical Hematologist, Department of Intensive High-Dose Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Maslikova U.V., Clinical Hematologist, Department of Intensive High-Dose Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Гальцева И.В. — к.м.н., заведующая лабораторией иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кузьмина Л.А. — к.м.н., заведующая отделением интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Паровичникова Е.Н. — д.м.н., заведующая отделом химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и ТКМ 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

Galtseva I.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Blood and Marrow Cell Immunophenotyping, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Kuzmina L.A., PhD (Medicine), Head, Department of Intensive High-Dose Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Parovichnikova E.N., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Chemotherapy of Hemoblastoses, Depressions of Hematopoiesis and HSCT, 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 15.12.2020
Принята к печати 10.01.2021

Received 15.12.2020
Accepted 10.01.2021

КОРРИГИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ РАСТВОРИМЫХ ФАКТОРОВ МАКРОФАГОВ М2-ФЕНОТИПА У ДЕТЕЙ С НАРУШЕНИЕМ РЕЧИ

Шевела Е.Я.¹, Дегтярева В.Г.², Сосновская А.В.², Воронова Е.В.²,
Кафанова М.Ю.³, Ращупкин И.М.¹, Останин А.А.¹, Черных Е.Р.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ООО «Медицинский центр “Синеглазка”», г. Новосибирск, Россия

³ ГБУЗ Новосибирской области «Детская городская больница № 1», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Целью исследования явилась оценка безопасности и клинической эффективности ингаляционной иммунотерапии на основе интраназального введения биоактивных факторов макрофагов М2-фенотипа у детей с нарушением речевого развития, а также исследование влияния ингаляционной иммунотерапии на профиль цитокинов в сыворотке крови пациентов. В исследование, которое проводили по протоколу NCT04689282 (www.ClinicalTrials.gov), были включены 14 детей (9 мальчиков / 5 девочек), в возрасте от 3 до 8 лет, с расстройствами речи, связанными с перинатальными или постнатальными поражениями ЦНС различного генеза. Оценку состояния детей неврологом и логопедом проводили до начала терапии, по завершении курса (1 мес.) и через 6 месяцев. Образцы сыворотки крови для анализа цитокинового профиля получали до и через 1 месяц после терапии. Курсовое лечение с использованием интраназальных ингаляций кондиционных сред М2-макрофагов (по 2 мл 1 раз в сутки в течение 28-30 дней) было безопасным и хорошо переносимым. Ни у одного из 14 пролеченных детей не было отмечено выраженных побочных реакций и тяжелых нежелательных явлений. Интраназальная иммунотерапия приводила к уменьшению выраженности речевых расстройств, что проявлялось улучшением понимания речи на 45%, сенсомоторного уровня речи — на 51%, навыков словообразования — на 72%, а также двукратному возрастанию общей и мелкой моторики. У детей с наличием признаков расстройств аутистического спектра наряду с улучшением речевой активности, регистрировалось уменьшение выраженности аутоподобной симптоматики, о чем свидетельствовало статистически достоверное снижение балла по шкале CARS с 42,5 до 38,5 через 1 месяц и 33 баллов через 6 месяцев ($p < 0,05$). Клинический эффект проявлялся достаточно быстро — уже через месяц после первой процедуры — и сохранялся или усиливался в течение 6-месячного наблюдения. При этом две трети детей продемонстрировали отчетливое клиническое улучшение, у остальных улучшение было незначительным. Сравнительный анализ сывороточного уровня цитокинов в этих подгруппах показал, что дети с выраженным положительным ответом на ингаляционную иммунотерапию отличались: 1) исходно более высоким уровнем VEGF и IGF-1; и 2) снижением уровня TNF α в ответ на ингаляционную иммунотерапию. В целом нами впервые апробирован принципиально новый

Адрес для переписки:

Шевела Екатерина Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: shevelak@mail.ru; ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Shevela Ekaterina Ya.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 236-03-29.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: shevelak@mail.ru; ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Я. Шевела, В.Г. Дегтярева, А.В. Сосновская,
Е.В. Воронова, М.Ю. Кафанова, И.М. Ращупкин,
А.А. Останин, Е.Р. Черных «Корректирующий эффект
растворимых факторов макрофагов М2-фенотипа
у детей с нарушением речи» // Медицинская
иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1137-1150.
doi: 10.15789/1563-0625-ТЕО-2224
© Шевела Е.Я. и соавт., 2021

For citation:

E.Ya. Shevela, V.G. Degtyareva, A.V. Sosnovskaya,
E.V. Voronova, M.Yu. Kafanova, I.M. Rashchupkin,
A.A. Ostanin, E.R. Chernykh “Therapeutic effect of soluble
factors of M2 phenotype macrophages in children with language
impairments”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1137-1150.
doi: 10.15789/1563-0625-ТЕО-2224
DOI: 10.15789/1563-0625-ТЕО-2224

подход, основанный на применении растворимых факторов М2-макрофагов и интраназального пути их введения для лечения детей с выраженными речевыми нарушениями, и продемонстрирована безопасность и, по предварительным данным, эффективность подобного подхода.

Ключевые слова: макрофаги, М2-фенотип, цитокины, интраназальные ингаляции, расстройства речевого развития, алалия

THERAPEUTIC EFFECT OF SOLUBLE FACTORS OF M2 PHENOTYPE MACROPHAGES IN CHILDREN WITH LANGUAGE IMPAIRMENTS

Shevela E.Ya.^a, Degtyareva V.G.^b, Sosnovskaya A.V.^b, Voronova E.V.^b, Kafanova M.Yu.^c, Rashchupkin I.M.^a, Ostanin A.A.^a, Chernykh E.R.^a

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

^b Medical Center "Sineglazka", Novosibirsk, Russian Federation

^c Pediatric City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the present study was to assess safety and clinical efficacy of inhalation immunotherapy based on intranasal administration of bioactive factors produced by the M2 phenotype macrophages in children with language impairments, as well as to study the effect of inhalation immunotherapy on the cytokine profile in the patients' blood serum. The study was carried out according to the NCT04689282 protocol (www.ClinicalTrials.gov) and included 14 children (9 boys / 5 girls), aged 3 to 8 years, with language impairments associated with perinatal or postnatal CNS lesions of various origin. The children recruited into the study were assessed by a neurologist and speech therapist before the therapy, at the end of the course (1 month), and 6 months later. Serum samples for cytokine analysis were obtained before and 1 month after therapy. The course of intranasal inhalations by the conditioned M2 media (2 ml one time per day for 28–30 days) was safe and well tolerated. None of the 14 treated children had significant adverse reactions and severe undesirable events. Intranasal immunotherapy led to a decrease in the severity of language problems, which manifested by improved speech understanding by 45%; the sensorimotor level of speech, by 51%; word formation skills, by 72%, as well as a twofold increase in general and fine motor skills. In children with signs of autism spectrum disorders, along with a language improvement, a decrease in the severity of autistic symptoms was registered, as evidenced by statistically significant decrease in the CARS score from 42.5 to 38.5 after 1 month, and to 33 points after 6 months ($p < 0.05$). The clinical effect was revealed rather soon, i.e., within a month after the first procedure, being maintained or intensified during a follow-up for 6 months. At the same time, two-thirds of the children showed a clear clinical improvement, with insignificant effect in the rest of patients. Comparative analysis of the serum cytokine levels in these subgroups showed that children with a pronounced positive response to inhaled immunotherapy differed in the following parameters: (1) initially higher level of VEGF and IGF-1, and (2) decrease the level of TNF α in response to intranasal immunotherapy. In summary, we first tested a fundamentally new approach based on the use of soluble factors from M2-type macrophages and intranasal route of their administration in order to treat the children with severe language impairments, demonstrating safety and obtained preliminary data on effectiveness of such approach.

Keywords: macrophages, M2 phenotype, cytokines, intranasal inhalations, specific language impairments, alalia

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований по теме «Обоснование и разработка новых технологий иммуномодуляции, стимуляции репаративных процессов и коррекции поведенческих и аддиктивных расстройств на основе использования миелоидных,

лимфоидных и стволовых клеток и/или продуктов их секрета».

Введение

Расстройства речевого развития являются одной из наиболее распространенных проблем психо-физического развития детей дошкольно-

го возраста, частота которой значительно увеличилась в последние годы. Нарушения развития речи, которые встречаются у 5-10% детей, негативно сказываются на общем формировании личности детей, их интеллектуальном развитии и поведении, затрудняя обучение и общение с окружающими [2, 8]. В большинстве случаев речевые расстройства связаны с гипоксическим ишемическим повреждением центральной нервной системы (ЦНС) в перинатальном периоде (ЦНС) [1]. Одной из наиболее тяжелых и стойких форм патологии речевой деятельности является алалия — отсутствие или недоразвитие речи при нормальном слухе и первично сохранном интеллекте, в результате поражения корковых речевых зон в доречевом периоде. Согласно МКБ-10, выделяют моторную алалию (F80.1) — расстройство развития экспрессивной речи, при котором способность ребенка использовать разговорную речь заметно ниже уровня возрастной нормы при сохранном понимании речи, и сенсорную алалию (F80.2) — расстройство развития рецептивной речи, при котором наблюдается непонимание речи при сохранном слухе.

Исследования последних двух десятилетий показали, что центральную роль в патогенезе повреждений ЦНС играет запуск нейровоспалительного процесса [27]. При этом образующиеся при воспалении продукты деградации миелина и протеогликаны являются ингибиторами нейрорепаративных процессов. Поэтому определенные перспективы в лечении различных повреждений ЦНС связывают с использованием клеточных технологий, в частности основанных на использовании прогениторных клеток и макрофагов, поскольку эти клетки продуцируют большое количество цитокинов и ростовых факторов, регулирующих выраженность воспалительной реакции с одной стороны, и участвующих в «запуске» репаративных процессов с другой [16, 29, 43]. Однако наличие гематоэнцефалического барьера существенно ограничивает попадание клеток и цитокинов в паренхиму мозговой ткани при их системном введении. В этой связи большой интерес в последние годы вызывает интраназальный путь доставки лекарственных препаратов, включая цитокины, в ткань мозга.

Интраназальный путь введения позволяет добиться быстрого и эффективного попадания различных субстанций в ткань головного и спинного мозга [11] и имеет ряд преимуществ, среди которых следует отметить простоту введения, возможность повторного введения, минимальное время доставки, отсутствие необходимости в модификации цитокинов для преодоления гематоэнцефалического барьера, отсутствие системных

побочных эффектов [5, 47]. В экспериментальных исследованиях было показано, что введенные интраназально нейротрофические факторы и эритропоэтин быстро проникают в ткани мозга через ольфакторный и тригеминальный пути, минуя гематоэнцефалический барьер [5, 40, 47]. Проникновение субстанций (например, инсулина) из носовой полости в ткани мозга продемонстрировано у человека [7, 14]. При этом демонстрация клинических эффектов интраназально введенных цитокинов в моделях различных нейрорасстройств открывает широкие перспективы для внедрения данного подхода в клиническую практику [15, 38].

Ранее нами был разработан новый метод получения макрофагов М2-фенотипа, кондиционные среды которых (КС-М2) содержат комплекс цитокинов, включая нейротрофические, проангиогенные и иммунорегуляторные факторы [4]. Клинические исследования, проведенные в группе 20 пациентов с органическими поражениями мозга различного генеза (NCT02957123, ClinicalTrials.gov), продемонстрировали хорошую переносимость и безопасность интраназальных ингаляций КС-М2. Более того, у пациентов регистрировалось статистически достоверное снижение уровня тревоги и депрессии, а также коррекция нарушений когнитивных функций. Достигнутый клинический эффект сохранялся в течение 6 месяцев наблюдения.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилась оценка безопасности и клинической эффективности интраназального введения кондиционных сред макрофагов М2-фенотипа у детей с речевыми расстройствами, связанными с перинатальными или постнатальными поражениями ЦНС различного генеза. Кроме того, планировалось оценить влияние ингаляционной иммунотерапии на профиль цитокинов в сыворотке крови пациентов.

Материалы и методы

Представленная работа является частью клинического исследования по протоколу IFCI-20/06/2017, одобренному решением локального этического комитета НИИ фундаментальной и клинической иммунологии и зарегистрированному на сайте www.ClinicalTrials.gov (NCT04689282). В исследование были recruited 14 детей (9 мальчиков / 5 девочек), в возрасте от 3 до 8 лет, с расстройствами речи, связанными с перинатальными или постнатальными поражениями ЦНС различного генеза (гипоксия, травма, инфекция, интоксикация и др.), верифицированными логопедом и неврологом,

при наличии письменного информированного согласия родителей. В исследование не включали детей с острыми инфекционными заболеваниями, судорожным синдромом, непереносимостью гентамицина и/или множественной лекарственной аллергией. Из реkrутируемой группы также исключались дети, у которых отставание в развитии речи было обусловлено снижением слуха, умственной отсталостью, тяжелой соматической патологией, неполноценным питанием, а также влиянием неблагоприятных социальных факторов (недостаточным общением и воспитанием). Оценку состояния детей неврологом, логопедом и родителями проводили до начала терапии, по завершении курса (1 мес.) и через 6 месяцев. Получение образцов сыворотки крови для анализа цитокинового профиля осуществляли до и через 1 месяц после терапии. Первичной конечной точкой являлось изменение выраженности речевых расстройств по данным логопедического обследования, вторичной – оценка безопасности, включающая анализ побочных реакций (аллергические, токсические, воспалительные реакции; неврологическое ухудшение, судорожный синдром) на фоне ингаляционного применения цитокинов.

Уровень речевого развития оценивали по балльно-уровневой шкале (шкала развития речи, ШРР) в соответствии со стандартизированной методикой Т.А. Фотековой [3]. Шкала включает шесть серий тестов, направленных на исследование: I – понимания речи (максимальный балл 33), II – сенсомоторного уровня речи (максимум 38 баллов), III – сформированности грамматического строя речи (максимум 24 балла), IV – словаря и навыков словообразования (максимум 17 баллов), V – связной речи (максимум 25 баллов), VI – общей и мелкой моторики (максимум 23 баллов). На основании максимального количества баллов (160) вычисляли показатель эффективности тестирования (ПЭТ, син. процент успешности) как суммарный балл за весь тест / 160×100 . Выполнение заданий на 80–100% соответствует IV уровню успешности (что является нормой), на 65,0–79,9% – III уровню успешности (что свидетельствует о нарушении речевого развития легкой степени), на 50,0–64,9% – II уровню (задержка речевого развития средней степени), на 49,9% и менее – I уровню (задержка речевого развития тяжелой степени). ПЭТ вычисляли для каждой серии (начисленное за серию количество баллов $\times 100$ / максимально возможный балл для данной серии).

Для оценки выраженности симптоматических проявлений РАС использовали рейтинговую

шкалу аутизма и аутоподобных состояний у детей CARS.

Получение кондиционных сред макрофагов M2-фенотипа

Кондиционные среды макрофагов M2-фенотипа (KC-M2) получали в соответствии с [33]. Кратко: макрофаги генерировали из прилипающей фракции моноклеарных клеток (МНК), которые выделяли стандартно из гепаринизированной венозной крови одного из родителей и инкубировали в присутствии рекомбинантного GM-CSF человека (rhGM-CSF, 50 нг/мл, Sigma-Aldrich, США) и 2% аутоплазмы при 37 °C и 5% CO₂. Через 7 суток культивирования KC-M2 собирали, подвергали стерилизующей фильтрации, аликвотировали (2,0 мл/флакон) и криоконсервировали (-20 °C).

Ингаляционная иммунотерапия (ИИТ)

Перед применением KC-M2 размораживали при комнатной температуре и использовали в виде мелкодисперсного аэрозоля интраназально с помощью компрессорного ингалятора 1 раз в сутки курсом в течение 28–30 дней. Первые 2–3 ингаляции проводили под контролем врача, последующее лечение проходило в амбулаторном режиме. ИИТ проводилась после окончания очередного курса базовой медикаментозной и немедикаментозной терапии, включавшей ноотропные и сосудистые препараты, витамины, дегидратационную и противосудорожную терапию, массаж, лазеротерапию по речевым точкам и др.

Оценка цитокинового профиля в сыворотке крови

Концентрацию цитокинов в образцах сыворотки крови определяли до и по окончании ИИТ методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих Human Cytokine 8-plex тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Панель 8-plex включала IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN γ , TNF α . Дополнительно в исследуемых образцах сыворотки методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию VEGF (Vascular endothelial growth factor; R&D Systems) и общего IGF-1 (Insulin-like growth factor-1; R&D Systems).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных (Me) значений и интерквартильного диапазона (Q_{0,25}–Q_{0,75}) %. Для оценки достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (p_U для непрерывных

переменных) и критерий Вилкоксона для связанных пар (p_w). Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции по Спирману. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

В исследование были включены 14 детей (9 мальчиков / 5 девочек), в возрасте от 3 лет 8 месяцев до 8 лет — 5,4 (4,3-5,9). У всех детей недоразвитие/нарушение речи проявлялось в виде специфического расстройства развития речи (код по МКБ-10 F80), в том числе в виде моторной (F80.1, $n = 9$) и сенсомоторной алалии (F80.2; $n = 5$). У подавляющего большинства детей (13/14) регистрировался I уровень речевого развития (отсутствие общеупотребительной речи), у одного ребенка — II уровень (начальные проявления общеупотребительной речи, характеризующиеся бедностью словарного запаса и явлениями аграмматизма). У 9 детей (64%) задержка речевого развития ассоциировалась с наличием аутоподобной симптоматики. У двух детей (14%) задержка речевого развития сочеталась с синдромом гиперактивности и дефицита внимания (СДВГ). Для всей выборки были характерны нарушения поведения (двигательные стереотипии, эмоциональная лабильность с аффективностью реакций и неадекватностью степени выраженности эмоционального ответа, недостаточная сформированность либо отсутствие навыков самообслуживания, в том числе неумение одеться, есть самостоятельно) и внимания (быстрая пресыщаемость, повышенная отвлекаемость, нарушение слухового внимания).

Анализ данных акушерско-гинекологического анамнеза выявил патологическое течение беременности в 86% случаев, в том числе внутриматочные инфекции (7/14), внутриутробную гипоксию плода (12/14), слабость родовой деятельности (2/14), угрозу прерывания беременности (2/14), оперативное родоразрешение (5/14), асфиксию плода (6/14), реанимационные мероприятия после родов (2/14). В ряде случаев ранний детский период осложнялся инфекционными заболеваниями (поствакцинальный менингоэнцефалит, 3/14; кишечные инфекции, 1/14) и травмами головного мозга (2/14).

Оценка уровня речевого развития выявила выраженные нарушения всех компонентов речи (рис. 1). Дети успешно выполняли только пятую часть заданий (31,4 балла при максимально возможных 160 баллах). Практически у всех детей (13/14) эффективность выполнения тестов (показатель эффективности тестирования, ПЭТ) не превышала 38%, что соответствовало низкому

уровню успешности (I уровень). Тестирование по шкале CARS продемонстрировало наличие признаков умеренных (30-36,5 баллов) и выраженных (37-60 баллов) расстройств аутистического спектра у 2 (14%) и 7 (50%) детей соответственно.

Все дети, рекрутированные в исследование, получили 28-30-дневный курс ингаляционной иммунотерапии (ИИТ) в виде ежедневных интраназальных ингаляций кондиционными средами М2 (КС-М2). ИИТ хорошо переносилась детьми и не вызывала каких-либо нежелательных побочных реакций (включая аллергические, токсические и воспалительные реакции), а также неврологического ухудшения. В двух случаях родители отметили кратковременную заложенность носа и появление слизистых выделений, которые купировались самостоятельно и не потребовали медикаментозного лечения. В двух других случаях интраназальное введение сопровождалось чиханием. У одного ребенка родители заметили ухудшение сна при проведении ингаляций в вечернее время, однако перенос сеансов на утро способствовал нормализации засыпания.

Проведение ИИТ сопровождалось снижением выраженности речевых расстройств у всех детей,

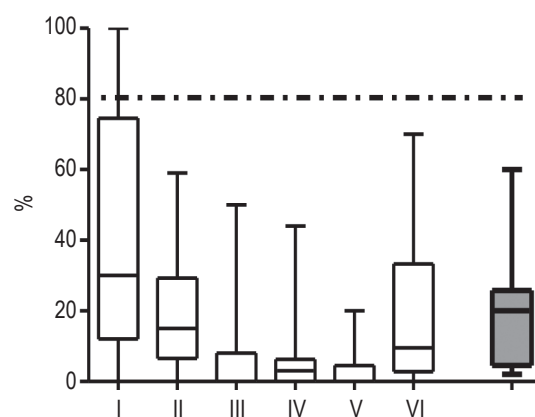


Рисунок 1. Исходная характеристика речевого развития детей

Примечание. Представлены показатели эффективности тестирования (ПЭТ) по шкале речевого развития: по отдельным сериям (римские цифры) и суммарный ПЭТ (серый бокс). Данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и диапазона минимальных-максимальных значений. Пунктирной линией обозначен нижний уровень нормативного диапазона.

Figure 1. Baseline characteristics of children's language development

Note. Test efficiency indicators (TEI) on the language development scale are presented: individual series (Roman numerals) and total TEI (gray box). Data are presented as median values, interquartile range and the range of minimum-maximum values. The dashed line indicates the lower level of the normative range.

что было зафиксировано через 1 месяц неврологом, логопедом и родителями (рис. 2). В целом по группе положительная динамика проявлялась в улучшении понимания речи на 45%; сенсомоторного уровня речи — на 51%; навыков словообразования — на 72%; общей и мелкой моторики — более чем в 2 раза ($p < 0,05$). Наиболее сложными для коррекции оказались способности к формированию связной речи (серия V), изменения которых были минимальными или отсутствовали. В целом дети стали спокойнее, повысился уровень и устойчивость внимания, начали формироваться или улучшились навыки самообслуживания (способность самостоятельно есть, одеваться и т.д.), появились звуки/слова/фразовая речь, увеличилось количество слов в предложениях. У детей с наличием признаков РАС наряду с улучшением речевой активности, регистрировалось уменьшение выраженности аутоподобного поведения, о чем свидетельствовало снижение балла по шкале CARS с 42,5 до 38,5 ($p = 0,015$) через 1 месяц и 33 ($p = 0,002$) через 6 месяцев.

В ряде случаев позитивные изменения отмечались родителями еще до завершения курса ИИТ (уже через 7-10 дней ингаляций). Следует отметить, что статистически значимые улучшения, регистрируемые через 1 месяц после начала ИИТ,

продолжали нарастать при дальнейшем наблюдении до 6 месяцев, причем в некоторых случаях изменения через 6 месяцев превышали уровень ранних изменений (например динамика сенсомоторного уровня речи или балла по CARS).

Анализ клинической эффективности позволил выделить две подгруппы — с выраженным (подгруппа 1) и умеренным (подгруппа 2) клиническим ответом (табл. 1). Критерием выраженного улучшения являлось увеличение суммарного ПЭТ не менее чем на 30% через 1 месяц после начала терапии. В подгруппу 1 вошли 9 детей (6 мальчиков и 3 девочки) со значительными клиническими улучшениями, подгруппу 2 составили 5 пациентов (3 мальчика и 2 девочки) с увеличением ПЭТ менее чем на 30%. Обе подгруппы не различались по возрасту, тяжести речевых нарушений и проявлений РАС ($p > 0,05$). В первой подгруппе ПЭТ через 1 месяц составлял 48%, к 6 месяцам возрастал еще на 33% и значительно превышал аналогичные показатели в оппозиционной группе ($p = 0,03$). Наряду с этим, на обоих сроках наблюдения регистрировалось достоверное снижение балла по шкале CARS. Во второй подгруппе увеличение ПЭТ через 1 месяц было незначительным (в среднем на 8%), а к 6 месяцам — двукратным ($p_w = 0,067$ по сравнению с

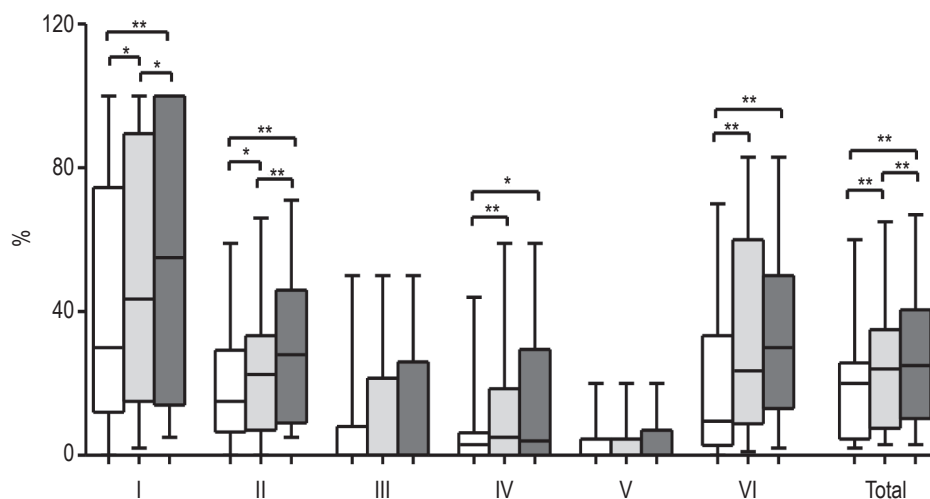


Рисунок 2. Динамика выраженности речевых нарушений через 1 месяц (светло-серые) и 6 месяцев (темно-серые боксы) после курса ИИТ по сравнению с исходным уровнем (белые боксы)

Примечание. Представлены показатели эффективности тестирования (ПЭТ) по шкале речевого развития: по отдельным сериям (римские цифры) и суммарный ПЭТ (Total). Данные представлены в виде медианных значений, интерквартильного диапазона и диапазона «минимум-максимум». *, ** – достоверность различий ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно) по критерию Вилкоксона для связанных пар.

Figure 2. Dynamics of language impairments 1 month (light gray boxes) and 6 months (dark gray boxes) after the course of inhaled immunotherapy (IIT) compared with the initial level (white boxes)

Note. Test efficiency indicators (TEI) on the language development scale are presented: individual series (Roman numerals) and total TEI (Total). Data are presented as median values, interquartile range and the range of minimum-maximum values. *, **, significance of differences ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively; Wilcoxon matched pairs test).

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ВЫРАЖЕННОСТИ РЕЧЕВЫХ РАССТРОЙСТВ И ПРИЗНАКОВ РАС В ПОДГРУППАХ С РАЗЛИЧНЫМ КЛИНИЧЕСКИМ ОТВЕТом НА ТЕРАПИЮ

TABLE 1. DYNAMICS OF LANGUAGE IMPAIRMENTS AND SIGNS OF ASD IN CHILDREN WITH DIFFERENT CLINICAL RESPONSES TO IIT

	Выраженный ответ Pronounced response (n = 9)			Умеренный ответ Moderate response (n = 5)		
	До Before	1 мес. 1 month	6 мес. 6 month	До Before	1 мес. 1 month	6 мес. 6 month
	1	2	3	4	5	6
Серия I Series I	33 (23-74)	47,7 (25,8-86,4)*	55 (34-91)* §	21,2 (13,6-63,6)	15,9 (12,1-86,4)	19,5 (16-100)§
Серия II Series II	19,7 (13,8-32,9)	28,9 (23,7-36,6)* #	39,5 (27,6-50,0)* § #	7,2 (6,6-10,5)	7,2 (6,6-7,9)	10,5 (5,3-24)
Серия III Series III	0 (0,0-8,3)	8,3 (0,0-22,9) 2-1: $p_w = 0,09$	2,1 (0,0-29,2) 3-1: $p_w = 0,067$	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Серия IV Series IV	4,4 (2,9-7,4)#	10,3 (5,6-26,5)* #	16,2 (2,9-41,2)* § 3-1: $p_w = 0,067$	0 (0-0)	0 (0-2,9)	0 (0-4,1)
Серия V Series V	2 (0-6) 1-4: $p_w = 0,09$	4 (0-6) 2-1: $p_w = 0,09$	0 (0-10)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Серия VI Series VI	21,7 (7,6-43,5)	43,5 (21,7-63,0)* #	43,5 (30,4-52,2)* #	4,3 (3,3-4,3)	8,7 (7,6-22,8) 5-4: $p_w = 0,067$	7,7 (4,2-25,2) 6-4: $p_w = 0,07$
Суммарный ПЭТ (по шести сериям тестов) Total test efficiency indicator (for six series)	20,2 (10-28) 1-4: $p_w > 0,05$	26,3 (10,3-41,4) 2-1: $p_w = 0,07$ 2-5: $p_u = 0,07$	35 (21-48)* § #	7,5 (4,7-19,5)	8,1 (6,1-22,8) 5-4: $p_w = 0,07$	16,7 (6,5-25,2) 6-4: $p_w = 0,1$ 6-5: $p_w = 0,067$
CARS	36,5 (27,0-44,5)	29,5 (23,0-38,5)*	26,8 (21,5-34,5)* § #	37 (33,0-42,5)	32 (29,5-45,0)	33 (24,5-40,0) 6-4: $p_w = 0,06$ 6-5: $p_w = 0,1$

Примечание. Выраженность речевых расстройств оценивали по шкале речевого развития (шесть серий тестов и суммарный балл) и выражали в процентном отношении от нормы (показатель эффективности тестирования, ПЭТ), признаков РАС – по шкале CARS (баллы). * – достоверность различий по сравнению с исходными значениями, § – между значениями через 1 и 6 мес. ($p_w < 0,05$, критерий Вилкоксона для связанных пар), # – достоверность различий по сравнению с соответствующим параметром в оппозиционной группе ($p_u < 0,05$, критерий Манна–Уитни). РАС – расстройства аутистического спектра.

Note. The severity of language impairments was assessed on the speech development scale (six series of tests and a total score) and expressed as a percentage of the norm (test efficiency indicator, TEI), signs of ASD – on the CARS scale (points). *, significance of differences compared with the initial values; §, between 1 and 6 month values ($p_w < 0.05$, Wilcoxon matched pairs test); #, compared with the corresponding parameter in the opposite group ($p_u < 0.05$, Mann–Whitney test). ASD, Autism Spectrum Disorder.

исходным уровнем). Снижение выраженности аутоподобного поведения (балл по CARS) у детей этой подгруппы также выявлялось только через 6 месяцев после терапии ($p_w = 0,06$).

Исследование исходного уровня цитокинов в сыворотке крови детей показало, что IL-4 и IL-10 детектировались на уровне нижней границы порога чувствительности, что послужило основани-

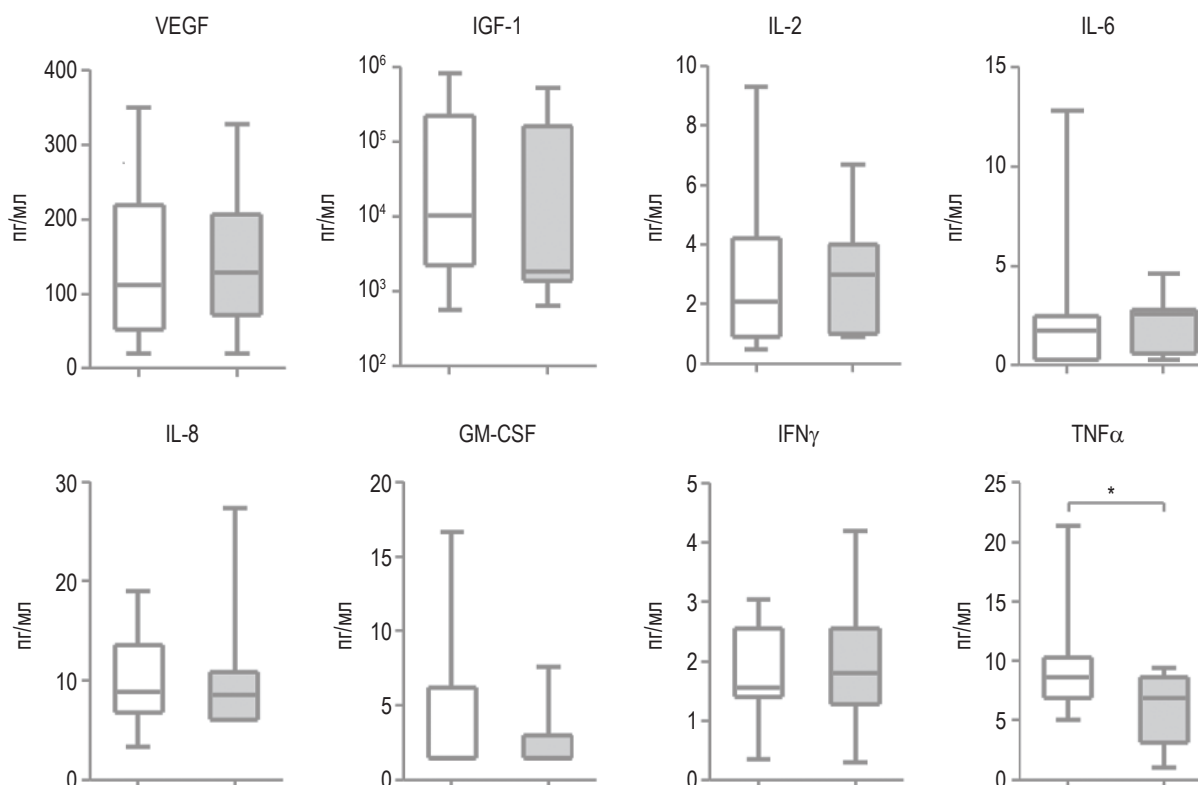


Рисунок 3. Концентрация цитокинов в сыворотке крови детей до (белые боксы) и после (серые боксы) курса ИИТ
Примечание. * – достоверность различий по критерию Вилкоксона для связанных пар.

Figure 3. Cytokine concentrations in blood serum samples receiving before (white boxes) and after (gray boxes) IIT course
Note. *, significance of differences (p_w – Wilcoxon matched pairs test).

ем для их исключения из дальнейшего анализа. В то же время образцы содержали значительные количества ростовых факторов (VEGF и, особенно, IGF-1), концентрация которых варьировала в диапазоне 10^2 - 10^4 пг/мл (рис. 3). Наряду с этим, в сыворотке присутствовал TNF α , уровень которого прямо коррелировал с IL-6 ($r_s = 0,66$; $p = 0,009$; $n = 14$) и IL-8 ($r_s = 0,59$; $p = 0,026$; $n = 14$). Уровень исследуемых цитокинов в сыворотке крови детей с наличием признаков РАС достоверно не отличался от такового в оппозитной группе (данные не представлены). Сравнительный анализ цитокинового «профиля» в подгруппах детей с выраженным и умеренным ответом на терапию показал, что дети с выраженным клиническим ответом (подгруппа 1) исходно отличались достоверно более высоким уровнем VEGF и IGF-1 ($p = 0,037$ и $p = 0,028$ соответственно), а также IL-6 (в виде тренда, $p = 0,058$) (табл. 2).

Проведение терапии сопровождалось статистически значимым снижением уровня TNF α в сыворотке, что наблюдалось в целом по группе (рис. 3) и у детей с выраженным клиническим ответом (табл. 2). При этом в подгруппе 1 уровень

TNF α снижался в большинстве случаев (67%), сохраняясь на исходном уровне в остальных 33%. Наряду с этим, в этой подгруппе наблюдалось двукратное снижение уровня GM-CSF ($p > 0,05$). При этом ИИТ значимо не влияла на уровень VEGF и IGF-1.

В оппозитной подгруппе 2 после терапии уровень TNF α также снижался у большинства детей (3/5, 60%), однако в остальных случаях содержание цитокина в сыворотке возрастало (в среднем в 1,5 раза). Кроме того, наблюдалось более чем 8-кратное увеличение исходно сниженного уровня IL-6 ($p = 0,047$), а также повышение концентрации IFN γ ($p = 0,057$). При этом содержание VEGF незначительно возрастало, а IGF-1 снижалось, однако эти изменения не были достоверными ($p > 0,05$).

Корреляционный анализ показал, что после ИИТ сывороточный уровень TNF α обратно коррелировал с содержанием IGF-1 ($r_s = -0,71$; $p = 0,015$; $n = 11$). Выявленная сильная взаимосвязь свидетельствует об изменении цитокинового баланса у детей с речевыми расстройствами, которое проявляется ослаблением провоспалитель-

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА СЫВОРОТОЧНОГО УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИЧЕСКОГО ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ

TABLE 2. DYNAMIC CHANGES IN SERUM CYTOKINE LEVELS DEPENDING ON THE CLINICAL RESPONSE TO THERAPY

Цитокины, пг/мл Cytokines, pg/ml	Выраженный ответ (подгруппа 1, n = 6) Pronounced response (subgroup 1, n = 6)		Умеренный ответ (подгруппа 2, n = 5) Moderate response (subgroup 2, n = 5)	
	До ИИТ Before IIT	Через 1 мес. 1 month after IIT	До ИИТ Before IIT	Через 1 мес. 1 month after IIT
VEGF	214 [#] (150-230)	178 [#] (129-264)	53 (37-101)	77 (21-102)
IGF-1	70 816 [#] (6612-366136)	85 194 [#] (1808-402 030)	2494 (2048-3285)	1740 (1396-1842)
IL-2	1,0 (0,9-3,5)	3,0 (1,01-4,90)	2,1 (1,0-4,9)	3,0 (1,00-3,99)
IL-6	2,3 [#] (1,3-2,6)	0,95 [#] (0,6-2,8)	0,31 (0,3-0,6)	2,6 [*] (2,6-2,8)
IL-8	11,2 (8,6-14,8)	6,14 (6,14-7,40)	8,6 (6,8-9,8)	10,4 (9,8-10,9)
GM-CSF	2,9 (1,5-7,1)	1,5 (1,5-1,5)	1,5 (1,5-1,5)	3,0 (1,5-5,2)
IFN γ	1,7 (1,55-2,60)	1,42 (0,36-1,60)	1,6 (0,99-1,60)	2,1 [*] (1,8-2,6)
TNF α	8,6 (6,9-10,3)	5,0 [*] (1,04-6,90)	8,6 (8,6-8,6)	6,9 (6,9-8,6)

Примечание. Анализ влияния ингаляционной иммунотерапии (ИИТ) на уровень цитокинов в сыворотке был проведен в группе 11 детей, у которых образцы сыворотки крови были получены до начала и по окончании терапии. * – достоверность различий по сравнению с исходными значениями ($p_w < 0,05$, критерий Вилкоксона для связанных пар), # – достоверность различий по сравнению с соответствующим параметром в оппозиционной группе ($p_u < 0,05$, критерий Манна–Уитни).

Note. Inhaled immunotherapy (IIT) influence on serum cytokine levels was analyzed in 11 children, whom serum samples were obtained before and at the end of therapy. *, significance of differences compared with the initial values ($p_w < 0.05$, Wilcoxon matched pairs test); #, significance of differences compared with the corresponding parameter in the opposite group ($p_u < 0.05$, Mann–Whitney test).

тельного вектора (например TNF α) и усилением регенераторного потенциала сывороточных факторов (например IGF-1) в результате проводимой иммунотерапии.

Обсуждение

Проведенное клиническое исследование показало, что использование растворимых факторов М2-макрофагов в виде интраназальных ингаляций является безопасным, хорошо переносимым и клинически эффективным в лечении детей с тяжелыми нарушениями речи. Интраназальная иммунотерапия приводит к 1) уменьшению выраженности речевых расстройств (что проявляется улучшением понимания речи на 45%, сенсомоторного уровня речи – на 51%, на-

выков словообразования – на 72%), 2) двукратному возрастанию общей и мелкой моторики и 3) уменьшению аутоподобной симптоматики. Клинический эффект проявляется достаточно быстро – уже через месяц после первой процедуры – и сохраняется или усиливается в течение 6-месячного наблюдения. При этом две трети детей продемонстрировали отчетливое клиническое улучшение, у остальных улучшение было незначительным. Сравнительный анализ сывороточного уровня цитокинов в этих подгруппах показал, что дети с выраженным положительным ответом на ингаляционную иммунотерапию отличаются 1) исходно более высоким уровнем VEGF и IGF-1 и 2) снижением уровня TNF α в ответ на ИИТ.

Наблюдаемое снижение уровня TNF α в сыворотке крови в целом по группе и особенно в подгруппе с хорошим ответом свидетельствует о выраженном противовоспалительном эффекте макрофагов M2-фенотипа. Известно, что нейровоспаление играет центральную роль в патогенезе самых разнообразных повреждений центральной нервной системы [37], в том числе расстройств аутистического спектра (РАС), умственной отсталости, детского церебрального паралича [10, 18, 32, 35]. Соответственно, подавление воспалительного ответа рассматривается как необходимый компонент комплексного лечения патологии ЦНС.

TNF α играет критическую роль в функционировании ЦНС, регулируя процессы синаптической пластичности, обучения, памяти и сна [30]. Повышенная продукция TNF α микроглией и астроцитами является важным компонентом нейровоспаления, особенно при хронических нейропатологических процессах [6]. Так, высокий уровень TNF α , а также IL-1 в плазме и спинномозговой жидкости у доношенных новорожденных с перинатальной гипоксически/ишемической энцефалопатией ассоциируется с более выраженными неврологическими расстройствами к 12 месяцам и более высокой частотой церебрального паралича [35]. При этом блокирование TNF α , например, конкурентным ингибитором пентоксифиллином, улучшает неврологический исход [34].

Роль TNF α продемонстрирована также в патогенезе расстройств аутистического спектра, о чем свидетельствует повышенный уровень цитокина в сыворотке крови и спинномозговой жидкости [13, 44], а также взаимосвязь уровня TNF с тяжестью аутизма [42]. Однако в нашем исследовании дети с аутоподобным поведением достоверно не отличались от детей без признаков РАС по исходному уровню TNF α в сыворотке крови, а снижение уровня TNF α после ингаляционной терапии наблюдалось в равной степени у детей обеих групп.

Одним из значимых результатов настоящего исследования является тот факт, что дети с хорошим и умеренным ответом на терапию различались по уровню проангиогенных факторов. Известно, что VEGF играет ключевую роль не только в процессах васкуло/ангиогенеза, но также участвует в регуляции нейрогенеза, стимулируя пролиферацию нейрональных предшественников [17, 46]. Эффекты VEGF могут также опосредоваться через стимуляцию продукции эндотелиальными клетками нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) [23]. Нейро-

протетивные свойства VEGF продемонстрированы *in vitro* и при различных повреждениях ЦНС *in vivo* [19, 20, 28]. Примечательно, что интрацеребровентрикулярное введение VEGF уменьшает размер инфаркта, в том числе, за счет стимуляции нейрогенеза и ангиогенеза [39].

Роль VEGF в развитии психомоторных нарушений у детей неоднозначна. С одной стороны, имеются данные о повышенном уровне VEGF у детей с РАС [21], что не характерно для детей с синдромом гиперактивности и дефицита внимания [41]. В то же время показана негативная взаимосвязь уровня циркулирующего VEGF с тяжестью РАС [12, 25].

Низкий уровень VEGF, ассоциированный с нарушением ангиогенеза и перфузии нервной ткани, может индуцировать нейродегенерацию [31]. Снижение уровня VEGF по мере утяжеления когнитивных нарушений продемонстрировано также при шизофрении [45].

Что касается различий в уровне IGF-1, который у детей с выраженным клиническим ответом (подгруппа 1) был существенно выше, чем у детей с незначительным ответом (подгруппа 2), следует отметить, что IGF-1 играет ключевую роль в ремоделировании сосудов, а также стимулирует рост и обеспечивает выживание нейронов [24]. Кроме того, IGF-1 способствует созреванию олигодендроцитов и их миелинизации [26]. В моделях ишемического поражения мозга показано, что введение IGF-1 снижает гибель нервных клеток и стимулирует пролиферацию глиальных клеток [22]. В то же время Simsek с соавт. сообщают о повышенном уровне IGF-1 в сыворотке крови пациентов с РАС (по сравнению с контрольной группой) и обсуждают возможную патогенетическую роль IGF-1 в развитии РАС [36].

Ранее нами было показано, что M2-макрофаги активно секретируют целый комплекс различных нейротрофических, нейропротективных и ангиогенных факторов, включая VEGF и IGF-1 [9, 33]. Возможно, у пациентов с умеренным ответом эти факторы в составе кондиционных сред восполняют имеющийся дефицит, что способствует развитию позитивного ответа в отсроченном периоде.

Заключение

Нами впервые апробирован принципиально новый подход, основанный на применении растворимых факторов M2-макрофагов и интраназального пути их введения для лечения детей с выраженными речевыми нарушениями, и продемонстрирована безопасность и, по предварительным данным, эффективность подобного подхода.

Список литературы / References

1. Бадалян Л.О. Детская неврология. 5-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2019. 608 с. [Badalyan L.O. Pediatric neurology]. Moscow: MEDpress-inform, 2019, 608 p.
2. Корнев А.Н. Основы логопатологии детского возраста: клинические и психологические аспекты. СПб.: Речь, 2006. 380 с. [Kornev A.N. Fundamentals of childhood speech pathology: clinical and psychological aspects]. St. Petersburg: Rech, 2006. 380 p.
3. Фотекова Т.А. Тестовая методика диагностики устной речи младших школьников. М.: АРКТМ, 2000. 55 с. [Fotekova T.A. Test method for the diagnosis of oral speech in primary schoolchildren]. Moscow: ARKTM, 2000. 55 p.
4. Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Кафанова М.Ю., Давыдова М.Н., Андрушкевич М.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Способ получения кондиционной среды, обладающей регенераторным потенциалом для интраназального введения при лечении заболеваний центральной нервной системы / Патент РФ. № 2016121776, заявл. 01.06.2016. [Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Kafanova M.Yu., Davydova M.N., Andrushkevich M.M., Ostanin A.A., Chernykh E.R. A method of obtaining a conditioned medium with a regenerative potential for intranasal administration in the treatment of diseases of the central nervous system / Patent RF, no. 2016121776, app. 01.06.2016.
5. Alcalá-Barraza S.R., Lee M.S., Hanson L.R., McDonald A.A., Frey W.H. 2nd, McLoon L.K. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. *J. Drug Target.*, 2010, Vol. 18, no. 3, pp. 179-190.
6. Bajnok A., Berta L., Orbán C., Veres G., Zádori D., Barta H., Méder Ü., Vécsei L., Tulassay T., Szabó M., Toldi G. Distinct cytokine patterns may regulate the severity of neonatal asphyxia-an observational study. *J. Neuroinflammation*, 2017, Vol. 14, no. 1, 244. doi:10.1186/s12974-017-1023-2.
7. Benedict C., Kern W., Schultes B., Born J., Hallschmid M. Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2008, Vol. 93, pp. 1339-1344.
8. Bonneau D., Verny C., Uze J. Genetics of specific language impairments. *Arch. Pediatr.*, 2004, Vol. 11, no. 10, pp. 1213-1216. (In French)
9. Chernykh E.R., Shevela E.Y., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Petrovsky Y.L., Ostanin A.A. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair? *Cell. Therapy Transpl.*, 2010, Vol. 2, no 6, pp. 1-7.
10. di Marco B., Bonaccorso C.M., Aloisi E., d'Antoni S., Catania M.V. Neuro-inflammatory mechanisms in developmental disorders associated with intellectual disability and autism spectrum disorder: a neuro-immune perspective. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 2016, Vol. 15, no. 4, pp. 448-463.
11. Dhuria S.V., Hanson L.R., Frey W.H. 2nd. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J. Pharm. Sci.*, 2010, Vol. 99, no. 4, pp. 1654-1673.
12. Emanuele E., Orsi P., Barale F., diNemi S.U., Bertona M., Politi P. Serum levels of vascular endothelial growth factor and its receptors in patients with severe autism. *Clin. Biochem.*, 2010, Vol. 43, pp. 317-319.
13. Ferguson B.J., Marler S., Altstein L.L., Lee E.B., Mazurek M.O., McLaughlin A., Macklin E.A., McDonnell E., Davis D.J., Belenchia A.M., Gillespie C.H., Peterson C.A., Bauman M.L., Margolis K.G., Veenstra-VanderWeele J., Beversdorf D.Q. Associations between cytokines, endocrine stress response, and gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder. *Brain Behav. Immun.*, 2016, Vol. 58, pp. 57-62.
14. Hallschmid M., Benedict C., Schultes B., Born J., Kern W. Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling. *Int. J. Obes. (Lond.)*, 2008, Vol. 32, pp. 275-282.
15. Hanson L.R., Frey W.H. 2nd. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci.*, 2008, Vol. 9, Suppl. 3, S5. doi:10.1186/1471-2202-9-S3-S5.
16. Jin K., Wang X., Xie L., Mao X.O., Zhu W., Wang Y., Shen J., Mao Y., Banwait S., Greenberg D.A. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, pp. 13198-13202.
17. Jin K., Zhu Y., Sun Y., Mao X.O., Xie L., Greenberg D.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, pp. 11946-11950.
18. Kempuraj D., Thangavel R., Natteru P.A., Selvakumar G.P., Saeed D., Zahoor H., Zaheer S., Iyer S.S., Zaheer A. Neuroinflammation induces neurodegeneration. *J. Neurol. Neurosurg. Spine*, 2016, Vol. 1, no. 1, 1003.
19. Lambrechts D., Carmeliet P. VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, Vol. 1762, pp. 1109-1121.
20. Lange C., Storkebaum E., de Almodóvar C.R., Dewerchin M., Carmeliet P. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nat. Rev. Neurol.*, 2016, Vol. 12, pp. 439-454.
21. Liu S.H., Shi X.J., Fan F.C., Cheng Y. Peripheral blood neurotrophic factor levels in children with autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Sci. Rep.*, 2021, Vol. 11, no. 1, 15. doi: 10.1038/s41598-020-79080-w.

22. Liu X.F., Fawcett J.R., Thorne R.G., DeFor T.A., Frey W.H. 2nd. Intranasal administration of insulin-like growth factor-I bypasses the blood-brain barrier and protects against focal cerebral ischemic damage. *J. Neurol. Sci.*, 2001, Vol. 187, no. 1-2, pp. 91-97.
23. Louissaint A.Jr., Rao S., Leventhal C., Goldman S.A. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*, 2002, Vol. 34, no. 6, pp. 945-960.
24. Madathil S.K., Evans H.N., Saatman K.E. Temporal and regional changes in IGF-1/IGF-1R signaling in the mouse brain after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 2010, Vol. 27, pp. 95-107.
25. Masi A., Breen E.J., Alvares G.A., Glozier N., Hickie I.B., Hunt A., Hui J., Beilby J., Ravine D., Wray J., Whitehouse A.J.O., Guastella A.J. Cytokine levels and associations with symptom severity in male and female children with autism spectrum disorder. *Mol. Autism*, 2017, Vol. 8, 63. doi: 10.1186/s13229-017-0176-2.
26. Mason J.L., Xuan S., Dragatsis I., Efstratiadis A., Goldman J.E. Insulin-like growth factor (IGF) signaling through type 1 IGF receptor plays an important role in remyelination. *J. Neurosci.*, 2003, Vol. 23, no. 20, pp. 7710-7718.
27. McAdams R.M., Juul S.E. The role of cytokines and inflammatory cells in perinatal brain injury. *Neurol. Res. Int.*, 2012, Vol. 2012, 561494. doi:10.1155/2012/561494.
28. Nicoletti J.N., Shah S.K., McCloskey D.P., Goodman J.H., Elkady A., Atassi H., Hylton D., Rudge J.S., Scharfman H.E., Croll S.D. Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus. *Neuroscience*, 2008, Vol. 151, no. 1, pp. 232-241.
29. Nishibe M., Barbay S., Guggenmos D., Nudo R.J. Reorganization of motor cortex after controlled cortical impact in rats and implications for functional recovery. *J. Neurotrauma*, 2010, Vol. 27, no. 12, pp. 2221-2232.
30. Olmos G., Llado J. Tumour necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, 861231. doi: 10.1155/2014/861231
31. Oosthuysen B., Moons L., Storkebaum E., Beck H., Nuyens D., Brusselmans K., van Dorpe J., Hellings P., Gorselink M., Heymans S., Theilmeyer G., Dewerchin M., Laudénbach V., Vermylen P., Raat H., Acker T., Vleminckx V., van den Bosch L., Cashman N., Fujisawa H., Drost M.R., Sciort R., Bruyninckx F., Hicklin D.J., Ince C., Gressens P., Lupu F., Plate K.H., Robberecht W., Herbert J.M., Collen D., Carmeliet P. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.*, 2001, Vol. 28, no. 2, pp. 131-138.
32. Pasqualetti G., Brooks D.J., Edison P. The role of neuroinflammation in dementias. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 2015, Vol. 15, no. 4, 17. doi: 10.1007/s11910-015-0531-7.
33. Sakhno L.V., Shevela E.Y., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The phenotypic and functional features of human M2 macrophages generated under low serum conditions. *Scand. J. Immunol.*, 2016, Vol. 83, no. 2, pp. 151-159.
34. Shohami E., Bass R., Wallach D., Yamin A., Gallily R. Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1996, Vol. 16, no. 3, pp. 378-384.
35. Silveira R.C., Procianny R.S. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in plasma and cerebrospinal fluid of term newborn infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J. Pediatr.*, 2003, Vol. 143, no. 5, pp. 625-629.
36. Şimşek F., Işık Ü., Aktepe E., Kılıç F., Şirin F.B., Bozkurt M. Comparison of serum VEGF, IGF-1, and HIF-1α levels in children with autism spectrum disorder and healthy controls. *J. Autism Dev. Disord.*, 2021. doi: 10.1007/s10803-020-04820-w.
37. Skaper S.D., Facci L., Giusti P. Neuroinflammation, microglia and mast cells in the pathophysiology of neurocognitive disorders: a review. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 2014, Vol. 13, no. 10, pp. 1654-1066.
38. Spetter M.S., Hallschmid M. Intranasal neuropeptide administration to target the human brain in health and disease. *Mol. Pharm.*, 2015, Vol. 12, no. 8, pp. 2767-2780.
39. Sun Y., Jin K., Xie L., Childs J., Mao X.O., Logvinova A., Greenberg D.A. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 111, no. 12, pp. 1843-1851.
40. Thorne R.G., Pronk G.J., Padmanabhan V., Frey W.H. 2nd. Delivery of IGF-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, 2004, Vol. 127, pp. 481-496.
41. Torun Y.T., Güney E., Aral A., Büyüktaşkin D., Tunca H., Taner Y.I., İşeri E. Determination of serum vascular endothelial growth factor levels in attention deficit hyperactivity disorder: A case control study. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.*, 2019, Vol. 17, no. 4, pp. 517-522.
42. Xie J., Huang L., Li X., Li H., Zhou Y., Zhu H., Pan T., Kendrick K.M., Xu W. Immunological cytokine profiling identifies TNF-α as a key molecule dysregulated in autistic children. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 47, pp. 82390-82398.

43. Xiong Y., Mahmood A., Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2010, Vol. 11, no. 3, pp. 298-308.
44. Xu N., Li X., Zhong Y. Inflammatory cytokines: potential biomarkers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 531518. doi: 10.1155/2015/531518.
45. Zhao Y., Xiao W., Chen K., Zhan Q., Ye F., Tang X., Zhang X. Neurocognition and social cognition in remitted first-episode schizophrenia: correlation with VEGF serum levels. *BMC Psychiatry*, 2019, Vol. 19, no. 1, 403. doi: 10.1186/s12888-019-2397-8.
46. Zhu Y., Jin K., Mao X.O., Greenberg D.A. Vascular endothelial growth factor promotes proliferation of cortical neuron precursors by regulating E2F expression. *FASEB J.*, 2003, Vol. 17, no. 2, pp. 186-193.
47. Zhu J., Jiang Y., Xu G., Liu X. Intranasal administration: a potential solution for cross-BBB delivering neurotrophic factors. *Histol. Histopathol.*, 2012, Vol. 27, no. 5, pp. 537-548.

Авторы:

Шевела Е.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Дегтярева В.Г. — к.м.н., врач-невролог высшей категории, заслуженный врач России, руководитель ООО «Медицинский центр «Синеглазка», г. Новосибирск, Россия

Сосновская А.В. — логопед, ООО «Медицинский центр «Синеглазка», г. Новосибирск, Россия

Воронова Е.В. — врач функциональной диагностики, ООО Медицинский центр «Синеглазка», Новосибирск, Россия

Кафанова М.Ю. — к.м.н., врач-нейрохирург высшей категории, ГБУЗ Новосибирской области «Детская городская больница № 1», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shevela E.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Degtyareva V.G., PhD (Medicine), Clinical Neurologist, Honored Doctor of Russian Federation, Head, Medical Center «Sineglazka», Novosibirsk, Russian Federation

Sosnovskaya A.V., Speech Therapist, Medical Center «Sineglazka», Novosibirsk, Russian Federation

Voronova E.V., Functional Diagnostics Physician, Medical Center «Sineglazka», Novosibirsk, Russian Federation

Kafanova M.Yu., PhD (Medicine), Neurosurgeon, Pediatric City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

Ращупкин И.М. — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Rashchupkin I.M., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 04.03.2021
Отправлена на доработку 26.04.2021
Принята к печати 27.04.2021

Received 04.03.2021
Revision received 26.04.2021
Accepted 27.04.2021

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО ВИРУСНОГО НАЗОФАРИНГИТА

Безрукова Е.В.¹, Воробейчиков Е.В.², Конусова В.Г.², Сосунов А.В.¹,
Шамцян М.М.³, Артюшкин С.А.¹, Симбирцев А.С.⁴

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»,
Санкт-Петербург, Россия

² ООО «Полифарм», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический
университет)», Россия

⁴ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Задача лечения острого назофарингита (ОНФ) связана с уменьшением симптомов заболевания и со снижением риска развития осложнений. Отсутствие надежных противовирусных средств актуализирует поиск препаратов среди других фармакотерапевтических групп.

Цель исследования – сравнительный анализ эффективности и целесообразности использования рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ и средства, содержащего β -D-глюканы для терапии ОНФ.

В исследование включены пациенты с ОНФ. Возраст пациентов варьировал от 18 до 55 лет. Обследовано 152 человека, из них: 38 – практически здоровые люди (группа 1); 114 – пациенты с ОНФ. Пациенты с ОНФ были разделены на группы: 38 человек (группа 2) получали стандартную терапию (сосудосуживающие капли в нос, орошение полости носа 0,1%-ным раствором «Мирамистина», полоскание горла раствором «Фурацилин»); 40 человек (группа 3) получали интраназально интерферон $\alpha 2b$ 10^5 МЕ по 1 впрыскиванию в каждый носовой ход 2 раза в день; 36 человек (группа 4) получали перорально иммуностропное средство, содержащее β -D-глюканы по 2 капсулы 2 раза в день. Продолжительность применения препаратов составляла 7 дней. Для идентификации этиологического фактора ОНФ использовали полимеразно-цепную реакцию (ПЦР). Определение концентраций цитокинов IL-1 β , IL-1 α проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). Клиническую эффективность оценивали в баллах. Учитывали симптомы: общее недомогание, боль в горле, характер выделений из носа, затруднение носового дыхания. Анализ результатов исследования проводили с помощью методов параметрической и непараметрической статистики.

В носовых секретах пациентов в 60,0% случаев выявляли риновирус (РВ) генотипа А. Распределение концентраций цитокинов в носовых секретах группы 1 демонстрирует, что значения концентраций IL-1 β находятся в интервале 20,0-25,0 пг/мл, значения концентраций IL-1 α – 1250,0-2500,0 пг/мл. При развитии ОНФ в носовых секретах пациентов происходит увеличение концентрации IL-1 β в интервале 30,0-70,0 пг/мл, а интервал концентраций IL-1 α практически не изменяется. На 7-й день лечения концентрации цитокинов среди пациентов, получавших иммуностропные средства, совпадали с

Адрес для переписки:

Безрукова Евгения Валерьевна
ФГБОУ ВО «Северо-западный государственный
медицинский университет имени И.И. Мечникова»
195067, Россия, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47.
Тел.: 8 (921) 759-07-88.
E-mail: ban_@mail.ru

Address for correspondence:

Bezrukova Eugeniya V.
I. Mechnikov North-Western State Medical University
195067, Russian Federation, St. Petersburg,
Piskarevsky ave., 47.
Phone: 7 (921) 759-07-88.
E-mail: ban_@mail.ru

Образец цитирования:

Е.В. Безрукова, Е.В. Воробейчиков, В.Г. Конусова,
А.В. Сосунов, М.М. Шамцян, С.А. Артюшкин,
А.С. Симбирцев «Применение иммунопрепаратов
для лечения острого вирусного назофарингита» //
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1151-1164.
doi: 10.15789/1563-0625-EOI-2300
© Безрукова Е.В. и соавт., 2021

For citation:

E.V. Bezrukova, E.V. Vorobeychikov, V.G. Konusova,
A.V. Sosunov, M.M. Shamtzyan, S.A. Artyushkin,
A.S. Simbirtsev "Effect of immune drugs to treat acute
viral nasopharyngitis", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5,
pp. 1151-1164. doi: 10.15789/1563-0625-EOI-2300
DOI: 10.15789/1563-0625-EOI-2300

группой практически здоровых людей. В группе пациентов, получавшие только средства стандартной терапии, на 7-й день значимых изменений в продукции цитокинов не наблюдали.

Применение указанных иммунобиологических средств на фоне развития ОНФ не вызывает в носовых секретах пациентов избыточную продукцию провоспалительного цитокина IL-1 β , что свидетельствует о целесообразности их применения, в том числе для снижения риска развития осложнений.

Ключевые слова: рекомбинантный интерферон $\alpha 2b$, β -D-глюканы, острый назофарингит, IL-1 β , IL-1ra

EFFECT OF IMMUNE DRUGS TO TREAT ACUTE VIRAL NASOPHARYNGITIS

Bezrukova E.V.^a, Vorobeychikov E.V.^b, Konusova V.G.^b, Sosunov A.V.^a, Shamtsyan M.M.^c, Artyushkin S.A.^a, Simbirtsev A.S.^d

^a I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b Polifarm LLC, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, Russian Federation

^d State Research Institute of High Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The task in treating acute nasopharyngitis (ANP) deals with reducing the disease symptoms and the risk of complications. The lack of reliable antiviral drugs makes it important to search for appropriate medicines among other pharmacotherapeutic groups.

The study involves a comparative analysis of the efficiency and estimates potential: the recombinant interferon $\alpha 2b$ and the compound containing fungal β -D-glucans used in treat ANP.

The studies involved patients with ANP from 18 to 55 years old. As many as 152 people were examined including the following: 38 were practically healthy people (group 1); and 114 patients with ANP: 38 people (group 2) was subject to a standard therapy (vasoconstrictor nasal drops, nasal cavity irrigation using 0.1% Miramistine solution, gargling using the Furacilin solution); forty people (group 3) were administered application of intranasal interferon $\alpha 2b$ of 10^5 IU, it was delivered with a spray into each nasal passage twice a day; 36 people (group 4) were administered an immunotropic drug containing β -D-glucans orally twice a day. The duration of drug administration lasted 7 days. Polymerase chain reaction (PCR) was used to identify the ANP etiological factor. Concentrations of cytokines IL-1 β , IL-1ra were estimated using enzyme immunoassay (ELISA) technique. Clinical efficiency was assessed through score approach. The following symptoms were taken into account: general malaise, sore throat, character of nasal discharge, and the difficulty of nasal breathing. The results of the study were analyzed using parametric and nonparametric statistical methods. In 60.0% the nasal secretions of patients revealed RV. The distribution of cytokine concentrations in nasal secretions in group 1 indicated that the concentration of IL-1 β was in the range of 20.0-25.0 pg/ml, and the concentration of IL-1ra was about 1250.0-2500.0 pg/ml. Developing ANP stimulated an increase in IL-1 β concentration up to 30.0-70.0 pg/ml in nasal secretions of patients without affecting IL-1ra concentrations. On day 7 of treatment, the cytokine concentrations among the patients treated using the immunotropic drugs were the same as in the group of healthy individuals. There were no significant changes in cytokine production on day 7 in the group of patients undergoing the standard treatment. Application of proposed immunobiological medicines to ANP does not result in overproduction of proinflammatory cytokine IL-1 β in nasal secretion. This confirms that these drugs are promising in the treating strategy including reduction of the risk of developing complications.

Keywords: intranasal interferon $\alpha 2b$, β -D-glucans, acute nasopharyngitis, IL-1 β , IL-1ra

Введение

Острый назофарингит (ОНФ) является широко распространенным заболеванием верхних дыхательных путей (ВДП). Наиболее частой причи-

ной развития ОНФ считаются: риновирусы (РВ), вирусы гриппа, парагриппа, респираторно-синцитиальные (РС) вирусы, коронавирусы, аденовирусы, эховирусы и др. Однако, по данным боль-

шинства исследователей, основной причиной развития ОНФ (50–75% случаев) являются РВ [3, 24]. Эти вирусы представляют собой одноцепочечные РНК-вирусы семейства Picornaviridae, принадлежащие к роду Enterovirus. РВ-инфекция наиболее часто встречается в весенние, летние и осенние месяцы, в то время как вирусы гриппа и РС-вирусы преобладают в структуре простудных заболеваний в зимний период [41].

В работе [20] установлено, что 90% серотипов РВ (большая группа), используют для проникновения в клетки эпителия слизистой носа молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), в то время 10% (малая группа) прикрепляется к клеткам через рецептор липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Некоторые представители РВ используют в качестве корецептора гепарансульфат. В отличие от вирусов гриппа и РС-вирусов, вызывающих разрушение эпителиальных клеток, для РВ не характерен цитопатогенный эффект [20]. Однако инфицирование РВ приводит к нарушению барьерной функции эпителиальных клеток в результате диссоциации белка окклюдина-1 из структуры плотных контактов [33, 43].

Эпителиальные клетки носоглотки являются не только входными воротами для вирусов, но они также являются первой линией защиты в результате продукции широкого спектра антимикробных факторов: дефензинов, кателицидинов, оксида азота, интерферонов [10] и активации иммунитета через различные рецепторы врожденного иммунитета [18]. На поверхности респираторного эпителия капсид РВ взаимодействует с Toll-like receptor 2 (TLR2), что приводит к продукции провоспалительных цитокинов: IL-6, IL-8, TNF α , IL-1 в результате активации сигнального каскада nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) и притоку клеток-эффекторов воспаления: нейтрофилов, моноцитов, макрофагов [49]. При проникновении внутрь клеток вирусная РНК распознается внутриклеточными рецепторами: TLR3, TLR7, TLR8, mediated antiviral responses (MDA5) и retinoic-acid inducible gene 1 (RIG1), что индуцирует синтез интерферонов, прежде всего 1-го типа (IFN α и β) и цитокинов для привлечения Т-клеток, обеспечивающих приобретенный цитотоксический и антитело-опосредованный иммунитет [45].

Однако легко иницируемый вдыхаемой микрофлорой провоспалительный статус эпителиальных клеток дыхательных путей находится под контролем противовоспалительных факторов, таких как: внутриклеточные ингибирующие метаболиты арахидоновой кислоты: липоксины, резольвины, простагландин E2, супрессоры цитокиновой сигнализации (suppressor of cytokine signalling, SOCS) 1 и 2, противовоспалительные

цитокины (IL-10, TGF- β), растворимые цитокиновые рецепторы и антагонисты рецепторов (sIL-1RN, sIL-13RA2, sTNFR2, IL-1ra) и многие др. Таким образом, при формировании воспалительной реакции эпителиальные клетки в ответ на высокий градиент провоспалительных цитокинов, по принципу отрицательной обратной связи, синтезируют широкий спектр противовоспалительных молекул, необходимых для ограничения и ослабления воспаления [42].

Характерными симптомами заболевания являются: заложенность носа, ринорея, першение и боль в горле, кашель, головная боль, общее недомогание, иногда подъем температуры [6, 30]. В условиях нормально функционирующей иммунной системы заболевание имеет тенденцию к самоограничению. Однако при развитии ОНФ часто отмечается присоединение бактериальной инфекции, особенно у детей и лиц с различными хроническими заболеваниями дыхательной системы, в виде: отитов, риносинуситов, бронхитов и пневмоний [21].

Основной целью лечения ОНФ является уменьшение неприятных ощущений в носоглотке, нормализация рино и фарингоскопической картины. Для этого локально применяют полоскание, смазывание, ингаляции или орошение полости носа и глотки различными антисептическими растворами. Ранее была показана эффективность интраназального рекомбинантного интерферона для профилактики простудных заболеваний [13]. Однако использование интерферонов для лечения ОНФ имеет противоречивые результаты, связанные, в ряде случаев, с развитием нежелательных реакций организма или с недостаточной клинической эффективностью препаратов. Между тем известно о стимуляции интерферонами образования клеточной РНК-зы, Мх-белка, которые вызывают деградацию вирусной РНК, что снижает репликацию вирусов [23, 24, 38] и повышает невосприимчивость клеток к вирусам [27, 31, 49, 50].

Для лечения ОНФ могут применяться иммуномодулирующие препараты микробного происхождения (Бронхомунал, Имудон, IRS-19 и др.) являющиеся лизатами бактерий, наиболее часто выделяемых при респираторных заболеваниях [8, 51]. Принцип действия этой группы препаратов, представляющих собой Pathogen associated molecular pattern (PAMP), основан на их способности активировать механизмы врожденного иммунитета, что важно для быстрого формирования защитных реакций организма при развитии острого воспаления.

Патоген-ассоциированные молекулярные структуры грибов – β -D-глюканы также активно взаимодействуют со специфическими рецептора-

ми врожденного иммунитета [45], что приводит к развитию широкого спектра реакций врожденного иммунитета: фагоцитозу, повышению уровня активных форм кислорода (АФК), продукции медиаторов иммунитета — цитокинов и интерферонов [37]. Исследование применения β -D-глюкана, выделенного из базидиального гриба *Pleurotus ostreatus* (Вешенка обыкновенная), в лечении острой инфекции простого герпеса 1-го типа [36] показало перспективы его клинического использования при вирусных инфекциях. Вместе с тем, неизвестна клиническая эффективность применения грибного β -D-глюкана при ОНФ вирусной этиологии, не изучено их влияние на концентрации в носовых секретах пациентов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

Целью исследования является проведение сравнительного анализа эффективности и целесообразности использования 2 препаратов иммуностимулирующего действия: рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ и средства, содержащего β -D-глюканы грибного происхождения для терапии ОНФ вирусной природы.

Материалы и методы

В исследование включены пациенты с ОНФ, находившиеся на лечении в клинике оториноларингологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург. Возраст пациентов варьировал в интервале от 18 до 55 лет. Всего обследовано 152 человека, из них: 38 — практически здоровые люди без признаков острой или хронической патологии лор-органов (группа 1); 114 — пациенты с ОНФ. Длительность заболевания на момент исследования была не более 2 дней. Больные предъявляли жалобы на недомогание, слабость, затруднение носового дыхания, выделения из носа, боли в горле. При риноскопии отмечали: гиперемию слизистой оболочки полости носа, отечность нижних носовых раковин, наличие слизистого отделяемого в общих носовых ходах. При фарингоскопии слизистая оболочка задней стенки глотки была гиперемизирована с наличием выраженных лимфоидных фолликулов.

Пациенты с ОНФ были разделены на следующие группы: 38 человек (группа 2) получали стандартную симптоматическую терапию, включающую: сосудосуживающие капли в нос, орошение полости носа 0,1%-ным раствором «Мирамистина», полоскание горла раствором «Фурацилина»; 40 человек (группа 3) получали интраназально рекомбинантный интерферон $\alpha 2b$ «Интерфераль» (РУ №000697/01 от 18.08.08, производства ГосНИИОЧБ, ФМБА, Санкт-Петербург, Россия) с концентрацией 10^5 МЕ (по 1 впры-

скиванию в каждый носовой ход 2 раза в день); 36 человек (группа 4) получали перорально средство «Глюкаферон» (Gluciferon)[®] (СГР RU.77.99.11.0003.R.001628.06.20 от 22.06.2020, производства ООО «НПФ «БИОС», Санкт-Петербург, Россия), в состав которого включены β -D-глюканы грибного происхождения (по 2 капсулы 2 раза в день) [5]. Продолжительность применения препаратов составила 7 дней.

Для идентификации этиологического фактора ОНФ использовали полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени. Взятие материала из полости носа (нижняя носовая раковина) и ротоглотки (небные миндалины, передняя и задняя небные дужки) проводили с помощью одноразового зонда с ватным тампоном в первые сутки госпитализации больных. Полученный для исследования материал помещали в пластиковые микропробирки, содержащие 3,0 мл универсальной транспортной среды для вирусов (СОРАН, Италия). Экстракцию нуклеиновых кислот (НК) патогенов проводили с применением набора реагентов «Рибо-преп», реакцию обратной транскрипции — с набором реагентов «Реверта-L».

Локальную реакцию организма на проводимую терапию оценивали по концентрации в носовых секретах 2 цитокинов семейства IL-1: IL-1 β и IL-1ra. Определение IL-1 β , IL-1ra проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (Россия). Носовой секрет получали путем введения в носовые ходы на 20 минут поролоновых тампонов. Пропитанные слизью тампоны помещали в специальные контейнеры и центрифугировали 15 минут при 1000 об/мин. Полученный носовой секрет замораживали до -18,0 °C и хранили до проведения исследований.

Для объективизации клинической эффективности проводимой терапии субъективные жалобы пациентов оценивали в баллах. Учитывали следующие симптомы: общее недомогание, боль в горле, характер выделений из носа, затруднение носового дыхания. Выраженность симптомов ранжировали следующим образом: 0 — отсутствие симптома; 1 — слабая выраженность симптома; 2 — умеренная выраженность симптома; 3 — сильная выраженность симптома; 4 — очень сильная выраженность симптома. Выраженность симптома «наличие отделяемого из носа» определял врач после осмотра пациента, также оценивали в баллах: 0 — отсутствие выделений; 1 — серозно-слизистые выделения; 2 — слизистые выделения с гнойными прожилками; 3 — обильные слизисто-гнойные выделения.

Анализ результатов исследования проводили с помощью методов описательной, параметри-

ческой и непараметрической статистики. Для определения статистической достоверности различий значений концентраций цитокинов использовали критерий Стьюдента для независимых выборок и непараметрический критерий Манна–Уитни. Вероятность $p < 0,05$ оценивали как достаточную для вывода о наличии статистически достоверных различий результатов, полученных в процессе исследования [4, 9].

Результаты

На рисунке 1 представлена гистограмма распределения респираторных вирусов, выделенных из носового секрета пациентов с ОНФ: риновирусы (РВ), вирусы гриппа А, В, парагриппа, респираторно-синцитиальные (РС) вирусы, коронавирусы, аденовирусы. Согласно данным представленным на рисунке 1 в носовых секретах пациентов с ОНФ в 60,0% случаев выявляли РВ, в основном, генотипа А. Долевое распределение других респираторных вирусов варьировало от 5,0 до 10,0%.

Важную роль в сохранении стабильного статуса слизистой носа играют сложные механизмы иммунной защиты. Одним из ведущих факторов гомеостаза слизистой в норме и формировании воспаления при патологии является семейство цитокинов IL-1 [7, 43]. Ранее нами было показано, что два представителя этого семейства — IL-1 β и IL-1 α — представляют собой функционально значимую пару, позволяющую оценивать динамику воспалительного процесса и эффективность проводимой терапии [1].

Поэтому на рисунке 2 представлено распределение группы практически здоровых людей (1) и группы пациентов с ОНФ до лечения (2) в проекции концентраций указанной пары цитокинов. Результаты распределения концентраций цитокинов в носовых секретах группы 1 демон-

стрируют, что значения концентраций IL-1 β находятся в интервале 20,0–25,0 пг/мл, значения концентраций IL-1 α — 1250,0–2500,0 пг/мл. При развитии ОНФ в носовых секретах пациентов (группа 2) происходит увеличение концентрации IL-1 β в интервале 30,0–70,0 пг/мл, а интервал концентраций IL-1 α практически не изменяется. Это означает, что при ОНФ вирусной этиологии в носовых секретах происходит повышение концентрации только провоспалительного цитокина, характеризующего развитие острого воспалительного процесса. По-видимому, IL-1 α наряду с другими гуморальными факторами врожденного иммунитета: sIgA, антимикробными пептидами, интерферонами и т.д., составляет первую линию защиты слизистой носа от постоянной микробной провокации. Между тем известно, что конститутивно цитокин IL-1 α синтезируется не только эпителиальными клетками верхних дыхательных путей, но также слизистой желудочно-кишечного тракта [14].

В таблице 1 представлена статистическая достоверность различий средних значений концентраций цитокинов IL-1 β ($p < 0,01$) между группами пациентов 1 и 2, а также отсутствие статистической достоверности различий средних значений концентраций цитокинов IL-1 α ($p > 0,05$) в указанных группах пациентов. Результаты расчетов подтверждают наличие эффекта повышения локальной концентрации провоспалительного цитокина на фоне незначительной продолжительности острого воспалительного процесса (2 дня).

Следует отметить, что в исследовании [50] была изучена динамика продукции цитокинов IL-1 β и IL-1 α в носовой полости добровольцев инфицированных РВ. Было показано, что синтез этих цитокинов в процессе формирования реакции местного иммунитета на РВ разобщен во времени. До заражения содержание IL-1 β в

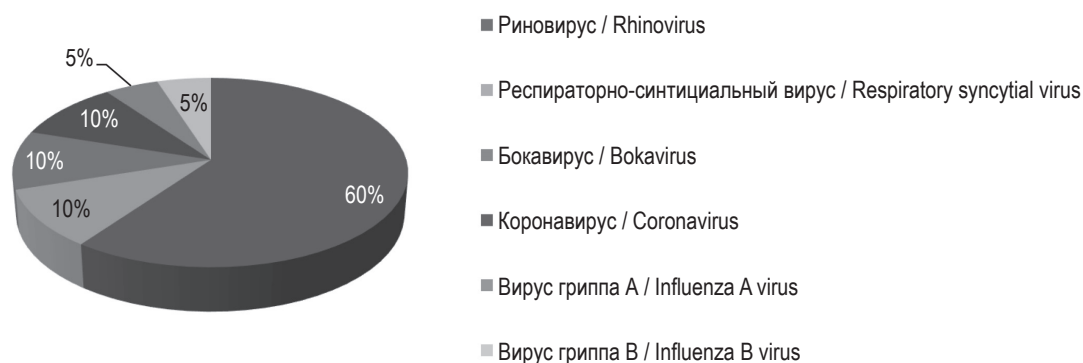


Рисунок 1. Гистограмма долевого (%) распределения вирусов в носовых секретах пациентов с ОНФ

Figure 1. Histogram of the fractional (%) distribution of viruses in nasal secretions of patients with ONF

ТАБЛИЦА 1. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ДОСТОВЕРНОСТЬ РАЗЛИЧИЙ СРЕДНИХ ЗНАЧЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЦИТОКИНОВ IL-1 β И IL-1ra МЕЖДУ ГРУППОЙ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ (1) И ГРУППОЙ ПАЦИЕНТОВ С ОНФ ДО ЛЕЧЕНИЯ (2)

TABLE 1. STATISTICAL SIGNIFICANCE OF THE DIFFERENCES IN THE MEAN VALUES OF THE CONCENTRATIONS OF THE CYTOKINES IL-1 β AND IL-1ra BETWEEN THE GROUP OF APPARENTLY HEALTHY PEOPLE (1) AND THE GROUP OF PATIENTS WITH ONF BEFORE TREATMENT (2)

Цитокины Cytokines	Группа 1 Group 1 M $\pm$ SD	Группа 2, Group 2 M $\pm$ SD	Значения Т-критерия Стьюдента Values of the Student's T test T; Tкр.; p	Значения U-критерия Манна-Уитни Values of the Mann- Whitney U test U; Z; p
IL-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/ml	21,28 $\pm$ 1,84	44,05 $\pm$ 9,12	-15,08; 2,02; p < 0,01	0,00; -1,50; p < 0,01
IL-1ra, пг/мл IL-1ra, pg/ml	1906,59 $\pm$ 352,77	1927,45 $\pm$ 361,35	-0,25; 1,99; p > 0,05	693,00; -0,301; p > 0,05

носовом секрете было минимальным, практически на уровне фона, что согласуется с результатами нашего исследования. После инфицирования РВ пик ответа наблюдался через 24 часа и к 48 часам уровень цитокина снижался до фоновых значений. Результаты нашего исследования демонстрируют, что на 2-е сутки в носовых секретах пациентов с ОНФ концентрации IL-1 β имеют статистические различия с концентрациями этого цитокина, наблюдаемого в группе практически здоровых людей. Продукция в носовых секретах цитокина IL-1ra у добровольцев, инфицированных РВ, достигала максимума к 72 часам и длилась несколько суток. Наши исследования, выполненные на 2-е сутки заболевания, не выявили значимых изменений концентраций этого цитокина.

На рисунке 3 представлено распределение групп пациентов с ОНФ и практически здоровых людей в проекции концентраций в носовых секретах цитокинов IL-1 β и IL-1ra в конце исследования (7-й день болезни). На этом рисунке показано, что проекция концентраций исследуемых цитокинов среди больных, получавших препараты иммуностропного действия (группы 3 и 4), совпадает с группой практически здоровых людей (группа 1). При этом у пациентов 2-й группы, лечение которых состояло только из средств стандартной терапии к концу наблюдения значимых изменений в динамике продукции цитокинов не наблюдали.

Для оценки динамики снижения выраженности клинических симптомов у пациентов с ОНФ на фоне стандартного лечения и средств иммуностропной терапии использовали регрессионный анализ, который позволил получить зависимо-

сти изменений средних значений симптомов пациентов в группах 2, 3 и 4 от продолжительности лечения (t, дни). Идентификацию параметров зависимостей (моделей), описывающих эффект снижения выраженности симптомов заболевания, проводили за счет минимизации суммы квадратов отклонений теоретических значений симптомов (баллы) от их эмпирических значений (баллы) для всех временных точек измерений.

Предварительные расчеты значений коэффициентов (X_i) для моделей, представляющих количественные изменения выраженности симптомов ОНФ (Y_i , «общее недомогание», «выделения из носа», «боль в горле», «затруднение носового дыхания») от продолжительности лечения (t) показали, что значения коэффициентов имеют статистическую достоверность (p < 0,05). Это позволило получить выражения следующего вида:

$Y_1 = 3,69 - 0,31t$ (1), где Y_1 – количественные изменения симптома «общее недомогание» на фоне применения стандартной терапии, баллы;

$Y_2 = 3,49 - 0,47t$ (2), где Y_2 – количественные изменения симптома «общее недомогание» на фоне применения интерферона, баллы;

$Y_3 = 3,47 - 0,51t$ (3), где Y_3 – количественные изменения симптома «общее недомогание» на фоне применения средства, содержащего β -D-глюкан, баллы;

$Y_4 = 1,21 + 0,96t - 0,12t^2$ (4), где Y_4 – количественные изменения симптома «выделения из носа» на фоне применения стандартной терапии, баллы;

$Y_5 = 1,26 + 0,35t - 0,06t^2$ (5), где Y_5 – количественные изменения симптома «выделения из носа» на фоне применения интерферона, баллы;

$Y_6 = 1,24 + 0,088t - 0,33t^2 + 0,02t^3$ (6), где Y_6 – количественные изменения симптома «выделения из носа» на фоне применения средства, содержащего β -D-глюкан, баллы;

$Y_7 = 3,354 \exp^{-0,102t}$ (7), где Y_7 – количественные изменения симптома «боль в горле» на фоне применения стандартной терапии, баллы;

$Y_8 = 3,290 \exp^{-0,227t}$ (8), где Y_8 – количественные изменения симптома «боль в горле» на фоне применения интерферона, баллы;

$Y_9 = 2,823 - 0,419t$ (9), где Y_9 – количественные изменения симптома «боль в горле» на фоне применения средства, содержащего β -D-глюкан, баллы;

$Y_{10} = 3,106 - 0,196t$ (10), где Y_{10} – выраженность симптома «затруднение носового дыхания» на фоне применения стандартной терапии, баллы;

$Y_{11} = 3,443 - 0,472t$ (11), где Y_{11} – выраженность симптома «затруднение носового дыхания» на фоне применения интерферона, баллы;

$Y_{12} = 3,119 - 0,463t$ (12), где Y_{12} – выраженность симптома «затруднение носового дыхания» на фоне применения средства, содержащего β -D-глюкан, баллы.

Коэффициенты детерминации (R^2) для выражений (1-12) составили: 96,76; 94,39; 90,73; 86,30; 84,04; 92,30; 99,75; 94,57; 90,98; 94,80; 97,25 и 91,54 соответственно, что демонстрирует приемлемую точность этих зависимостей для оценки количественных изменений указанных симптомов – величины (Y_i). Значение коэффициента Фишера для выражений (1-12) составили: 209,4; 117,7; 68,48; 18,9; 15,8; 19,9; 2451,7; 121,9; 70,6; 127,7; 247,2 и 75,7 соответственно, также статистически достоверны ($F > F_{кр.}; p < 0,05$), что демонстрирует достаточную информационную способность регрессионных выражений. Графическая интерпретация этих моделей представлена на рисунках 4, 5, 6, 7.

Результаты на рисунках 4-7 демонстрируют, что при использовании стандартных методов лечения ОНФ на 7-й день не происходит полного купирования клинических симптомов. Это означает, что стандартные средства терапии ОНФ в течение 1-й недели их использования практически не влияют на завершенность локального воспалительного процесса. Применение указанных иммуностимулирующих средств, имеющих различное происхождение и пути введения, показывает их сходное влияние на динамику течения ОНФ. При включении в схему лечения ОНФ рекомбинантного интерферона и средства, содержащего β -D-глюкан, наблюдается более быстрая динамика снижения симптомов заболевания, чем на фоне стандартной терапии, что подтверждает клиническую эффективность исследованных иммуностимулирующих препаратов.

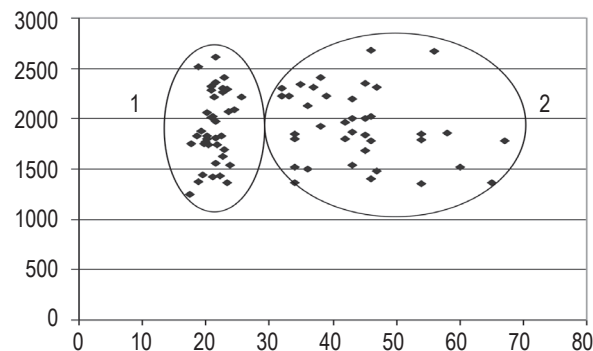


Рисунок 2. Распределение группы практически здоровых людей (1) и группы пациентов с ОНФ до лечения (2) в проекции концентраций функциональной пары цитокинов в носовых секретах

Примечание. Ось ординат – IL-1ra, пг/мл. Ось абсцисс – IL-1β, пг/мл.

Figure 2. Distribution of the group of practically healthy people (1) and groups of patients with ONF before treatment (2) in the projection of concentrations functional pair of cytokines in nasal secretions

Note. Y-axis, IL-1ra, pg/ml. Abscissa, IL-1β, pg/ml.

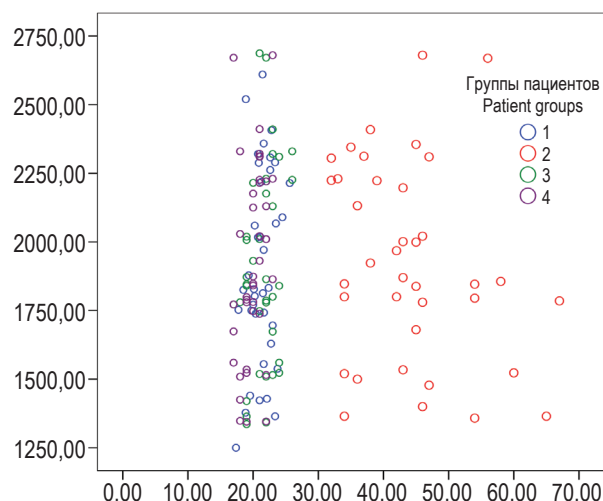


Рисунок 3. Распределение обследованных пациентов в группах (1, 2, 3, 4) в проекции концентраций функциональной пары цитокинов в носовых секретах

Примечание. Ось ординат – IL-1ra, пг/мл. Ось абсцисс – IL-1β, пг/мл. Обозначения групп: 1 – практически здоровые люди; 2 – пациенты с ОНФ на 7-й день стандартной терапии; 3 – пациенты с ОНФ на 7-й день терапии интерфероном; 4 – пациенты с ОНФ на 7-й день терапии средством, содержащим β -D-глюкан.

Figure 3. Distribution of examined patients in groups (1, 2, 3, 4) in the projection of the concentrations of a functional pair of cytokines in the nasal secretions

Note. Y-axis, IL-1ra, pg/ml. Abscissa, IL-1β, pg/ml. Group designations: 1, practically healthy people; 2, patients with ONF on the 7th day of standard therapy; 3, patients with ONF on the 7th day of therapy with interferon; 4, patients with ONF on the 7th day of therapy with a drug, containing β -D-glucan.

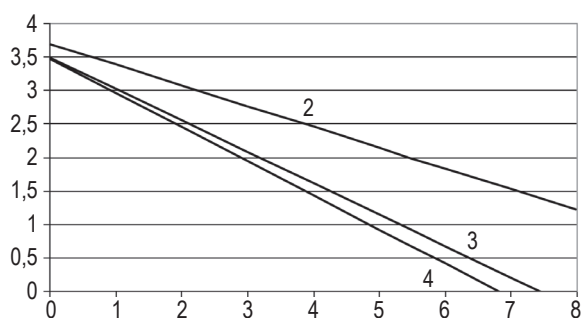


Рисунок 4. Изменения выраженности симптома: «общее недомогание» у пациентов ОНФ при применении: стандартной терапии (2); рекомбинантного интерферона (3), β -D-глюкана (4)

Примечание. Ось абсцисс – продолжительность применения препаратов, дни. Ось ординат – выраженность симптома, баллы.

Figure 4. Changes in the severity of the symptom: "general malaise" in patients with ONF when using: standard therapy (2); recombinant interferon (3), β -D-glucan (4)

Note. X-axis, duration of drug use, days. Y-axis, the severity of the symptom, points.

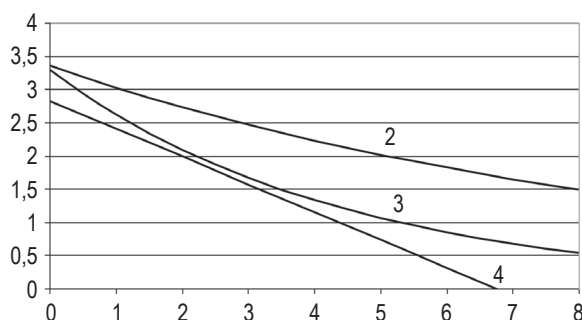


Рисунок 6. Изменения выраженности симптома «боль в горле» у пациентов ОНФ при применении: стандартной терапии (2); рекомбинантного интерферона (3), β -D-глюкана (4)

Примечание. См. примечание к рисунку 4.

Figure 6. Changes in the severity of the symptom "sore throat" in ONF patients when using: standard therapy (2); recombinant interferon (3), β -D-glucan (4)

Note. As for Figure 4.

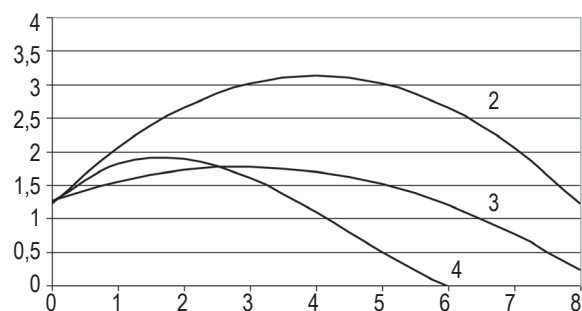


Рисунок 5. Изменения выраженности симптома «выделения из носа» у пациентов ОНФ при применении: стандартной терапии (2); рекомбинантного интерферона (3), β -D-глюкана (4)

Примечание. См. примечание к рисунку 4.

Figure 5. Changes in the severity of the symptom "nasal discharge" in ONF patients when using: standard therapy (2); recombinant interferon (3), β -D-glucan (4)

Note. As for Figure 4.

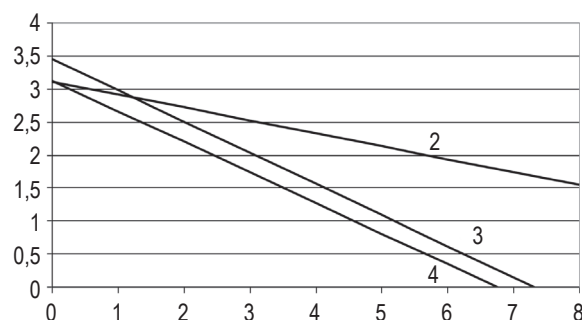


Рисунок 7. Изменение выраженности симптома «затруднение носового дыхания» у пациентов ОНФ при применении: стандартной терапии (2); рекомбинантного интерферона (3), β -D-глюкана (4)

Примечание. См. примечание к рисунку 4.

Figure 7. Change in the severity of the symptom "obstruction of the nasal respiration" in ONF patients when using: standard therapy (2); recombinant interferon (3), β -D-glucan (4)

Note. As for Figure 4.

Обсуждение

РВ инфекция является наиболее простой, прототипической формой вирусного поражения слизистых полости носа и глотки, которая, как правило, затрагивает небольшую часть эпителия и не распространяется в глубокие мукозальные слои,

благодаря чему эта форма воспаления способна к саморегуляции и быстрому разрешению [35, 40].

Однако анализ мРНК и белков в инфицированных эпителиоцитах показал, что реакция клеток на РВ избыточна, т.к. при этом активируется огромное количество генов, связанных с контролем клеточного цикла, регуляцией апоптоза,

миграцией клеток, а также восстановлением тканей [27, 48]. Поэтому частые простудные заболевания, особенно у детей, приводят к ремодулированию легочной ткани и развитию хронической обструктивной болезни легких, бронхиальной астмы, а у лиц с легочной патологией к обострениям [44]. Стандартная терапия ОНФ исчерпывается, как правило, местными средствами, направленными на смягчение симптомов заболевания. Вместе с тем, постоянно проводится поиск новых терапевтических подходов для лечения ОНФ, позволяющих не только влиять на вирусное воспаление, но и предотвращать развитие осложнений.

В представленном исследовании проведен сравнительный анализ эффективности использования для лечения ОНФ двух иммуностимулирующих препаратов, согласно своим фармакологическим свойствам, относящимся к «модификаторам биологических реакций» (МБР): интерферона $\alpha 2b$ «Интерфераль» и β -D-глюкана грибного происхождения, содержащегося в составе средства эндогенного (интерфероны, интерлейкины, рекомбинатные продукты и т.д.) или экзогенного происхождения (β -D-глюканы грибов, дрожжей) с плеотропным действием, регулирующие иммунный ответ организма, воздействующие на терапевтические мишени — важные для патогенеза заболевания [31, 36].

Несмотря на то, что интерфероны 1-го типа и, в частности, IFN $\alpha 2b$ имеют длительную историю применения для лечения и профилактики вирусных заболеваний сложилось мнение, что эти препараты хорошо зарекомендовали себя в терапии тяжелых хронических вирусных заболеваний, прежде всего гепатитов, но при сезонных ОРВИ они более эффективны в качестве профилактических средств [47]. Однако, с теоретической точки зрения, применение интерферонов 1-го типа для лечения простудных заболеваний, благодаря сочетанию их противовирусных, противовоспалительных и иммуномодулирующих свойств, может считаться идеальной терапевтической стратегией [45].

Тем не менее исследования, проведенные на добровольцах инфицированных РВ и больных ОНФ, не показали убедительными [12, 22, 34]. В большом Кокрейновском обзоре [47] приведены данные мета-анализа 230 исследований, в которых изучали профилактическое и лечебное действие интерферонов 1-го типа, индукторов интерферона и других противовирусных препаратов на экспериментальные и естественные простудные заболевания. Как следует из проведенного анализа, интраназальные интерфероны

обладают более высокой профилактической (от 21% до 27%), чем лечебной эффективностью (от 13,42% до 18,3%). По мнению большинства исследователей, значительное количество осложнений в виде носовых кровянистых выделений (до 5%, а при удлинении курса лечения до 20% и более) делают интерферонотерапию простудных заболеваний нежелательной [22]. Возможно в ранних исследованиях эти проявления были связаны с недостаточной очисткой рекомбинантного интерферона либо с неадекватно высокими дозами применяемых препаратов.

В нашем исследовании мы не наблюдали никакой негативной реакции при использовании IFN $\alpha 2b$. Пациенты с ОНФ получали дважды в день по 1 впрыскиванию в каждый носовой ход препарата «Интерфераль» в концентрации 10^5 МЕ, что на порядок ниже дозировок, использованных в приведенных выше исследованиях. В результате проведенного лечения наблюдали сокращение длительности заболевания без развития побочных осложнений.

На основании современных представлений о механизмах действия интерферонов на молекулярном уровне можно предположить, что экзогенные IFN I типа связываются с гетеродимерным рецептором, известным как рецептор IFN α/β receptor (IFNAR), который экспрессируется почти на всех типах клеток [11, 25]. В результате лигирования этих IFNAR, локализованных не только на инфицированных, но и незараженных клетках происходит активация транскрипционного сигнального пути Janus kinase 1 (JAK1) — signal transducer and activator of transcription 1,2 (STAT1,2) и образование комплекса IFN-stimulated gene factor 3 complex (ISGF3) и IRF9, вызывающего индукцию в ядре более четырехсот IFN-stimulated genes (ISGs), отвечающих за противовирусные и иммуномодулирующие свойства интерферона.

Таким образом, в очаге воспаления и окружающих тканях устанавливается так называемый «антивирусный статус», который характеризуется мощной противовирусной активностью, ограничивающей распространение инфекционных агентов и усилением врожденного иммунного ответа [15]. Возможно, что, с одной стороны, эта реакция клеток на IFN приводит к быстрому ограничению воспаления, а с другой стороны, предупреждает распространение патологического процесса в нижние дыхательные пути и близлежащие органы.

Нами было показано, что включение в схему лечения ОНФ иммуностимулирующего средства, содержащего грибной β -D-глюкан, по своим лечебным свойствам причисленный к МБР, также

сокращает длительность заболевания. На фоне применения этого препарата и интерферона динамика снижения выраженности клинических симптомов ОНФ имеет сходную направленность. Однако эти средства имеют различное происхождение и пути введения. β -D-глюканы — полисахаридные компоненты клеточных стенок дрожжей, грибов (патогенных и пищевых), злаков, водорослей и некоторых бактерий, представляющие собой уникальный класс биологически активных веществ с различными лечебными характеристиками. Наиболее известны из них дрожжевые и грибные биополимеры, состоящие из мономеров d-глюкозы, связанных 1,3 и 1,6 β -гликозидными связями, имеющие большой молекулярный вес и высокую степень разветвления [29].

Согласно современным представлениям [41] глюкановые компоненты дрожжей и грибов распознаются врожденной иммунной системой человека и животных, как архитипические структуры микроорганизмов, называемые “pathogen-associated molecular patterns” (PAMP). Для β -D-глюканов в организме существует сеть специфических врожденных рецепторов, локализованных на миелоидных клетках-эффекторах врожденного иммунитета: Dectin-1, CR3, лактозилсерамид, TLR 2, 4, 6, рецепторы-мусорщики (CD36, CD5). Взаимодействие с рецепторами инициирует каскад внутриклеточных сигнальных событий, приводящих к активации пути NF- κ B и транскрипции генов, кодирующих широкий спектр цитокинов и хемокинов. Однако иммунное реагирование при воздействии β -D-глюканов (про- или противовоспалительный ответ) зависит от состояния активации миелоидных клеток и микроокружения [36, 37, 39].

Важной особенностью реакции иммунной системы на β -D-глюканы грибов является формирование иммунного ответа по Th1- и Th17-типу, необходимого не только для эффективной противогрибковой, но и для противоопухолевой и противовирусной защиты. Особый интерес к β -D-глюканам возник в последнее десятилетие в связи с открытием феномена «тренированного иммунитета» — иммунологической памяти врожденного иммунитета [43]. Было показано, что грибные полисахариды, наряду с БЦЖ, вызывают модификацию гистонов и метилирование ДНК на уровне предшественников миелоцитов. Повышенный уровень триметилирования гистона H3 лизина 4 (H3K4me3) в промоторах провоспалительных цитокинов приводит к формированию усиленного воспалительного фенотипа эффекторов врожденного иммунитета: нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, что обеспечива-

ет более выраженный ответ на последующее заражение [37].

В связи с тем, что до сих пор не существует надежных средств борьбы с вирусами, поиск новых препаратов антивирусной направленности является одной из актуальнейших задач современной медицины. Особенно остро эта проблема встала в последнее время в связи с пандемией COVID-19. Противовирусные эффекты β -D-глюканов были продемонстрированы в многочисленных исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что эти свойства высших грибов связаны, главным образом, с полисахаридами, полисахаридно-белковыми комплексами, белками или низкомолекулярными вторичными метаболитами (терпенами, тритерпенами и др.). При этом биологически активные грибные производные обладают уникальным сочетанием как прямого влияния на репликацию вируса, так и косвенного, за счет усиления антигенпредставляющей способности дендритных клеток, продукции IFN γ и формирования адаптивного противовирусного иммунитета по Th1-типу [19].

В последнее время получено большое количество данных, свидетельствующих об эффективности экстрактов из грибов и дрожжей для профилактики сезонных заболеваний верхних дыхательных путей вирусного генеза. Так, в открытом исследовании [38], включавшем 215 детей младшего возраста, 3-месячный прием сиропа, в состав которого входил Плевран, нерастворимый полисахаридный комплекс из Вешенки обыкновенной, приводил к снижению на 50% частоты простудных заболеваний у 71,2% детей. Общее количество эпизодов инфекций в год снизилось с 8,9 до 3,6 ($p < 0,001$). В дальнейшем эти результаты были подтверждены двумя двойными-слепыми, плацебо-контролируемыми, многоцентровыми, рандомизированными исследованиями и на детях [32]. Применение препаратов β -D-глюканов из высших грибов среди взрослых: пациентов, находящихся на цитостатической терапии, больных диабетом, а также лиц с интенсивной физической нагрузкой (спортсменов-марафонцев, атлетов) также продемонстрировало их клиническую эффективность. В этих группах наблюдалось снижение частоты сезонных простудных заболеваний, а в случае заболевания отмечали более мягкое течение с быстрым выздоровлением [17, 26].

В нашем исследовании было показано, что лечение острой риновирусной инфекции, являющейся простой прототипической формой воспаления слизистой ВДП, препаратами по своим характеристикам относящихся к МБР, позволяет сократить длительность болезни на 2 дня. Учи-

тывая осложнения, к которым могут приводить частые простудные заболевания ВДП использование иммунопрепаратов логично и абсолютно оправдано.

Иммунотропные средства «Интерфераль» и «Глюкаферон» получают различными способами, но итог их иммуномодулирующего действия имеет сходные черты [38, 45]: это стимуляция эффекторных клеток врожденного иммунитета, сопровождающаяся продукцией различных цитокинов и хемокинов; влияние на функциональную активность и жизнеспособность натуральных киллеров, увеличение продукции этими клетками $IFN\gamma$; усиление процессов созревания и миграции дендритных клеток в лимфоузлы; стимуляция Т-клеточных реакций, формирование пула Т-клеток «памяти»; активация В-клеток, способствующая усиленной продукции антител, в том числе и нейтрализующих. По-видимому, эти процессы содействуют разрешению воспалительной реакции в более короткие сроки. Практически синхронное изменение симптомов ОНФ, представленное графиками 4-7, также служит подтверждением общих механизмов действия этих препаратов.

Мы не обнаружили выраженных различий в динамике изменений симптомов ОНФ в зависимости от пути введения этих препаратов. Возможно, что сходная реакция на вводимые препараты обеспечивается за счет оси «кишечник — легкие», влияющей на иммунитет слизистой ВДП при респираторных заболеваниях через дистальный отдел кишечника [46].

Несмотря на продемонстрированную нами эффективность $IFN\alpha 2b$ при лечении ОНФ вопрос об использовании интерферонов в терапии респираторных заболеваний остается открытым. Воспалительный процесс при данной патологии является простой, прототипической реакцией на РВ, ограниченной небольшим участком поражения и без массивного притока иммунных клеток. Возможно, что в данном случае экзогенный интерферон способствует быстрому разрешению воспаления. Однако при тяжелых вирусных инфекциях дыхательного тракта (грипп, SARS-CoV-1,2 и т.д.) включение интерферонов в

схемы лечения и профилактики активно обсуждается [34].

Проведенные нами ранее исследования показали, что включение средства «Глюкаферон» в схему лечения острого гнойного риносинусита способствует клиническому выздоровлению пациентов в более короткие сроки [2]. Применение этого средства для терапии ОНФ вирусной этиологии также обеспечивает развитие быстрой динамики снижения выраженности клинических симптомов заболевания и уменьшает в носовых секретах пациентов концентрации провоспалительного цитокина $IL-1\beta$. Поэтому его использование для терапии локальных воспалительных процессов ВДП целесообразно в качестве средства, обладающего патогенетической направленностью.

Если учитывать, что β -D-глюканы являются наиболее изученными МБР, снижающие количество сезонных простудных респираторных заболеваний за счет «тренировки врожденного иммунитета», то их применение при инфекционно-воспалительных заболеваниях типа ОНФ в качестве профилактических средств имеет широкие перспективы, т.к. грибные β -D-глюканы проявляют сильную и длительную защиту [16]. Однако продолжительность их профилактического применения требует дополнительных уточнений.

Выводы

1. Применение средств иммунотропной терапии в виде рекомбинантного $IFN\alpha 2b$ и средства, содержащего β -D-глюкан, для лечения ОНФ вирусной этиологии обеспечивают в течение 7 дней развитие быстрой динамики снижения выраженности клинических симптомов заболевания.

2. Применение этих средств на фоне развития простого прототипического воспаления носоглоточной области вирусной этиологии, не вызывает в носовых секретах пациентов избыточную продукцию провоспалительного цитокина $IL-1\beta$. Один из механизмов их лечебного действия связан со снижением концентрации провоспалительного цитокина $IL-1\beta$ в носовых секретах пациентов до уровня группы здоровых людей.

Список литературы / References

1. Безрукова Е.В., Воробейчиков Е.В., Конусова В.Г., Пашчинин А.Н., Симбирцев А.С. Оценка изменений концентраций цитокинов $IL-1\beta$ и $IL-1Ra$ в назальных секретах больных острым гнойным риносинуситом на фоне иммунокорригирующей терапии β -D-глюканами // Иммунология, 2020. Т. 41, № 3. С. 227-235. [Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Konusova V.G., Pashchinin A.N., Simbirtsev A.S. Evaluation of changes in

the concentrations of IL-1 β and IL-1Ra cytokines in nasal secretions of patients with acute purulent rhinosinusitis during immunocorrective therapy with β -D-glucans. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, Vol. 41, no. 3, pp. 227-235. (In Russ.)]

2. Безрукова Е.В., Воробейчиков Е.В., Конусова В.Г. Повышение эффективности антибактериальной терапии острого гнойного риносинусита // Российская оториноларингология, 2013. № 3 (64). С. 10-16. [Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Konusova V.G. Increasing the effectiveness of antibacterial therapy for acute purulent rhinosinusitis. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2013, no. 3 (64), pp. 10-16. (In Russ.)]

3. Белан Э.Б. Назофарингит: современные подходы к диагностике и лечению // Фарматека, 2020. Т. 27, № 1. С. 76-79. [Belan E.B. Nasopharyngitis: modern approaches to diagnosis and treatment. *Farmateka = Pharmateca*, 2020, Vol. 27, no. 1, pp. 76-79. (In Russ.)]

4. Боровиков В. СТАТИСТИКА: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. СПб.: Питер, 2001. 656 с. [Borovikov V. STATISTIKA: the art of data analysis on a computer. For professionals]. St. Petersburg: Peter, 2001. 656 p.

5. Патент РФ № 2450812. Средство для лечения инфекционных заболеваний дыхательного тракта «Глюкаферон», 2012. [RF patent No. 2450812. Means for the treatment of infectious diseases of the respiratory tract "Glukaferon", 2012.

6. Романцов М.Г., Мельникова И.Ю., Ершов Ф.И. Респираторные заболевания у часто болеющих детей. Руководство для врачей / Под ред. Ершова Ф.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 160 с. [Romantsov M.G., Melnikova I.Yu., Ershov F.I. Respiratory diseases in children who are often ill. A guide for doctors. Ed. F.I. Ershova]. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 160 p.

7. 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 human diseases]. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.

8. Справочник Видаль 2020. Лекарственные препараты в России / Под ред Толмачевой Е.А. Видаль Рус, 2020. [Directory Vidal 2020. Medicines in Russia. Ed. E.A. Tolmacheva]. Vidal Rus, 2020.

9. Субботина А.В., Гржибовский А.М. Описательная статистика и проверка нормальности распределения количественных данных // Экология человека, 2014. № 2. С. 51-57. [Subbotina A.V., Grzhibovsky A.M. Descriptive statistics and checking the normal distribution of quantitative data. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2014, no. 2, pp. 51-57. (In Russ.)]

10. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Пащенко М.В. Эпителиальные клетки дыхательных путей как равноправные участники врожденного иммунитета и потенциальные мишени для иммуотропных средств // Иммунология, 2020. № 2. С. 7-13. [Khaitov R.M., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. Epithelial cells of the respiratory tract as equal participants of innate immunity and potential targets for immunotropic drugs. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, Vol. 41, pp. 7-13. (In Russ.)]

11. Acosta P.L., Byrne A.B., Hijano D.R., Talarico L.B. Human Type I interferon antiviral effects in respiratory and reemerging viral infections. *J. Immunol. Res.*, 2020, no. 8, pp. 1372-1394.

12. Becker T.M., Durrani S.R., Bochkov Y.A., Devries M.K., Rajamanickam V., Jackson D.J. Exogenous interferons reduce rhinovirus replication and alter airway inflammatory responses. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2013, Vol. 111, no. 5, pp. 397-401. doi: 10.1016/j.anai.2013.07.029.

13. Bergman S.J., McKenzie C.F., Cathy Santanello C. Interferons as therapeutic agents for infectious diseases. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 2011, Vol. 25, no. 4, pp. 819-834.

14. Casini-Raggi V., Kam L., Chong Y.J.T., Fiocchi C., Pizarro T.T., Cominelli F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 154, pp. 24-34.

15. Crosse K.M., Monson E.A., Beard M.R., Helbig K.J. Interferon-stimulated genes as enhancers of antiviral innate immune signaling. *J. Innate Immun.*, 2018, Vol. 10, no. 2, pp. 85-93.

16. Dumas A., Bernard L., Yannick Poquet Y., Lugo-Villarino G. The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell. Microbiol.*, 2018, Vol. 20, no. 12, e12966. doi: 10.1111/cmi.12966.

17. Esposito S., Jones M.J., Feleszko W., Ortega Martell J.A., et al. Prevention of new respiratory episodes in children with recurrent respiratory infections: an expert consensus statement from the World Association of Infectious Diseases and Immunological Disorders (WAidid). *Microorganisms*, 2020, Vol. 8, no. 11, 1810. doi: 10.3390/microorganisms8111810.

18. Ganjian H., Rajput C., Elzoheiry M., Sajjan U. Rhinovirus and innate immune function of airway epithelium. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2020, no. 10, pp. 277-292.

19. Garcia-Valtanen P., Guzman-Genuino R.M., Williams D.L., Hayball J.D., Diener K.R. Evaluation of trained immunity by β -1, 3 (D)-glucan on murine monocytes *in vitro* and duration of response *in vivo*. *Immunol. Cell Biol.*, 2017, Vol. 95, no. 7, pp. 601-610.

20. Greve J.M., Davis G., Meyer A.M., Forte C.P., Yost S.C., Marlors C.W., Kamarck M.E., McClelland A. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*, 1989, Vol. 56, pp. 839-847.

21. Hallstrand T.S., Hackett T.L., Altemeier W.A., Matute-Bello G., Hansbro Ph.M., Knight D.A. Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. *Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 151, pp. 1-15.
22. Hayden F.G., Gwaltney J.M. Jr. Intranasal Interferon- α 2 treatment of experimental rhinoviral colds infection. *J. Infect. Dis.*, 1984, Vol. 150, pp. 174-180.
23. Hayden F.G., Kaiser D.L., Albrecht J.K. Intranasal recombinant alpha-2b interferon treatment of naturally occurring common colds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, Vol. 32, no. 2, pp. 224-230.
24. Jacobs S.E., Lamson D.M., George K.S., Walsh T.J. Human rhinoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, Vol. 26, no. 1, pp. 135-162.
25. Jefferson T.O., D Tyrrell D.. WITHDRAWN: Antivirals for the common cold. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2007, Vol. 3, CD002743. doi: 10.1002/14651858.CD002743.
26. Jesenak M., Urbancikova I., Banovcin P. Respiratory tract infections and the role of biologically active polysaccharides in their management and prevention. *Nutrients*, 2017, Vol. 9, 779. doi: 10.3390/nu9070779.
27. Johnston N.W., Olsson M., Edsbäcker S., Gerhardsson de Verdier M. Colds as predictors of the onset and severity of COPD exacerbations. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon Dis.*, 2017, no. 12, pp. 839-848.
28. Kaul P., Biagioli M.C., Singh I., Turner R. Rhinovirus-induced oxidative stress and interleukin-8 elaboration involves p47-phox but is independent of attachment to intercellular adhesion molecule-1 and viral replication. *Infect. Dis.*, 2000, Vol. 18, no. 1 (6), pp. 1885-1890.
29. Konusova V., Friou M., Vorobeychikov E. Simbirtsev A. Immunotropic effect of oyster mushroom betaglucans, in combination with birch tree triterpene betulin, and beastim, dipeptide of gamma-D-glutamyl-tryptophan. E3S Web of Conferences 215, 05004 (2020) BFT-2020. doi: 10.1051/e3sconf/202021505004.
30. Lee W.M., Lemanske R.F. Jr., Evans M.D., Vang F., Pappas T., et al. Human rhinovirus species and season of infection determine illness severity. *Am J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2012, Vol. 186, no. 9, pp. 886-891.
31. Leung M., Liu C., Koon J., Fung K. Biological response modifiers: interferons, interleukins, recombinant products, liposomal products. 1998, Vol. 28 (2), pp. 269-295.
32. Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Jülich W.-D. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2005, Vol. 2, no. 3, pp. 285-299.
33. Looi K., Troy N.M., Garratt L.W., Iosifidis T., Bosco A., Buckley A.G., Ling Kak-Ming, Martinovich K.M., Kicic-Starcevic E., Shaw N.C., Sutanto E.N., Zosky G.R., Rigby P.J., Larcombe A.N., Knight D.A., Kicic A., Stick S.M. Effect of human rhinovirus infection on airway epithelium tight junction protein disassembly and transepithelial permeability. *Exp. Lung. Res.*, 2016, Vol. 42, no. 7, pp. 380-395.
34. Major J., Crotta S., Llorian M., McCabe T.M., Gad H.H., Priestnall S.L., Hartmann R., Wack A. Type I and III interferons disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection. *Science*, 2020, Vol. 7, no. 369 (6504), pp. 712-717.
35. Miura T.A. Respiratory epithelial cells as master communicators during viral infections. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.*, 2019, Vol. 6, no. 1, pp. 10-17.
36. Mullangi P.K., Shahani L., Koirala J. Role of biological response modifiers in pathogenesis of infectious diseases. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 2011, Vol. 25, no. 4, pp. 733-754.
37. Municio C., Alvarez Y., Montero O., Hugo E., e.a. The response of human macrophages to β -glucans depends on the inflammatory milieu. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 4, e62016. doi: 10.1371/journal.pone.0062016.
38. Netea M.G., Joosten L.A.B., Latz E., Mills K.H.G., Natoli G., Stunnenberg H.G., O'Neill L.A.J., Xavier R.J. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 2016, Vol. 352, aaf1098. doi: 10.1126/science.aaf1098.
39. Oloke J.K., Adebayo E.A. Effectiveness of immunotherapies from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in the management of immunocompromised patients. *Int. J. Immunol.*, 2015, no. 3, pp. 8-20.
40. Palmenberg A.C., Gern J.E. Classification and evolution of human rhinoviruses. *Methods Mol. Biol.*, 2015, Vol. 1221, pp. 1-10.
41. Rajan D., McCracken C.E., Kopleman H.B., Shuya Y. Kyu, Eun-Hyung Lee F., Xiaoyan Lu, Anderson L.J. Human rhinovirus induced cytokine/chemokine responses in human airway epithelial and immune cells. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 12, e114322. doi: 10.1371/journal.pone.0114322.
42. Rollinger J.M., Schmidtke M. The human rhinovirus: human-pathological impact, mechanisms of antirhinoviral agents, and strategies for their discovery. *Med. Res. Rev.*, 2011, Vol. 31, no. 1, pp. 42-92.
43. Rosas M., Liddiard K., Kimberg M., Faro-Trindade I. The induction of inflammation by dectin-1 *in vivo* is dependent on myeloid cell programming and the progression of phagocytosis. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 1, Vol. 181, no. 5, pp. 3549-3557.
44. Slater L., Bartlett N.W., Haas J.J., Zhu J., Message S.D., Walton R.P. Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium. *PLoS Pathog.*, 2010, Vol. 6, no. 11, e1001178. doi: 10.1371/journal.ppat.1001178.
45. Stanifer M.L., Guo C., Doldan P., Boulant S. Importance of type I and III interferons at respiratory and intestinal barrier surfaces. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 608645. doi: 10.3389/fimmu.2020.608645.

46. Talbott S., Talbott J. Effect of BETA 1,3/1,6 glucan on upper respiratory tract infection symptoms and mood state in marathon athletes. *J. Sport Sci. Med.*, 2009, Vol. 8, no. 4, pp. 509-515.
47. Teijaro J.R. Type I interferons in viral control and immune regulation. *Curr. Opin. Virol.*, 2016 Vol. 16, pp. 31-40.
48. Triantafilou K., Vakakis E., Richer E.A.J., Evans G.L., Villiers J.P., Triantafilou M. Human rhinovirus recognition in non-immune cells is mediated by Toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergetic pro-inflammatory immune response. *Virulence*, 2011, Vol. 2, no. 1, pp. 22-29.
49. Veerati P.C., Troy N.M., Reid A.T., Li N.F., Nichol K.S., Kaur P., Maltby S., Wark P.A.B., Knight D.A., Bosco A., Grainge C.L., Bartlett N.W. Airway epithelial cell immunity is delayed during rhinovirus infection in asthma and COPD. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 974. doi: 10.3389/fimmu.2020.00974.
50. Yoon H.J., Zhu Z., Gwaltney J.M., Elias J.A. Rhinovirus regulation of IL-1 receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*: a potential mechanism of symptom resolution. *J. Immunol.*, 15, 1999, Vol. 162, no. 2, pp. 7461-7469.
51. Zhao S., Gao Q., Rong C., Wang S., Zhao Z., Liu Y., Xu J. Immunomodulatory effects of edible and medicinal mushrooms and their bioactive immunoregulatory products. *J. Fungi (Basel)*, 2020, Vol. 6, no. 4, 269. doi: 10.3390/jof6040269.

Авторы:

Безрукова Е.В. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Воробейчиков Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник ООО «Полифарм», Санкт-Петербург, Россия

Конусова В.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник ООО «Полифарм», Санкт-Петербург, Россия

Сосунов А.В. — к.м.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Шамтыян М.М. — к.т.н., заведующий кафедрой технологии микробиологического синтеза ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Россия

Артюшкин С.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оториноларингологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, главный научный сотрудник ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Bezrukova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otolaryngology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Vorobeychikov E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Polifarm LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Konusova V.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Polifarm LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Sosunov A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Shamtsyan M.M., PhD (Technics), Head, Department of Technology of Microbiological Synthesis, St. Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, Russian Federation

Artyushkin S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, ENT Department, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Chief Research Associate, State Research Institute of High Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 17.03.2021

Отправлена на доработку 21.04.2021

Принята к печати 26.04.2021

Received 17.03.2021

Revision received 21.04.2021

Accepted 26.04.2021

ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК НЕЙТРОФИЛАМИ И МОНОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ: ИЗУЧЕНИЕ НОВОГО ЦИТРУЛЛИНСОДЕРЖАЩЕГО АУТОАНТИГЕНА

**Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Спицина С.С.,
Мамус М.А.**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Резюме. Учитывая значение, которое придается антицитруллиновым антителам (АЦЦП) в ауто-иммунном ответе при ревматоидном артрите (РА), особый интерес представляет поиск субклеточных структур, которые включают наиболее типичные для РА антигены в одном компартменте и подвержены систематическому цитруллинированию. Наиболее вероятным кандидатом на роль таких структур можно рассматривать внеклеточные ловушки нейтрофилов (NET) и моноцитов (ЕТ). Цель — оценить способность нейтрофилов и моноцитов периферической крови к спонтанному и индуцированному образованию внеклеточных ловушек у больных РА. В исследование были включены 32 больных РА и 30 практически здоровых лиц, составивших референтную группу. Выделение нейтрофилов и моноцитов периферической крови производили с помощью одноэтапного центрифугирования в тройном ступенчатом градиенте фиколла-амидотризоата. Качественный состав лейкоцитарных фракций оценивали микроскопически, их жизнеспособность — с использованием трипанового синего, неспецифическую активацию клеток — по тесту с нитросиним тетразолием. Индукцию образования внеклеточных ловушек нейтрофилами *in vitro* выполняли с использованием форбол-12-миристат-13-ацетата, моноцитами — при помощи пирогенала. Оценка спонтанного и индуцированного образования внеклеточных ловушек производили методом люминесцентной микроскопии.

Полученные клеточные фракции содержали низкий процент примесей и высокую долю жизнеспособных клеток, находящихся в неактивированном состоянии. Обнаружено, что у больных РА средняя доля спонтанного образования NET и ЕТ выше по сравнению с контрольной группой. При этом частота ловушкообразования для нейтрофилов больных РА, позитивных по АЦЦП, имела тенденцию к повышению по сравнению с образцами АЦЦП-негативных пациентов. Для моноцитов существенного различия между данными подгруппами не зафиксировано. Морфология внеклеточных ловушек при люминесцентной микроскопии нейтрофилов и моноцитов здоровых лиц и больных РА

Адрес для переписки:

Бедина Светлана Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского»
400138, Россия, г. Волгоград, ул. им. Землячки, 76.
Тел.: 8 (8442) 78-90-95.
E-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru

Address for correspondence:

Bedina Svetlana A.
A. Zborovsky Institute of Clinical and Experimental
Rheumatology
400138, Russian Federation, Volgograd, Zemlyachki str., 76.
Phone: 7 (8442) 78-90-95.
E-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru

Образец цитирования:

С.А. Бедина, Е.Э. Мозговая, А.С. Трофименко,
С.С. Спицина, М.А. Мамус «Образование внеклеточных
ловушек нейтрофилами и моноцитами периферической
крови больных ревматоидным артритом: изучение
нового цитруллинсодержащего аутоантигена» //
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1165-1170.
doi: 10.15789/1563-0625-FOE-2301
© Бедина С.А. и соавт., 2021

For citation:

S.A. Bedina, E.E. Mozgovaya, A.S. Trofimenko, S.S. Spitsyna,
M.A. Mamus "Formation of extracellular traps by circulating
neutrophils and monocytes in rheumatoid arthritis patients:
a study of new citrullinated autoantigen", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5,
pp. 1165-1170.
doi: 10.15789/1563-0625-FOE-2301
DOI: 10.15789/1563-0625-FOE-2301

не демонстрировала существенных межиндивидуальных различий. Средняя доля индуцированного ловушкообразования при РА была значительно выше в сравнении с референтной группой. Уровень включения миелопероксидазы в ЕТ был существенно ниже по сравнению с NET. Полученные нами данные дают основание рассматривать NET как возможный источник цитруллинированных аутоантигенов, участвующих в продукции аутоантител и стимуляции воспалительных аутоиммунных реакций при РА. В то же время роль ЕТ в этом процессе выражена в меньшей степени.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, нейтрофилы, моноциты, внеклеточные ловушки нейтрофилов, внеклеточные ловушки моноцитов, NETоз, ETоз

FORMATION OF EXTRACELLULAR TRAPS BY CIRCULATING NEUTROPHILS AND MONOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS: A STUDY OF NEW CITRULLINATED AUTOANTIGEN

Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Spitsyna S.S., Mamus M.A.

A. Zborovsky Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Abstract. Detection of subcellular structures containing typical citrullinated rheumatoid autoantigens in a single compartment presents a special interest, due to importance of anticitrulline autoantibodies for the autoimmune response in RA. Neutrophil and monocyte extracellular traps (NETs and ETs, respectively) may be considered such candidate structures. Our objective was to assess ability of blood neutrophils and monocytes from RA patients to generate NETs and ETs spontaneously and after *in vitro* induction.

32 patients with verified RA and 30 healthy volunteers as controls were included into the study. Circulating neutrophils and monocytes were isolated with one-step density gradient centrifugation using three layers of ficoll-amidotrizoate gradient. Composition of isolated cellular fractions, their viability, and non-specific activation were evaluated microscopically using Trypan Blue exclusion test, as well as Nitro-Blue Tetrazolium test. The NETs were induced by phorbol-12-myristate-13-acetate, and ETs by bacterial LPS. Spontaneous and induced formation of extracellular traps was assessed using fluorescence microscopy. Neutrophil and monocyte fractions contained minute percentages of impurities and low extents of activated and dead cells. Spontaneous NET and ET formation in RA patients was significantly increased comparing to healthy controls. Neutrophils from ACPA-positive RA patients were found to have higher frequency of NET formation, compared to ACPA-negative RA patients. The monocytes did not demonstrate such differences between these subgroups. There were no substantial morphological differences in NETs and ETs patterns between the individuals from both groups. Induced extracellular trap production in RA was significantly higher compared to healthy controls. The level of myeloperoxidase-specific fluorescence in ETs was considerably lower than in NETs. NETs could probably be considered as a source of citrulline autoantigen participating in autoantibody production and stimulation of inflammatory autoimmune responses in RA, whereas ETs may play less important role in this process.

Keywords: rheumatoid arthritis, neutrophils, monocytes, NETs, monocyte extracellular traps, NETosis, ETosis

Введение

Ревматоидный артрит (РА) является распространенным системным аутоиммунным заболеванием, характеризующимся синовиальной гиперплазией, хроническим воспалением суставов и внесуставными проявлениями. В последние десятилетия прослеживается тенденция к неуклонному росту распространенности заболевания.

Глобальная распространенность болезни среди взрослого населения составляет 0,4-1,3% [10], заболеваемость при этом равна 20-50 случаев на 100 000 в год [7].

Несмотря на негативный эпидемиологический тренд, в последние десятилетия достигнуты определенные успехи в раскрытии патогенетических процессов РА. Однако механизмы инициирования РА и прогрессирования на ранних

стадиях остаются не раскрытыми [4]. При этом особое внимание исследователей привлекают процессы, лежащие в основе индукции аутоиммунных реакций, направленных к антигенам хрящевой ткани, синовиальной оболочки и их эпитолам, в том числе к цитруллинированным вариантам коллагена II типа, гистонов, фибриногена, фибронектина, виментина и α -енолазы [9]. Учитывая значение, которое придается антицитруллиновым антителам, особый интерес представляет поиск среди клеточных и внеклеточных антигенов таких молекул-индукторов, которые удовлетворяли бы следующим условиям: систематическое обнаружение в ревматоидном синовии, объединение типичных для РА антигенов в одном компартменте, подверженность систематическому цитруллинированию в ходе аутоиммунного воспаления. В качестве одного из кандидатов на роль таких структур можно рассматривать внеклеточные ловушки нейтрофилов (англ. neutrophil extracellular traps, NET).

Формирование NET, обозначаемое как “NETоз”, представляет собой механизм элиминации крупных антигенных структур, размер которых превышает возможности фагоцитоза [6]. Каркас этой структуры составляют хроматиновые нити, на которых фиксированы молекулы лизосомального, гранулярного, цитоплазматического происхождения, а также элементы цитоскелета (виментин, актин, миозин, филамин). Значительная часть белков в составе NET содержит цитруллин, который образуется путем деаминации аргинина. Образование внеклеточных ловушек (ВЛ) обнаружено также и у базофилов, эозинофилов, плазматитоидных дендритных клеток, тучных клеток и моноцитов/макрофагов; для этого процесса предложены обобщенные термины “ЕТ” (англ. extracellular traps) и “ЕТоз” [8]. Процесс образования ВЛ мононуклеарными фагоцитами, несмотря на их потенциально более важную роль в развитии аутоиммунных реакций, изучен недостаточно. Недавнее исследование описывает ЕТоз моноцитов крови человека, связанный с продукцией активных форм кислорода и цитруллинированием гистонов [8]. Структурно моноцитарные ловушки, так же как и нейтрофильные, состоят из ДНК и гистонов, однако в процессе формирования ловушек моноцитами миелопероксидаза (МПО) играет менее значимую роль [8].

Посттрансляционные модификации молекул, входящих в состав NET, являются потенциальными источниками цитруллинированных неоэпитопов, в том числе цитруллинированного виментина, гистонов, α -енолазы. Процессинг цитруллинированных белков NET в комплексе с экзогенными молекулами представляется весьма

перспективным кандидатом на роль источника аутоантигенов, характерных для РА. На данный момент опубликованы лишь единичные сообщения, посвященные NETозу при РА [5], в то время как информация об образовании ЕТ у больных РА на данный момент в открытых источниках не опубликована.

Цель исследования — оценить способность нейтрофилов и моноцитов периферической крови к спонтанному и индуцированному образованию внеклеточных ловушек у больных РА.

Материалы и методы

Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1996 г., пересмотренными в 2013 г. Работа одобрена комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского» (протокол № 1 от 14 ноября 2016 г.). В основную группу включили 32 пациента (23 женщины и 9 мужчин; средний возраст — $52,1 \pm 3,8$ лет, средняя продолжительность заболевания — $1,4 \pm 0,6$ лет) ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского» и ревматологического отделения ГУЗ ГКБСМП № 25 г. Волгограда. Критерии включения в исследование: возраст старше 18 лет, наличие подписанного информированного согласия, верифицированный диагноз РА по общепринятым критериям [3], длительность заболевания не более 2 лет, активность РА не более 2,6 балла по шкале DAS28 [11]. В референтную группу вошли 30 практически здоровых лиц (21 женщина, 9 мужчин), сопоставимых по среднему возрасту с основной группой.

Выделение нейтрофилов и моноцитов из периферической венозной крови здоровых и больных РА производили с помощью одноэтапного центрифугирования со скоростью 700 г в тройном ступенчатом градиенте фиколла-амидотризоата: верхний слой — с плотностью 1068 кг/м^3 , средний слой — с плотностью 1080 кг/м^3 , нижний слой — с плотностью 1090 кг/м^3 при $20 \pm 1^\circ \text{C}$ в течение 15 мин. Все градиенты имели расчетную осмолярность в пределах 280–320 мОсм/л, при pH 7,2–7,4. Время от момента забора крови до выполнения первого этапа протокола составляло не более 30 минут. Для последующего анализа отбирали клеточные фракции из верхней (моноциты) и из нижней (нейтрофилы) интерфаз, после чего двукратно отмывали клетки от градиента и тромбоцитов в стандартном фосфатно-солевом буферном растворе, центрифугируя их 10 мин при 3000 об/мин в силиконированных пробирках.

Качественный состав лейкоцитарных фракций оценивали микроскопически, их жизнеспособность — с использованием трипанового си-

него, неспецифическую активацию клеток — по тесту с нитросиним тетразолием. Индукцию образования нейтрофилами ВЛ *in vitro* выполняли с использованием форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА), для моноцитов применяли пирогенал [1, 2]. Оценку спонтанного и индуцированного образования ВЛ производили при помощи люминесцентной микроскопии по ранее описанным методам [1, 2]. Результаты микроскопии выражали в процентах как относительное количество ловушкообразующих клеток на 100 сосчитанных лейкоцитов при визуализации не менее 200 клеток в образце. Определение антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) проводилось методом ИФА с помощью коммерческих наборов (Orgentec Diagnostika GmbH, Германия), согласно инструкции производителя и с использованием указанного в последней референтного интервала (до 20 ед/мл).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Statistica 10.0. Результаты выражали как среднее арифметическое (95%-ный доверительный интервал (ДИ)). Для качественных показателей доверительный интервал рассчитывали при помощи биномиального метода. Верхние границы ДИ, превышающие 100%, усекали до 100%. Для анализа различий качественных показателей применяли критерий Макнемара или точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате применения разработанного нами метода были получены клеточные фракции

с низким процентом примесей и с высокой долей жизнеспособных клеток, находящихся в не активированном состоянии. В референтной группе нейтрофильная фракция включала менее 3% примесей, преимущественно в виде эозинофилов эритроцитов в отдельных образцах. В моноцитарной фракции примесь лимфоцитов и тромбоцитов находилась в пределах 2% (табл. 1). По сравнению с контрольной группой, у больных РА наблюдалось незначительное увеличение выхода нейтрофилов одновременно с увеличением доли клеточных примесей и уменьшение выхода моноцитов на фоне некоторого повышения чистоты моноцитарной фракции (табл. 2). Снижение чистоты нейтрофильной фракции происходило в основном за счет эритроцитов в образцах крови, взятой у больных с выраженной анемией, которая является одним из характерных внесуставных проявлений заболевания. Этот феномен, вероятно, объясняется искажением седиментационных характеристик эритроцитов в результате снижения их относительной плотности. Однако, при увеличении скорости центрифугирования до 700 g, выполнение последующих этапов протокола остается возможным даже при незначительном снижении чистоты клеточных фракций у таких больных. По результатам теста с нитросиним тетразолием показатели жизнеспособности и неспецифической активации нейтрофилов и моноцитов у больных РА и у лиц референтной группы практически не отличались.

У больных РА средняя доля спонтанного образования ловушек нейтрофилами и моноцитами была существенно выше по сравнению с контролем (табл. 2). При этом частота спонтанного

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ И МОНОЦИТАРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ, М (95% ДИ)

TABLE 1. MAIN PARAMETERS OF NEUTROPHILIC AND MONOCYTIC FRACTIONS IN HEALTHY INDIVIDUALS, M (95% CI)

Параметр Parameter	Нейтрофилы Neutrophils	Моноциты Monocytes
Средний выход выделенных клеток, % Mean yield of isolated cells, %	53,5 (46,4-60,6)	71,3 (63,3-79,3)
Средняя чистота клеточных фракций, % Mean purity of cell fractions, %	97,5 (90,3-100,0)	98,1 (88,0-100,0)
Средняя доля жизнеспособных клеток, % Mean percentage of cell viability, %	94,9 (90,2-99,6)	91,5 (86,5-96,5)
Средняя доля неактивированных клеток, % Mean percentage of cells not activated, %	94,2 (91,1-97,3)	88,2 (82,4-94,0)
Средняя доля спонтанного образования ЕТ, % Mean percentage of spontaneous ET formation, %	3,2 (2,0-4,4)	5,4 (4,0-6,8)
Средняя доля индуцированного образования ЕТ, % Mean percentage of induced ET formation, %	11,6 (9,5-13,7)	17,3 (15,5-19,1)

ТАБЛИЦА 2. ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ И МОНОЦИТАРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ У БОЛЬНЫХ РА, М (95% ДИ)

TABLE 2. MAIN PARAMETERS OF NEUTROPHILIC AND MONOCYTIC FRACTIONS IN RA PATIENTS, M (95% CI)

Параметр Parameter	Нейтрофилы Neutrophils	Моноциты Monocytes
Средний выход выделенных клеток, % Mean yield of isolated cells, %	57,1 (52,2-62,0)	66,5 (60,4-72,6)
Средняя чистота клеточных фракций, % Mean purity of cell fractions, %	93,1 (87,0-99,2)	98,4 (92,0-100,0)
Средняя доля жизнеспособных клеток, % Mean percentage of cell viability, %	95,4 (90,3-100,0)	93,4 (88,6-98,2)
Средняя доля неактивированных клеток, % Mean percentage of cells not activated, %	92,3 (83,8-100,0)	91,0 (83,4-98,1)
Средняя доля спонтанного образования ET, % Mean percentage of spontaneous ET formation, %	7,7 (5,9-9,5)	8,2 (6,9-9,5)
Средняя доля индуцированного образования ET, % Mean percentage of induced ET formation, %	24,4 (17,6-31,2)	27,2 (21,5-32,9)

ловушкообразования для нейтрофилов больных РА, позитивных по АЦЦП, имела тенденцию к повышению по сравнению с образцами пациентов, отрицательных по АЦЦП. Для моноцитов существенного различия между данными подгруппами не зафиксировано. АЦЦП были выявлены у 20 (62,5%) больных РА.

Применение индукторов ловушкообразования сопровождалось увеличением доли нейтрофилов и моноцитов, образующих ловушки, при этом средняя доля индуцированного ловушкообразования при РА была значительно выше в сравнении с референтной группой (табл. 2). Морфология ВЛ при люминесцентной микроскопии нейтрофилов и моноцитов здоровых лиц и больных РА не демонстрировала существенных межиндивидуальных различий в отношении размеров, формы и содержания ДНК. В целом интенсивность флуоресцентного сигнала анти-МПО в ET была существенно ниже по сравнению с NET как у здоровых лиц, так и у больных РА, что можно отнести на счет существенного различия внутриклеточной концентрации МПО ввиду функциональной специализации данных разновидностей лейкоцитов. Это согласуется с опубликованными данными исследования, демонстрирующего, что состав моноцитарных ВЛ аналогичен составу NETs, но образование ETs

находится в меньшей зависимости от активности МПО, по сравнению с образованием ВЛ нейтрофилами [8]. Выявленная нами взаимосвязь между интенсивностью NETоза и наличием АЦЦП дает основание рассматривать NET как возможный источник цитруллинированных аутоантигенов, участвующих в продукции аутоантител и стимуляции воспалительных аутоиммунных реакции при РА. ET, вероятно, играют менее важную роль в этом процессе.

Заключение

Таким образом, в нашей работе показан существенный рост спонтанного и индуцированного образования ВЛ циркулирующими нейтрофилами и моноцитами периферической крови больных РА. Кроме того, обнаружено, что клетки, полученные от АЦЦП-позитивных больных РА, отличаются интенсификацией NETоза. В целом полученные данные свидетельствуют в пользу участия NET в патогенезе РА, вероятно, через посредство их цитруллинсодержащих эпитопов. Продолжение исследований в данном направлении позволит расширить имеющиеся представления о роли NET и ET в патогенезе РА, а также может быть полезно для идентификации новых биомаркеров данного заболевания.

Список литературы / References

1. Бедина С.А., Трофименко А.С., Мамус М.А., Тихомирова Е.А., Мозговая Е.Э., Спицина С.С., Девятаева Н.М. Образование внеклеточных ловушек нейтрофилов у больных ревматоидным артритом // Современные проблемы науки и образования, 2020. № 2. [Bedina S.A., Trofimenko A.S., Mamus M.A., Tikhomirova E.A., Mozgovaya E.E., Spitsina S.S., Devyataeva N.M. Formation of neutrophil extracellular traps in

patients with rheumatoid arthritis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* = *Modern Problems of Science and Education*, 2020, no. 2. (In Russ.)]

2. Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Мамус М.А., Тихомирова Е.А., Бедина С.А., Спицина С.С. Образование внеклеточных ловушек моноцитов при ревматоидном артрите // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2019. № 10-1. С. 86-89. [Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Mamus M.A., Tikhomirova E.A., Bedina S.A., Spitsina S.S. Formation of monocyte extracellular traps in rheumatoid arthritis. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy* = *International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2019, no. 10-1, pp. 86-89. (In Russ.)]

3. Aletaha D., Neogi T., Silman A.J., Funovits J., Felson D.T., Bingham 3rd C.O., Birnbaum N.S., Burmester G.R., Bykerk V.P., Cohen M.D., Combe B., Costenbader K.H., Dougados M., Emery P., Ferraccioli G., Hazes J.M.W., Hobbs K., Huizinga T.W.J., Kavanaugh A., Kay J., Kvien T.K., Laing T., Mease P., Ménard H.A., Moreland L.W., Naden R.L., Pincus T., Smolen J.S., Stanislawski-Biernat E., Symmons D., Tak P.P., Upchurch K.S., Vencovsky J., Wolfe F., Hawker G. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American college of rheumatology / European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, Vol. 69, pp. 1580-1588.

4. Angelotti F., Parma A., Cafaro G., Capecchi R., Alunno A., Puxeddu I. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2017, Vol. 35, no. 3, pp. 368-378.

5. Apel F., Zychlinsky A., Kenny E.F. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2018, Vol. 14, no. 8, pp. 467-475.

6. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, Vol. 303, pp. 1532-1535.

7. Carmona L., Cross M., Williams B., Lassere M., March L. Rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2010, Vol. 24, no. 6, pp. 733-745.

8. Granger V., Faille D., Marani V., Noël B., Gallais Y., Szely N., Flament H., Pallardy M., Chollet-Martin S., Chaisemartin L. Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, Vol. 102, no. 3, pp. 775-781.

9. Kongpachith S., Lingampalli N., Ju C.H., Blum L.K., Lu D.R., Elliott S.E., Mao R., Robinson W.H. Affinity maturation of the anti-citrullinated protein antibody paratope drives epitope spreading and polyreactivity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, 2019, Vol. 71, no. 4, pp. 507-517.

10. Lin Y.J., Anzaghe M., Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 4, 880. doi: 10.3390/cells9040880.

11. Wells G., Becker J.-C., Teng J., Dougados M., Schiff M., Smolen J., Aletaha D., van Riel P.L.C.M. Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Ann. Rheum. Dis.*, 2009, Vol. 68, no. 6, pp. 954-960.

Авторы:

Бедина С.А. — к.м.н., старший научный сотрудник
клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Мозговая Е.Э. — к.м.н., ведущий научный сотрудник
клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Трофименко А.С. — к.м.н., заведующий клинико-
биохимической лабораторией ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Спицина С.С. — младший научный сотрудник
клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Мамус М.А. — младший научный сотрудник
клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной ревматологии имени
А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Authors:

Bedina S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate,
Department of Clinical Biochemistry, A. Zborovsky Institute of
Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian
Federation

Mozgovaya E.E., PhD (Medicine), Leading Research
Associate, Department of Clinical Biochemistry, A. Zborovsky
Institute of Clinical and Experimental Rheumatology,
Volgograd, Russian Federation

Trofimenko A.S., PhD (Medicine), Head, Laboratory of
Clinical Biochemistry, A. Zborovsky Institute of Clinical and
Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Spitsyna S.S., Junior Research Associate, Department of
Clinical Biochemistry, A. Zborovsky Institute of Clinical and
Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Mamus M.A., Junior Research Associate, Department of
Clinical Biochemistry, A. Zborovsky Institute of Clinical and
Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ COVID-19

**Бородин И.А., Гусякова О.А., Селезнева И.А., Гильмиярова Ф.Н.,
Ерещенко А.А., Балдина О.А., Колотьева Н.А., Борисова О.В.**

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Самара, Россия

Резюме. В настоящее время актуальным является поиск перспективных способов диагностики инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Для оценки степени риска возникновения COVID-19 недостаточно используется ротовая жидкость. Молекулярный состав отражает как локальное состояние ротовой полости, так и отдельных систем организма, позволяет быть надежной платформой для диагностики. Системная воспалительная реакция, как известно, играет решающую роль в развитии коронавирусной инфекции, «цитокиновый шторм» увеличивает тяжесть заболевания. Саливадиагностической матрицей динамики развития инфекции при COVID-19 служит определение IL-6, IL-8, С-реактивного белка в ротовой жидкости для оценки степени выраженности воспалительного процесса. Исследование проводилось на базе кафедр фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой и инфекционных болезней ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. В исследовании приняли участие 122 человека, из них в контрольной группе 67 человек — клинически здоровые лица и опытная группа 55 человек больных новой коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2 (лабораторное подтверждение методом ПЦР и/или ИФА) средней и тяжелой степени тяжести (код по МКБ-10 U07.1), находящихся на стационарном лечении. Развитие заболевания COVID-19 сопровождалось многократным увеличением содержания IL-6 и IL-8 в ротовой жидкости заболевших относительно показателей у здоровых лиц, в несколько сотен раз для IL-6 (+650%) и в несколько тысяч раз для IL-8 (+26513%), а также увеличение в 2 раза показателя С-реактивного белка (+115%). При оценке иммунных показателей ротовой жидкости с учетом наличия или отсутствия дыхательной недостаточности, были выявлены достоверные различия для IL-6 (+173%) в ротовой жидкости у пациентов с дыхательной недостаточностью 1-2-й степени относительно пациентов с ее отсутствием. Определение перечисленных провоспалительных маркеров у больных COVID-19 имеет важное прогностическое значение в оценке развития заболевания и степени его тяжести, и определение их содержания именно в ротовой жидкости делает этот метод актуальным и востребованным уже на амбулаторном этапе диагностики, что чрезвычайно важно в ситуации пандемии коронавирусной инфекции и ограниченности медицинских ресурсов. Исследование ротовой жидкости на догоспитальном этапе является ресурсосберегающей технологией, так как не требует присутствия медицинского работника для взятия биоматериала, является минимально травмирующей для пациента и, имея в составе широкий спектр объектов исследования, может ответить на целый ряд диагностических вопросов: наличие ге-

Адрес для переписки:

Ерещенко Алена Анатольевна
ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.
Тел.: 8 (963) 11-63-15.
E-mail: pystnica131902@gmail.com

Address for correspondence:

Ereshchenko Alena A.
Samara State Medical University
443099, Russian Federation, Samara, Chapayevskaya str., 89.
Phone: 7 (963) 11-63-15.
E-mail: pystnica131902@gmail.com

Образец цитирования:

И.А. Бородин, О.А. Гусякова, И.А. Селезнева,
Ф.Н. Гильмиярова, А.А. Ерещенко, О.А. Балдина,
Н.А. Колотьева, О.В. Борисова «Провоспалительный
статус ротовой жидкости при COVID-19» //
Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1171-1176.
doi: 10.15789/1563-0625-PSO-2196
© Бородин И.А. и соавт., 2021

For citation:

I.A. Borodina, O.A. Gusyakov, I.A. Selezneva,
F.N. Gilmiyarova, A.A. Ereshchenko, O.A. Baldina,
N.A. Kolotyeva, O.V. Borisova "Proinflammatory status of
oral fluid in COVID-19", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5,
pp. 1171-1176. doi: 10.15789/1563-0625-PSO-2196
DOI: 10.15789/1563-0625-PSO-2196

нетического материала или антител к SARS-CoV-2, выраженность воспалительного процесса и риск развития дыхательной недостаточности.

Ключевые слова: интерлейкин-6, интерлейкин-8, С-реактивный белок, неинвазивная диагностика, ротовая жидкость, COVID-19

PROINFLAMMATORY STATUS OF ORAL FLUID IN COVID-19

Borodina I.A., Gusyakova O.A., Selezneva I.A., Gilmiyarova F.N., Ereshchenko A.A., Baldina O.A., Kolotyeva N.A., Borisova O.V.

Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Abstract. At present, a search for promising ways to diagnose infection caused by SARS-CoV-2 is quite relevant. Oral fluid is not commonly used for assessment of COVID-19 risk. Its molecular profile reflects both local state of the oral cavity, and individual organs and systems, thus suggesting a reliable diagnostic platform. Systemic inflammatory response is known to play a crucial role in development of the coronavirus infection; the “cytokine storm” determines severity of the disease. The saliva-based diagnostics of clinical course in COVID-19 patients includes determination of IL-6, IL-8, C-reactive protein in oral fluid, in order to assess severity of the inflammatory process. The present study was carried out at the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, and Department of Pediatric Infections at the Samara State Medical University. The study involved 122 persons: 67 clinically healthy individuals comprised the control group, and the group of comparison included 55 inpatients with moderate or severe coronavirus infection (COVID-19) caused by SARS-CoV-2 virus as confirmed by PCR and/or ELISA testing. Development of the disease was accompanied by drastically increased contents of IL-6 and IL-8 in oral fluid of the patients relative to the indexes in healthy persons, i.e., several-fold for IL-6 (+ 650%) and even higher elevation of IL-8 levels (+ 26513%), as well as a 2-fold increase of C-reactive protein (+115%). When comparing the immune indexes of oral fluid in presence versus absence of respiratory insufficiency, a significant difference was found for salivary IL-6 (+173%) in the patients with grade 1-2 respiratory insufficiency as compared with patients free of respiratory disorders. Determination of these proinflammatory markers in patients with COVID-19 is of important prognostic significance when assessing development of the disease and its severity. Direct detection of their content in the oral fluid makes this method relevant, and potentially demanded for the outpatient diagnostics, being highly important during pandemics of coronavirus infection and limited medical resources. Examination of oral fluid at the pre-hospital stage is a resource-saving technology, since it does not require additional medical staff to take biomaterial, is non-invasive to the patient, and suggesting a wide range of research items, it can resolve a number of diagnostic issues, e.c., presence of specific genetic material or antibodies to SARS-CoV-2, severity of the inflammatory process and the risk of respiratory failure in the patient.

Keywords: interleukin-6, interleukin-8, C-reactive protein, non-invasive diagnostic, oral fluid, COVID-19

Введение

31 декабря 2019 года появилась первая официальная информация о новой коронавирусной инфекции, вызывающей стремительное развитие пневмонии, и быстро распространяющейся среди жителей Китая. Уже 31 января 2020 года Всемирная организация здравоохранения признала вспышку коронавируса SARS-CoV-2 чрезвычайной ситуацией международного масштаба, и 11 февраля 2020 года данная инфекция получила официальное название COVID-19 [1, 2]. Все медицинское и научное сообщество столкнулось с абсолютно новой формой инфекции, течение которой было непредсказуемо, лечение неизвестно.

Безусловно, всех волновал путь передачи SARS-CoV-2, и, как наиболее вероятный и распространенный, им оказался воздушно-капельный, а точнее аэрозольный, с участием мельчайших капелек ротовой жидкости [3]. Кроме того, поскольку слюнные железы могут служить резервуаром вирусов и поддерживать выделение их во внешнюю среду [4], был сделан вывод, что слюна, как компонент ротовой жидкости, может сыграть немаловажную роль в распространении коронавирусной инфекции. В появившихся научных работах при изучении COVID-19 большинство исследователей пришли к выводу о чрезвычайной ценности смешанной слюны в качестве неинвазивной и доступной диагностической биосреды

организма при определении РНК SARS-CoV-2, а также сывороточных и секреторных иммуноглобулинов [3, 4, 12]. Однако информативность ротовой жидкости как многокомпонентного и высокочувствительного диагностического объекта при системных и локальных заболеваниях [6], до сих пор не используется в России в полной мере при COVID-19 для оценки степени риска его возникновения, особенностей течения и прогноза патологического процесса. Поскольку воспалительная реакция играет ключевую роль в развитии коронавирусной инфекции, цитокины определяют патогенез данного заболевания, а «цитокиновый шторм» увеличивает тяжесть COVID-19 [5, 8, 9], в качестве маркеров провоспалительного статуса организма наиболее интересными диагностическими показателями ротовой жидкости для нас представляются IL-6, IL-8, С-реактивный белок.

Цель исследования — изучить иммунологические показатели ротовой жидкости при COVID-19.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе кафедр фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой и инфекционных болезней ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. В исследовании приняли участие 122 человека, из них в контрольной группе 67 человек — клинически здоровые лица и опытная группа 55 человек больных коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом COVID-19 (лабораторное подтверждение методом ПЦР и/или ИФА) средней и тяжелой степени тяжести (код по МКБ-10 U07.1), находящихся на стационарном лечении в COVID-госпитале Клиник СамГМУ. Критериями тяжести течения и наличия дыхательной недостаточности являлись: ЧДД от 24/мин до 30/мин, насыщение крови кислородом SpO_2 от 94% до 89%, одышка при физической нагрузке, изменения в легких при компьютерной томографии, типичные для вирусного поражения.

Материалом исследования являлась ротовая жидкость, собранная в стерильные пластиковые пробирки путем сплевывания. Перед проведением исследования всем испытуемым был проведен внешний осмотр ротовой полости — из исследования исключались пациенты с признаками острых и хронических стоматологических патологий. Ротовую жидкость собирали утром натощак, после предварительного полоскания ротовой полости теплой кипяченой водой, в течение первых 24 часов нахождения в стационаре. Перед сбором ротовой жидкости для здоровых добровольцев исключались физические нагрузки, курение; для пациентов с коронавирусом —

применение пероральных лекарственных средств в день сбора биоматериала, проведение инвазивных процедур (фибробронхоскопия) за 24 часа до сдачи биоматериала. Образцы с геморрагическим компонентом исключались из исследования. Определение содержания интерлейкина-6, интерлейкина-8 проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Интерлейкин-6-ИФА-Бест», «Интерлейкин-8-ИФА-Бест» (АО «Вектор-Бест», Россия). С-реактивный белок определяли на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas Integra 400+ фирмы Roche Diagnostics производства Японии с помощью коммерческого набора реактивов фирмы Roche Diagnostics (Швейцария).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью статистического пакета SPSS Statistics 21. Использовались стандартные методы описательной статистики. Были изучены формы распределения исследуемых показателей. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Для оценки различий между группами использовался непараметрический U-критерий Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования провоспалительных компонентов ротовой жидкости представлены в таблице 1. Развитие заболевания COVID-19 сопровождалось многократным увеличением содержания IL-6 и IL-8 в ротовой жидкости заболевших относительно показателей у здоровых лиц, в несколько сотен раз для IL-6 (+650%) и в несколько тысяч раз для IL-8 (+26513%), а также увеличение в 2 раза показателя С-реактивного белка (+115%).

Интерлейкин-6 — один из ключевых провоспалительных цитокинов, обладающий широким спектром иммунорегуляторных свойств, влиянием на гемопоэз и онкогенез.

Способность IL-6 действовать по механизму «транс-сигналинга», широкий спектр клеток мишеней цитокина и изначально более высокий его уровень именно при COVID-19, в отличие от других сезонных ОРВИ, делает его ключевым игроком в запуске «цитокинового шторма». Высокий уровень IL-6 в сыворотке крови определяет тяжесть протекания COVID-19 и вероятность развития летальных осложнений, но, кроме этого, он может являться мишенью фармакотерапии, например использование блокаторов IL-6 или его рецептора [5, 8, 9]. Учитывая все перечисленное, определение IL-6 в ротовой жидкости обеспечило бы врача дополнительным диагностическим инструментом и позволило вести динамическое мониторирование уровня IL-6 и в дальнейшем

ТАБЛИЦА 1. ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ COVID-19, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. PRO-INFLAMMATORY MARKERS IN THE ORAL FLUID OF COVID-19 PATIENTS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

	Контрольная группа Control group (n = 67)	Опытная группа Group of comparison (n = 55)
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	0,4080 (0,08-1,17)	3,0780* (1,82-5,70)
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	127,57 (33,91-230,88)	33950,56* (200,41-332661,30)
СРБ, мг/л CRP, mg/l	0,24 (0,21-0,26)	0,515* (0,37-0,83)

Примечание. * – $p < 0,0001$.

Note. *, $p < 0.0001$.

ТАБЛИЦА 2. ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ COVID-19 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. PRO-INFLAMMATORY MARKERS IN THE ORAL FLUID OF COVID-19 PATIENTS DEPENDING ON DEGREE OF RESPIRATORY INSUFFICIENCY, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

	Контрольная группа Control group (n = 67)	Опытная группа Group of comparison (n = 55)	
		Степень дыхательной недостаточности Degree of respiratory insufficiency	
		0 (n = 23)	1-2 (n = 22)
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	0,408 (0,08-1,17)	3,03 (1,91-5,24)	5,26* (2,83-14,72)
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	127,57 (33,91-230,88)	52280,01 (5844,40-236666,98)	33950,56 (200,41-382562,55)
СРБ, мг/л CRP, mg/l	0,24 (0,21-0,26)	0,47 (0,41-0,62)	0,58 (0,36-0,84)

Примечание. * – $p < 0,05$.

Note. *, $p < 0.05$.

создание специфических критериев использования антицитокиновой терапии, течения и прогноза COVID-19.

IL-8 относится к хемокинам, и его значение в иммунном ответе организма сводится к индукции хемотаксиса гранулоцитов, моноцитов/макрофагов и лимфоцитов в очаг воспаления, активации выработки провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками, а также дегрануляции нейтрофилов. Повышение его содержания в сыворотке крови, также как и IL-6, соотносится с более тяжелым течением COVID-19 [8, 10].

Повышение С-реактивного белка ротовой жидкости выражено в меньшей степени чем IL-6, IL-8, и СРБ сыворотки крови, что вероятно связано с избирательной проницаемостью гематоса-

ливарного барьера для его пентамерной формы и С-реактивный белок ротовой жидкости имеет локальное, а не системное происхождение.

При оценке иммунных показателей ротовой жидкости с учетом наличия или отсутствия дыхательной недостаточности, были выявлены достоверные различия для IL-6 в ротовой жидкости у пациентов с дыхательной недостаточностью 1-2 степени относительно пациентов с отсутствием дыхательной недостаточности (табл. 2). Повышение значения IL-6 в ротовой жидкости пациентов с дыхательной недостаточностью 1-2-й степени относительно пациентов с отсутствием дыхательной недостаточности почти в 2 раза (+173%), может позволить определить критический уровень IL-6 в ротовой жидкости, как прогностический

фактор для смены стратегии диагностики и лечения [7, 11, 13].

Заключение

Провоспалительные компоненты ротовой жидкости имеют тройной источник происхождения и являются результирующим ответом патологического процесса, протекающего в организме. Интерлейкины и СРБ могут синтезироваться непосредственно в клетках слюнных желез и тканей ротовой полости, поступать с мокротой из нижних отделов дыхательных путей и, как небольшие биомолекулы, способны проникать через гематосаливарный барьер, выполняя защитную функцию на переднем крае борьбы с инфекцией, а сам факт гипосаливации связан с высоким риском заражения COVID-19 [3]. Данные провоспалительные показатели являются кооперативными участниками воспалительного процесса, обеспечивают миграцию в очаг воспаления эффекторных клеток иммунитета, стимулируют их фагоцитарную, бактерицидную активность и

индуцируют запуск антигенспецифического иммунного ответа, динамика перечисленных провоспалительных маркеров у больных COVID-19 имеет важное прогностическое значение в оценке развития заболевания и степени его тяжести [5, 8, 9, 11, 13, 14], и определение их содержания именно в ротовой жидкости делает этот метод актуальным и востребованным уже на амбулаторном этапе диагностики, что чрезвычайно важно в ситуации пандемии коронавирусной инфекции и ограниченности медицинских ресурсов.

Исследование ротовой жидкости на догоспитальном этапе является ресурсосберегающей технологией, так как не требует присутствия медицинского работника для взятия биоматериала, является минимально травмирующей для пациента и, имея, в составе широкий спектр объектов исследования, может ответить на целый ряд диагностических вопросов: наличие генетического материала или антител к SARS-CoV-2, выраженность воспалительного процесса и риск развития дыхательной недостаточности.

Список литературы / References

1. Романов Б.К. Коронавирусная инфекция COVID-2019 // Безопасность и риск фармакотерапии, 2020. Т. 8, № 1. С. 3-8. [Romanov B.K. Coronavirus disease COVID-2019. *Bezopasnost i risk farmakoterapii* = *Safety and Risk of Pharmacotherapy*, 2020, Vol. 8, no. 1, pp. 3-8. (In Russ.)]
2. Chakraborty C., Sharma A.R., Sharma G., Bhattacharya M., Lee S.S. SARS-CoV-2 causing pneumonia-associated respiratory disorder (COVID-19): diagnostic and proposed therapeutic options. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2020, Vol. 24, no. 7, pp. 4016-4026.
3. Fini M.B. Oral saliva and COVID-19. *Oral Oncol.*, 2020, Vol. 108, 104821. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.104821.
4. Han P., Ivanovski S. Saliva-friend and foe in the COVID-19 outbreak. *Diagnostics (Basel)*, 2020, Vol. 10, no. 5, 290. doi: 10.3390/diagnostics10050290.
5. Han H., Ma Q., Li C., Liu R., Zhao L., Wang W., Zhang P., Liu X., Gao G., Liu F., Jiang Y., Cheng X., Zhu C., Xia Y. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, Vol. 9, no. 1, pp. 1123-1130.
6. Kaczor-Urbanowicz K.E., Martin Carreras-Presas C., Aro K., Tu M., Garcia-Godoy F., Wong D.T. Saliva diagnostics – current views and directions. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2017, Vol. 242, no. 5, pp. 459-472.
7. Liu F., Li L., Xu M., Wu J., Luo D., Zhu Y., Li B., Song X., Zhou X. Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *J. Clin. Virol.*, 2020, Vol. 127, 104370. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104370.
8. Liu B., Li M., Zhou Z., Guan X., Xiang Y. Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? *J. Autoimmun.*, 2020, Vol. 111, 102452. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102452.
9. McGonagle D., Sharif K., O'Regan A., Bridgewood C. The Role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. *Autoimmun. Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 6, 102537. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102537.
10. Mulchandani R., Lyngdoh T., Kakkar A.K. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2021, Vol. 51, no. 1, e13429. doi: 10.1111/eci.13429.
11. Tumgor G., Celik U., Alabaz D., Cetiner S., Yaman A., Yildizdas D., Alhan E. Aetiological agents, interleukin-6, interleukin-8 and CRP concentrations in children with community- and hospital-acquired pneumonia. *Ann. Trop. Paediatr.*, 2006, Vol. 26, no. 4, pp. 285-291.
12. Vilela A.C.S., Costa N.L. The COVID-19 and Saliva Paradox. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2020, Vol. 78, no. 12, 2105. doi: 10.1016/j.joms.2020.07.225.

13. Zhang J., Yu M., Tong S., Liu L.Y., Tang L.V. Predictive factors for disease progression in hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *J. Clin. Virol.*, 2020, Vol. 127, 104392. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104392.

14. Zhang D., Zhou X., Yan S., Tian R., Su L., Ding X., Xiao M., Chen Y., Zhao H., Chen H., Zhang H., Li Z., Li Q., Xu Y., Yan X., Li Y., Zhang S. Correlation between cytokines and coagulation-related parameters in patients with coronavirus disease 2019 admitted to ICU. *Clin. Chim. Acta*, 2020, Vol. 510, pp. 47-53.

Авторы:

Бородина И.А. — ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Гусьякова О.А. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Селезнева И.А. — к.м.н., доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Гильмиярова Ф.Н. — д.м.н., заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Ерещенко А.А. — ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Балдина О.А. — к.м.н., доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Колотьева Н.А. — к.м.н., доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Борисова О.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры детских инфекций ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Authors:

Borodina I.A., Assistant Professor, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Gusyakova O.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Selezneva I.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Gilmiyarova F.N., PhD, MD (Medicine), Honored Researcher of Russia, Professor, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Ereshchenko A.A., Assistant Professor, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Baldina O.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Kolotyeva N.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Borisova O.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Pediatric Infections, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Поступила 27.01.2021
Отправлена на доработку 11.05.2021
Принята к печати 19.05.2021

Received 27.01.2021
Revision received 11.05.2021
Accepted 19.05.2021

СЛУЧАЙ ПАРВОВИРУСНОЙ В19 ИНФЕКЦИИ И ИММУНОДЕФИЦИТНОГО СОСТОЯНИЯ У ПАЦИЕНТА С СИНДРОМОМ ЖИЛЬБЕРА

Антипова А.Ю., Дробышевская В.Г., Хамитова И.В.

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

Резюме. Впервые описан случай длительной персистенции парвовируса В19 у пациента с синдромом Жильбера на фоне иммунодефицитного состояния с преобладанием инфекционной симптоматики — хронической герпесвирусной инфекции.

Ранее пациенту (мужчина, 48 лет) были установлены диагнозы — синдром Жильбера, хронический риносинусофарингит, хроническая герпесвирусная инфекция. В июле 2017 г. в крови была обнаружена ДНК парвовируса В19. Клинические проявления инфекционной эритемы отсутствовали. Пациент обратился в медицинский центр Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. На базе медицинского центра ФБУН НИИЭМ имени Пастера в Центральной клинико-диагностической лаборатории были исследованы образцы крови пациента, полученные с информированного согласия: в январе и июне 2018 г. и в ноябре 2019 г. Использовали: ИФА тест-системы Anti-Parvovirus B19 ELISA (IgM) и Anti-Parvovirus B19 ELISA (IgG) (Euroimmune, Германия), ПЦР набор реагентов «АмплиСенс Parvovirus B19-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Интерфероновый статус определяли по индуцированной продукции IFN I, II типов и циркулирующих (сывороточных) интерферонов. Были проанализированы данные лабораторных исследований, выполненные ранее в разных ЛПУ Санкт-Петербурга.

При исследовании образцов крови, полученных в 2018 г., антитела класса IgM к парвовирусу В19 выявлены не были. Титр IgG-антител составил 96 МЕ/мл и 264 МЕ/мл соответственно. Из плазмы крови была выделена ДНК парвовируса В19, но вирусная нагрузка была менее 720 МЕ ДНК PVB19/мл ($1,5 \times 10^2$ и $1,9 \times 10^2$ копий ДНК/мл соответственно). В клиническом анализе крови отмечены незначительные (не более 7%) отклонения от референсных значений: увеличение степени насыщения эритроцита гемоглобином, снижение показателя ширины кривой распределения эритроцитов, относительный лимфоцитоз. Был обнаружен дефицит различных типов интерферонов: уровень IFN γ был 80 МЕ/мл в обеих пробах, количество IFN α , IFN β менялось — 80 и 160 МЕ/мл соответственно. На фоне иммунодефицита период циркуляции ДНК парвовируса В19 составил 11 месяцев. Пациенту были назначены препараты из группы интерферонов. В клиническом материале, полученном в ноябре 2019 г. ДНК парвовируса В19 не обнаружена; показатели IFN α , IFN β и IFN γ составили 160 МЕ/мл. Отмечено восстановление соотношения лимфоцитарных клеток, увеличение их количества, улучшение показателей интерферонового статуса.

Ключевые слова: синдром Жильбера, парвовирус В19, герпес, ДНК, иммунитет, IFN, инфекция

Адрес для переписки:

Антипова Анастасия Юрьевна
ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (812) 232-94-11.
E-mail: anti130403@mail.ru

Address for correspondence:

Antipova Anastasia Yu.
St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone: 7 (812) 232-94-11.
E-mail: anti130403@mail.ru

Образец цитирования:

А.Ю. Антипова, В.Г. Дробышевская, И.В. Хамитова
«Случай парвовирусной В19 инфекции и иммунодефицитного состояния у пациента с синдромом Жильбера» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1177-1182.
doi: 10.15789/1563-0625-COP-2325
© Антипова А.Ю. и соавт., 2021

For citation:

A. Yu. Antipova, V. G. Drobyshevskaya, I. V. Khamitova
“Case of parvovirus B19 infection and immunodeficiency in the patient with Gilbert syndrome”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1177-1182. doi: 10.15789/1563-0625-COP-2325
DOI: 10.15789/1563-0625-COP-2325

CASE OF PARVOVIRUS B19 INFECTION AND IMMUNODEFICIENCY IN THE PATIENT WITH GILBERT SYNDROME

Antipova A.Yu., Drobyshevskaya V.G., Khamitova I.V.

St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. A case of long-term persistence of parvovirus B19 is described for the first time in a patient with Gilbert's syndrome against the background of immunodeficiency with predominance of infectious symptoms (chronic herpesvirus infection). Previously, the patient (male, 48 years old) was diagnosed with Gilbert's syndrome, chronic rhinosinusopharyngitis, and chronic herpesvirus infection. In July 2017, parvovirus B19 DNA was detected in blood. No clinical manifestations of infectious erythema were noted. The patient was admitted to the medical center of St. Petersburg Pasteur Institute. His blood samples obtained under informed consent were examined at the medical center in Central Clinical and Diagnostic Laboratory of St. Petersburg Pasteur Institute in January and June 2018 and in November 2019. ELISA test systems "Anti-Parvovirus B19 ELISA (IgM)" and "Anti-Parvovirus B19 ELISA (IgG)" (Euroimmune, Germany), as well PCR reagent kit "AmpliSens Parvovirus B19-FL" (FSB Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Russia) were used for specific diagnostics. Interferon status was determined by the induced production of IFN types I, II and circulating (serum) interferons. Moreover, we considered the laboratory data obtained earlier at different medical facilities of St. Petersburg. IgM class antibodies to the parvovirus B19 were not detected in the blood samples obtained in 2018. IgG antibody titer was 96 IU/ml and 264 IU/ml, respectively. Parvovirus B19 DNA was isolated from blood plasma, but the viral load was less than 720 IU of PVB19 DNA/ml (1.5×10^2 and 1.9×10^2 copies of DNA/ml, respectively). Clinical blood analysis, showed only minor (no more than 7%) deviations from the reference values, increased hemoglobin saturation of red blood cells (RBC), a decreased width of RBC distribution curve, and relative lymphocytosis. A deficiency of various interferon types was revealed: IFN γ level was 80 IU/ml in both samples, IFN α , IFN β amounts varied from 80 to 160 IU/ml, respectively. The period of parvovirus B19 DNA persistence in blood was 11 months in presence of immunodeficiency. The patient was administered drugs of the interferon group. Parvovirus B19 DNA was not detected in clinical samples of November 2019; IFN α , IFN β and IFN γ values were 160 IU/ml. We have detected recovery of lymphoid cell ratio, increase in their number, and improved indexes of interferon status.

Keywords: Gilbert's syndrome, parvovirus B19, herpes, DNA, immunity, INF, infection

Введение

Подход к лечению согласно принципам персонализированной медицины, т.е. с учетом индивидуальных особенностей пациента, приобретает все большую актуальность. Борьба с «заболеванием», как динамическим процессом, без учета индивидуальных характеристик пациента может влиять на эффективность терапии и дальнейший прогноз.

Синдром Жильбера (СЖ) — это наследственный пигментный гепатоз, при котором нарушение обмена билирубина вызывает умеренное повышение содержания свободного билирубина в крови (развитии доброкачественной конъюгированной гипербилирубинемии). Чаще СЖ протекает без желтухи [7], но могут наблюдаться астеновегетативные расстройства, такие как слабость, нарушения сна, повышенная утомляемость. Ухудшение самочувствия может быть вызвано физическим или психоэмоциональным перенапряжением, применением ряда лекарств, а также интеркуррентными заболеваниями.

Интеркуррентные заболевания часто вызываются различными вирусами. Так, герпесвирусы — одни из наиболее распространенных и актуальных вирусов человека. Герпесвирусные инфекции изучаются длительное время и подробно описаны во многих работах [11, 14]. Относительно недавно был открыт ДНК-содержащий вирус семейства *Parvoviridae*, парвовирус В19 (PVB19, Primate erythrovirus 1), единственным хозяином которого является человек. Заболевание чаще протекает в острой форме, хроническое течение отмечают у больных артритом и артралгиями. Наличие бессимптомных и стертых форм заболевания и трех путей передачи, в том числе воздушно-капельного, обуславливают широкое распространение парвовирусной В19 инфекции [1, 3, 5]. Считается, что парвовирусная инфекция является оппортунистической и может вызывать осложнение течения хронических заболеваний.

В данной работе впервые описан случай длительной персистенции парвовируса В19 у пациента с синдромом Жильбера на фоне им-

мунодефицитного состояния с преобладанием инфекционной симптоматики (хронической герпесвирусной инфекции).

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе медицинского центра ФБУН НИИЭМ имени Пастера в Центральной клинико-диагностической лаборатории.

Изучены образцы крови человека, взятые 16 января, 14 июня 2018 г. и 26 ноября 2019 г. с информированного согласия пациента.

Для исследования иммунного статуса пациента были проведены: фенотипирование лимфоцитов (CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD25, HLA-DR) на проточном цитофлуориметре FACS Canto II, BECTON DICKINSON (USA) методом многоцветного анализа с применением моноклональных антител производства BECTON DICKINSON и Beckman Coulter (USA); определение сывороточных иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG на биохимическом анализаторе Daytona RX (Великобритания) методом иммунотурбидиметрии с использованием наборов реагентов для количественного определения иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке и плазме крови (Randox, Великобритания). Интерфероновый статус определяли по индуцированной продукции IFN I, II типов и циркулирующих (сывороточных) интерферонов [6]. Все исследования выполнялись согласно инструкциям производителей наборов и реагентов, зарегистрированных в Российской Федерации.

Наличие IgM- и IgG-антител к парвовирусу В19 определяли с помощью ИФА тест-систем Anti-Parvovirus B19 ELISA (IgM) и Anti-Parvovirus B19 ELISA (IgG) (Euroimmune, Германия). Вирусную нагрузку (ДНК парвовируса В19) в плазме крови определяли с помощью диагностического набора реагентов «АмплиСенс Parvovirus B19-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Также были проанализированы данные лабораторных исследований, предоставленные пациентом, выполненные ранее в ЛПУ Санкт-Петербурга. С 2013 г. у пациента были лабораторно выявлены маркеры следующих вирусных инфекций: вируса ветряной оспы (IgG-антитела, 2013-2014 гг.); вируса Эпштейна–Барра (IgG-антитела и ДНК, 2013 г.); цитомегаловируса (ДНК, 2014 г.); герпеса человека 6 типа (ДНК, 2014, 2017 гг.); вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (А9) (ДНК, 2016 г.), вируса герпеса человека 1-го, 2-го типа (IgG-антитела, 2017 г.) и др. Данные лабораторных исследований крови представлены в тексте.

Результаты и обсуждение

В 2018 г. в медицинский центр (МЦ) ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера обратился пациент.

Анамнез

Мужчина, 48 лет (1969 года рождения), трудоустроен. До обращения в МЦ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера у пациента были выявлены следующие соматические заболевания: установлен диагноз «синдром Жильбера» (в возрасте 13 лет), диагностированы хронический риносинусофарингит и хроническая рецидивирующая герпесвирусная инфекция.

В июле 2017 г. в разных ЛПУ Санкт-Петербурга (Городской консультативно-диагностический центр (вирусологический); СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина») с интервалом 7 дней были получены положительные результаты качественного ПЦР исследования (без определения вирусной нагрузки) в отношении парвовируса В19. В октябре 2017 г. в СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина» на основании повторного обнаружения ДНК РVВ19 дано заключение о реактивации парвовирусной В19 инфекции.

Поводом для обращения в МЦ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера стали результаты анализов, а также жалобы на боль в горле, частые ОРЗ и быструю утомляемость. Симптомы наблюдались на протяжении нескольких лет. Было назначено обследование у инфекциониста и иммунолога.

Было выполнено серологическое исследование образцов сыворотки крови пациента. Антитела класса IgM к парвовирусу В19 выявлены не были. Однако в пробах от 16 января 2018 г. и от 14 июня 2018 г. (после курса приема препарата интерферона), определялись IgG-антитела; титр составил 96 МЕ/мл и 264 МЕ/мл соответственно. В плазме крови парных образцов была выявлена ДНК парвовируса В19, но вирусная нагрузка была менее 720 МЕ ДНК РVВ19/мл ($1,5 \times 10^2$ и $1,9 \times 10^2$ копий ДНК/мл соответственно). Следует отметить, что вирусная нагрузка сохранялась на одном и том же уровне в течение шести месяцев. С учетом результатов предыдущих исследований, лабораторно подтвержденный период циркуляции ДНК парвовируса В19 в крови пациента с синдромом Жильбера составил 11 месяцев. У пациента отсутствовали клинические проявления, характерные для инфекционной эритемы. Специального лечения парвовирусной инфекции в описанном случае не требовалось.

В клиническом анализе крови наблюдались незначительные (не более 7%) отклонения от референсных значений по следующим параметрам: увеличение степени насыщения эритроцитов гемоглобином, снижение показателя ширины кривой распределения эритроцитов, относительный лимфоцитоз. Количественные показатели иммуноглобулинов классов А, М и G соответствовали

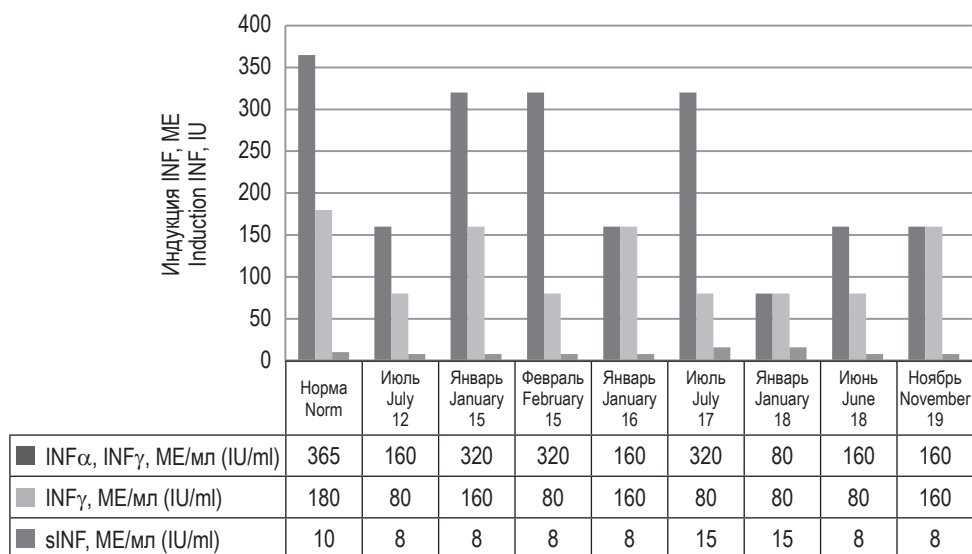


Рисунок 1. Интерфероновый статус пациента с синдромом Жильбера в динамике

Figure 1. Interferon status of a patient with Gilbert's syndrome in dynamics

норме. Однако был отмечен дисбаланс в индукции различных типов интерферонов (IFN).

На рисунке 1 представлены данные лабораторных исследований крови пациента, выполненные в предыдущие годы (данные предоставлены пациентом), в январе и июне 2018 г. и ноябре 2019 г. (наши данные). Показатели сравнивали с референсными значениями: 250-520 МЕ/мл для IFN α , IFN β и 110-250 МЕ/мл для IFN γ .

В 2015 г. показатели интерфероновой статуса соответствовали нижней границе референсных интервалов и составили 320 МЕ/мл (IFN α , IFN β) и 160 МЕ/мл (IFN γ). На протяжении ряда последующих лет наблюдалось снижение показателей, при этом количество IFN α , IFN β менялось в пределах 80-160 МЕ/мл, что может быть связано с приемом иммуностимулирующих лекарственных средств, назначенных лечащими врачами. Наименьшие значения показателей выявлялись на протяжении 2018 г.: IFN α , IFN β и IFN γ — 80 МЕ/мл. Выявление истощения системы интерферонов стало основанием для назначения препарата из группы интерферонов.

Для уточнения статуса пациента были выполнены повторные исследования. В клиническом материале от 26 ноября 2019 г. ДНК парвовируса B19 не обнаружена; показатели IFN α , IFN β и IFN γ составили 160 МЕ/мл. Полученное лечение привело к восстановлению соотношения лимфоцитарных клеток, на фоне незначительного увеличения их общего количества, улучшению показателей интерфероновой статуса, и улучшению качества жизни (со слов пациента).

В дифференциальной диагностике патологии доминирующим остается подход, направленный на лечение «болезни», как комплекса симптомов, без учета особенностей физиологии пациента, его психосоциального контекста.

В то же время во врачебной практике растет число пациентов, которые требуют индивидуального подхода. Представленный случай наглядно иллюстрирует эффективность лечения согласно принципам персонализированной медицины (предикативность, профилактика, персонализация и партисипативность).

Мужчина, часто болеющий вирусными инфекциями, на протяжении нескольких лет неоднократно обследовался у разных специалистов. На первичном приеме иммунолога большую обеспокоенность у посетителя вызывала проблема интерпретации результатов лабораторных исследований и неэффективная терапия индукторами интерферонов.

Пациентам с частыми рецидивами герпесвирусных инфекций (ХГВИ) или при монотонном типе заболевания рекомендуется комбинированная терапия индукторами интерферонов в сочетании с противовирусными химиопрепаратами. Длительная персистенция ДНК парвовируса B19 в крови пациента стала сигналом для более тщательного обследования у иммунолога.

Развитие вирусной инфекции определяется особенностями иммунной системы хозяина. Ключевым механизмом иммунной системы человека в борьбе с вирусами является клеточное звено иммунитета. Система интерферона, представляющая семейство секреторных белков, вырабатываемых клетками организма, начинает действовать в первые часы после заражения [4, 8]. Как известно, противовирусный интерферон — IFN γ — индуцирует и стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов (TNF, IL-1, IL-6), экспрессию на мембранах макрофагов антигенов МНС II; резко усиливает антимикробную и противовоспалительную активность путем повышения продукции клетками супероксид-

ных радикалов, усиливает фагоцитоз и антителоопосредованную цитотоксичность макрофагов; усиливает фагоцитарную активность нейтрофилов — тем самым вызывая гибель внутриклеточных патогенов.

Иммунологический мониторинг, основанный на изучении предоставленных данных и углубленного обследования, выявил нарастающую недостаточность системы интерферонов и изменение соотношения лимфоцитарных клеток в сторону значительного увеличения количества натуральных киллеров (обеспечивающих неспецифическую защиту от вирусных инфекций) сопровождающееся уменьшением популяции Т-лимфоцитов (обеспечивающих специфичный иммунный ответ на внутриклеточные патогены), у пациента с синдромом Жильбера,

Известно, что герпесвирусы подавляют иммунную систему хозяина [11, 14]. Для ХГВИ показано подавление интерфероновой реакции лейкоцитов, их способности синтезировать *in vitro* альфа-интерферон при стимуляции индукторами интерферона [2, 4, 7, 14]. В случае рецидивирующей герпетической инфекции может наблюдаться выраженное подавление продукции IFN γ . В специальной литературе описано снижение продукции IFN I типа при парвовирусной В19 инфекции у больных с ревматоидным артритом [13, 15].

В клинических рекомендациях по лечению герпесвирусных инфекций не прописана необходимость исследовать интерфероновый статус и устанавливать диспансерное наблюдение за лицами, перенесшими неосложненные формы простого герпеса. Вместе с тем, именно выявление истощения системы интерферонов в данном случае стало основанием для назначения препарата из группы интерферонов. Полученное лече-

ние привело к нормализации иммунного статуса (восстановлению соотношения лимфоцитарных клеток, на фоне незначительного увеличения их общего количества, улучшение показателей интерфероновых статусов).

Заключение

В ходе работы были обнаружены трудности интерпретации результатов лабораторных исследований при диагностике парвовирусной инфекции: в описанном случае у пациента с синдромом Жильбера на основании качественного ПЦР врачи делали вывод о реактивации парвовирусной инфекции, в то время как количественный анализ показал длительную персистенцию вируса с постоянной вирусной нагрузкой. Показано, что ДНК PVB19 в количестве 10^2 - 10^3 копий ДНК/мл может обнаруживаться в биоматериале, полученном от клинически здоровых лиц, которым не требуется лечения, в том числе в периферической крови 5% потенциальных доноров [1]. В то же время у больных гематологического профиля с иммуносупрессией персистенция ДНК PVB19 в крови отягощает течение основного заболевания, и может привести к ухудшению состояния пациентов. Прогноз по результатам ПЦР анализа может быть сделан только с учетом вирусной нагрузки и наличия сопутствующих патологий [9, 10, 12].

Этот случай иллюстрирует важность персонализированного подхода к диагностике и иммунореабилитации пациентов с сочетанной патологией.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность за помощь в написании статьи А.С. Макееву.

Список литературы / References

1. Антипова А.Ю., Лаврентьева И.Н., Бичурина М.А., Семенов А.В. Лабораторная диагностика парвовирусной инфекции в системе эпидемиологического надзора за экзантемными заболеваниями // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2012. Т. 2, № 63. С. 26-29. [Antipova A.Yu., Lavrentyeva I.N., Bitchourina M.A., Semyonov A.V. Laboratory diagnostics of parvovirus B19 infection in exanthematous diseases surveillance. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2012, Vol. 2, no. 63, pp. 26-29. (In Russ.)]
2. Викулов Г.Х. Иммунологические аспекты герпес-вирусных инфекций // Клиническая дерматология и венерология, 2015. Т. 5. С. 104-114. [Vikulov G.Kh. Immunological aspects of herpesvirus infections. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology*, 2015, Vol. 5, pp. 104-114. (In Russ.)]
3. Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Бичурина М.А., Никишов О.Н., Железнова Н.В., Кузин А.А. Выявление случаев парвовирусной инфекции в системе эпидемиологического надзора за экзантемными заболеваниями // Инфекция и иммунитет, 2016. Т. 6, № 3. С. 219-224. [Lavrentyeva I.N., Antipova A.Yu., Bichurina M.A., Nikishov O.N., Zheleznova N.V., Kuzin A.A. Detection of cases of parvovirus infection in the system for epidemiological surveillance of exanthematic diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, Vol. 6, no. 3, pp. 219-224. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2016-3-219-224.
4. Нестерова И.В. Врожденные и приобретенные интерферопатии: дифференцированные подходы к интерферон-корректирующей терапии // Детские инфекции, 2017. Т. 16, № 2. С. 50-53. [Nesterova I.V. Congenital and acquired interferonopathies: differentiated approaches to the interferon-corrective therapy. *Detskie infektsii = Children Infections*, 2017, Vol. 16, no. 2, pp. 50-53. (In Russ.)]

5. Никишов О.Н., Кузин А.А., Антипова А.Ю., Лаврентьева И.Н. Парвовирусная инфекция – современная проблема в эпидемиологии и клинической медицине // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2015. Т. 4, № 83. С. 29-35. [Nikishov O.N., Kuzin A.A., Antipova A.Yu., Lavrent'eva I.N. Parvovirus infection – contemporary issues in epidemiology and clinical medicine. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika* = *Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2015, Vol. 14, no. 4, pp. 29-35. (In Russ.)]
6. Определение интерферонового статуса как метод оценки иммунореактивности при различных формах патологии. Пособие для врачей. М., СПб., 2002. 25 с. [Determination of interferon status as a method for assessing immunoreactivity in various forms of pathology. Manual for doctors]. Moscow, St. Petersburg, 2002. 25 p.
7. Рейзис А.Р. Синдром Жильбера. Современные воззрения, исходы и терапия // Internist.ru – Всероссийская Образовательная Интернет-Программа для Врачей: Гепатология [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://internist.ru/publications/detail/sindrom-zhilbera-sovremennye-vozzreniya-ishody-i-terapiya/>. [Reizis A.R. Gilbert syndrome. Modern views, outcomes, and therapy. Internist.ru, All-Russian Educational Internet Program for Doctors: Hepatology [Electronic resource]. Access mode: <https://internist.ru/publications/detail/sindrom-zhilbera-sovremennye-vozzreniya-ishody-i-terapiya/>.
8. Сологуб Т.В., Ледванов М.Ю., Малый В.П., Стукова Н.Ю., Романцов М.Г., Бизенкова М.Н., Полякова Т.Д. Иммунный ответ при вирусных инфекциях // Успехи современного естествознания, 2009. Т. 12. С. 29-33. [Sologub T.V., Ledvanov M.Yu., Maly V.P., Stukova N.Yu., Romantsov M.G., Bizenkova M.N., Polyakova T.D. Immune response in viral infection. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* = *Advances in Current Natural Sciences*, 2009, Vol. 12, pp. 29-33. (In Russ.)]
9. Corcioli F., Zakrzewska K., Rinieri A., Fanci R., Innocenti M., Civinini R., de Giorgi V, di Lollo S., Azzi A. Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J. Med. Virol.*, 2008, Vol. 80, pp. 2005-2011.
10. Gama B.E., Emmel V.E., Oliveira-Silva M., Gutiyama L.M., Arcuri L., Colares M., Tavares R. de C., Bouzas L.F., Abdelhay E., Hassan R. Parvovirus B19 in the context of hematopoietic stem cell transplantation: evaluating cell donors and recipients. *Transplant. Direct*, 2017, Vol. 3, no. 11, e217. doi:10.1097/TXD.0000000000000731.
11. Jon B., Suzich A.R. Cliffe Strength in diversity: understanding the pathways to herpes simplex virus reactivation. *Virology*, 2018, Vol. 522, pp. 81-91.
12. Khamitova I.V., Lavrentyeva I.N., Averyanova M.Y., Chukhlov A.B., Zubarovskaya L.S., Afanasyev B.V. Parvovirus B19 incidence, specific antibody response, and delayed hematopoietic recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cellular Therapy and Transplantation*, 2018, Vol. 7, no. 1, pp. 36-43.
13. Naciute M., Mieliauskaite D., Rugiene R., Maciunaite G., Mauricas M., Murovska M., Girkontaite I. Parvovirus B19 infection modulates the levels of cytokines in the plasma of rheumatoid arthritis patients. *Cytokine*, 2017, Vol. 96, pp. 41-48.
14. Rosato P.C., Leib D.A. Neurons versus herpes simplex virus: the innate immune interactions that contribute to a host-pathogen standoff. *Future Virol.*, 2015, Vol. 10, no. 6, pp. 699-714.
15. Wua J., Chena X., Yea H., Yaoa M., Lia Sh., Chen L. Nonstructural protein (NS1) of human parvovirus B19 stimulates hostinnate immunity and blunts the exogenous type I interferon signaling *in vitro*. *Virus Res.*, 2016, Vol. 222, pp. 48-52.

Авторы:

Антипова А.Ю. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Дробышевская В.Г. — врач клинической лабораторной диагностики центральной клинико-диагностической лаборатории, врач аллерголог-иммунолог дневного стационара медицинского центра, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Хамитова И.В. — заведующая центральной клинико-диагностической лабораторией ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Antipova A. Yu., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Drobyshevskaya V.G., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory; Allergologist-Immunologist, Daytime Hospital of the Medical Center; Junior Research Associate, Laboratory of Immunology and Virology of HIV, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Khamitova I.V., Head, Central Clinical Diagnostic Laboratory, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 01.04.2021
Принята к печати 26.04.2021

Received 01.04.2021
Accepted 26.04.2021

ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ CD80 И HLA-DR НА МОНОЦИТАХ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Чурина Е.Г.^{1,2}, Попова А.В.¹, Уразова О.И.^{1,3}, Патышева М.Р.^{2,4},
Чумакова С.П.¹, Колобовникова Ю.В.¹, Казакова Е.О.²

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

³ ФГБОУ ВО «Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники», г. Томск, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Резюме. В работе исследованы особенности экспрессии провоспалительных молекул CD80 и HLA-DR на моноцитах у больных туберкулезом легких, в зависимости от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным лекарственным средствам. Обследовано 45 пациентов с впервые выявленным ТБ легких (25 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 55 лет, средний возраст — $44,0 \pm 12,4$ лет). В контрольную группу вошли 15 здоровых доноров с соответствующими группой больных ТБ характеристиками. Материалом исследования служила венозная кровь. Исследование иммунофенотипа моноцитов проводили методом проточной цитометрии в цельной крови с использованием моноклональных антител (eBioscience, USA) на проточном цитометре Cytotex (Beckman Coulter, США). Определяли содержание клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры моноцитов: CD14, CD45, CD80 и HLA-DR. Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ SPSS Statistics 17.0 и Microsoft Excel. В ходе проведения исследования нами сформулирована научная гипотеза, согласно которой, моноциты у больных ТБ, еще находясь в циркуляции, в процессе миграции в очаг воспаления, могут экспрессировать маркеры активации, ключевыми из которых являются молекулы CD80 и HLA-DR. Анализ общего количества CD14⁺ моноцитов показал его снижение при всех формах и вариантах течения туберкулеза легких по сравнению с группой контроля. Оценка экспрессии провоспалительных маркеров — маркера активации HLA-DR и молекулы костимуляции CD80 на CD14-позитивных моноцитах — показала, что у всех больных ТБ численность моноцитов с экспрессией HLA-DR была выше, чем у здоровых доноров. В группе больных ИТБ экспрессия HLA-DR на CD14⁺ моноцитах была на 15% выше, чем у больных с ДТБ. Экспрессия CD80 на CD14⁺ моноцитах у больных ТБ не имела межгрупповых различий и варьировала в пределах нормы. Таким образом, дисбаланс в структуре моноцитов крови у больных туберкулезом легких, независимо от его клинической формы и лекарственной чувствительности

Адрес для переписки:

Чурина Елена Георгиевна
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (913) 806-07-00.
E-mail: Lena1236@yandex.ru

Address for correspondence:

Churina Elena G.
Siberian State Medical University
634050, Russian Federation, Tomsk, Moskovsky trakt, 2.
Phone: 7 (913) 806-07-00.
E-mail: Lena1236@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Чурина, А.В. Попова, О.И. Уразова, М.Р. Патышева, С.П. Чумакова, Ю.В. Колобовникова, Е.О. Казакова «Экспрессия молекул CD80 и HLA-DR на моноцитах крови у больных туберкулезом легких» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1183–1190.
doi: 10.15789/1563-0625-EOC-2348
© Чурина Е.Г. и соавт., 2021

For citation:

E.G. Churina, A.V. Popova, O.I. Urazova, M.R. Patysheva, S.P. Chumakova, Yu.V. Kolobovnikova, E.O. Kazakova "Expression of CD80 and HLA-DR molecules on blood monocytes in patients with pulmonary tuberculosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1183–1190.
doi: 10.15789/1563-0625-EOC-2348
DOI: 10.15789/1563-0625-EOC-2348

возбудителя, развивается вследствие снижения общего количества CD14⁺ клеток при повышении от-носительного числа моноцитов, экспрессирующих маркер активации HLA-DR (провоспалительный фенотип); при этом экспрессия молекулы костимуляции CD80 на моноцитах соответствует норме.

Ключевые слова: моноциты, туберкулез легких, врожденный иммунитет, иммунный ответ, CD80, HLA-DR

EXPRESSION OF CD80 AND HLA-DR MOLECULES ON BLOOD MONOCYTES IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Churina E.G.^{a, b}, Popova A.V.^a, Urazova O.I.^{a, c}, Patysheva M.R.^{b, d}, Chumakova S.P.^a, Kolobovnikova Yu.V.^a, Kazakova E.O.^b

^a Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^b National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

^c Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics, Tomsk, Russian Federation

^d Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Abstract. We examined expression pattern of CD80 and HLA-DR pro-inflammatory molecules on the monocytes in patients with pulmonary tuberculosis (TB), depending on the clinical form of the disease and susceptibility of the pathogen to anti-tuberculosis drugs. The study involved forty-five patients with newly diagnosed pulmonary TB (25 men and 20 women aged 18 to 55 years, average age – 44.0±12.4 years). The control group included 15 healthy donors with similar socio-demographic characteristics as in TB patients. Venous blood was used as biomaterial for assays. Studies of the monocyte immunophenotype were carried out by flow cytometry of whole blood cells using Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter, USA) with specific monoclonal antibodies (eBioscience, USA). We determined the content of cells expressing surface markers of monocytes, i.e., CD14, CD45, CD80, and HLA-DR. The results of this study were evaluated using SPSS Statistics 17.0 standard software package and Microsoft Excel. In the course of the study, we have suggested a working hypothesis that the monocytes in TB patients, still being in circulation, can express activation markers during their migration to inflammation focus, especially CD80 and HLA-DR molecules. Analysis of the total CD14⁺ monocyte number showed its decrease in all forms and variants of clinical course of pulmonary tuberculosis compared with the control group. Assessment of pro-inflammatory markers expressed on CD14 positive monocytes, i.e., HLA-DR activation marker and CD80 co-stimulatory molecule, showed that the number of monocytes with HLA-DR expression in all TB patients was higher than in healthy donors. HLA-DR expression on CD14⁺ monocytes in the group of patients with infiltrative TB proved to be 15% higher than in patients with disseminated TB. The expression of CD80 on CD14⁺ monocytes in TB patients showed no differences between the groups and varied within the normal range. Hence, an imbalance within monocyte population in patients with pulmonary tuberculosis, regardless of its clinical form and drug sensitivity of the pathogen is developed, due to decrease in total number of CD14⁺ cells, along with increased relative number of monocytes expressing HLA-DR activation marker (pro-inflammatory phenotype). Meanwhile, expression of the CD80 co-stimulatory molecule on monocytes was within normal values.

Keywords: monocytes, pulmonary tuberculosis, innate immunity, immune response, CD80, HLA-DR

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 19-315-90018), Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (НШ-2690.2018.7).

Введение

Моноциты — мононуклеарные миелоидные клетки, которые развиваются в костном мозге и циркулируют в кровотоке. Моноциты играют зна-

чимую роль в иммунном ответе на *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Пополнение пула резидентных альвеолярных макрофагов происходит за счет активной миграции моноцитов в очаг воспаления. Провоспалительные моноциты представляют собой промежуточную стадию дифференцировки классически активированных М1-макрофагов, с высоким иммуновоспалительным потенциалом и, таким образом, способствуют эффективной реализации врожденных механизмов противотуберкулезного иммунитета [9].

Известно, что инфицирование человеческих моноцитов *Mtb in vitro* влияет на их дифференцировку. Так, моноциты, инфицированные *Mtb*, имели меньшее количество гранул, низкую экспрессию молекул МНС класса II, рецепторов CD16, CD36, CD86 и демонстрировали пониженное количество цитоплазматических выступов по сравнению с клетками, дифференцированными в отсутствие микобактерий. Инфицированные клетки продуцировали меньше провоспалительных цитокинов IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF α и высокое количество IL-1 β в ответ на стимуляцию бактериальным липополисахаридом [2]. Течение туберкулеза легких (ТБ) сопровождается как избыточной активацией, повреждающей ткань легких, так и супрессией иммунного ответа, причем клиническая манифестация заболевания и его прогрессирующее течение связаны, как правило с дефицитом факторов врожденной иммунной защиты, в том числе с дисфункцией моноцитов/макрофагов. В связи с изложенным, целью работы явилось оценить экспрессию провоспалительных молекул CD80 и HLA-DR на моноцитах крови у больных туберкулезом легких, в зависимости от клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам.

Материалы и методы

Всего было обследовано 45 пациентов с впервые выявленным ТБ легких (25 мужчин и 20 женщин в возрасте от 18 до 55 лет, средний возраст — 44,0 $\pm$ 12,4 лет). Все пациенты были разделены на две группы по форме заболевания: группу с инфильтративным туберкулезом легких (ИТБ) составили 27 человек, группу с диссеминированным туберкулезом легких (ДТБ) — 18 человек. При делении больных ТБ на группы учитывалась чувствительность возбудителя к основным противотуберкулезным средствам (ПТС): группу пациентов, выделяющих *Mtb*, чувствительные к основным ПТС, составили 34 человека, во вторую

группу были включены 11 пациентов, выделяющих *Mtb*, устойчивые к ПТС основного ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу). В контрольную группу вошли 15 здоровых доноров с соответствующими группе больных ТБ характеристиками по полу и возрасту (10 мужчин и 5 женщин в возрасте от 18 до 55 лет, средний возраст 44,2 $\pm$ 12,4 лет).

Материалом (объектом) исследования служила венозная кровь. Забор крови проводился утром натощак из локтевой вены до начала проведения химиотерапии ПТС. Исследование иммунофенотипа моноцитов проводили методом проточной цитометрии в цельной крови с использованием моноклональных антител (eBioscience, США) на проточном цитофлуориметре Cytotflex (Beckman Coulter, США). Обработку полученных данных проводили с помощью программы CytExpert 2.0. Определяли содержание клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры моноцитов: CD14, CD45, CD80 и HLA-DR. Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ SPSS Statistics 17.0 и Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Анализ общего количества CD14⁺ моноцитов показал его снижение у больных туберкулезом легких (ТБ) независимо от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам (ПТС) по сравнению с их численностью у здоровых доноров (табл. 1, рис. 1).

Оценка экспрессии провоспалительных маркеров — маркера активации HLA-DR и молекулы костимуляции CD80 на CD14⁺-позитивных моноцитах — показала, что у всех больных ТБ численность моноцитов с экспрессией HLA-DR была выше, чем у здоровых доноров. В группе больных ИТБ экспрессия HLA-DR на CD14⁺ моноцитах была на 15% выше, чем у больных с ДТБ. Экспрессия CD80 на CD14⁺ моноцитах у больных ТБ не имела межгрупповых различий и варьировала в пределах нормы (табл. 1).

Высокая эффективность активации врожденного иммунитета при туберкулезе легких (ТБ) играет решающую роль в развитии и исходах заболевания. Нарушения индуктивной фазы иммунного ответа часто связаны с формированием толерантности к антигену уже на стадии его презентации. Мобилизация моноцитов и поступление их в системный кровоток из костного мозга всегда обусловлены усиленной антигенной на-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ CD14⁺ МОНОЦИТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МОЛЕКУЛЫ CD80 И HLA-DR, В КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИЧЕСКОЙ ФОРМЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ К ПТС (%), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONTENT OF CD14⁺ MONOCYTES, EXPRESSING CD80 AND HLA-DR MOLECULES, IN THE BLOOD IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS, DEPENDING ON THE CLINICAL FORM OF THE DISEASE AND ON THE DRUG SENSITIVITY OF THE PATHOGEN TO ANTI-TB (%), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Наименование моноцитов и их содержание, % Name of monocytes and their content, %	Здоровые доноры Healthy donors	Больные ИТБ Patients with infiltrative tuberculosis	Больные ДТБ Patients with disseminated tuberculosis	Больные ЛЧ ТБ Patients with drug-sensitive tuberculosis	Больные ЛУ ТБ Patients with drug-resistant tuberculosis
моноциты, % monocytes, % CD14 ⁺	88,01 (77,23-91,72)	75,12* (56,43-96,51)	73,22* (39,27-87,56)	75,13* (61,22-87,01)	76,22 (59,21-90,11)
моноциты, % monocytes, % CD14 ⁺ CD80 ⁺	1,11 (0,64-2,13)	1,72 (0,56-1,92)	1,53 (0,71-1,82)	1,03 (0,51-1,52)	0,82 (0,56-1,82)
моноциты, % monocytes, % CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	50,51 (34,04-59,17)	78,24* (60,51-89,52)	66,54** (32,22-80,23)	72,21* (63,12-83,41)	79,56* (63,57-86,51)

Примечание. * – уровень статистической значимости различий по сравнению со значением показателя у здоровых доноров $p < 0,05$; ** – у больных ИТБ.

Note. *, the level of statistical significance of differences compared to the value of the indicator in healthy donors $p < 0.05$; **, in patients with ITB.

грузкой, запросом на резидентные макрофаги иммунной системы при развитии воспаления.

К общепризнанным феноменам моноцитов/макрофагов относят высокую чувствительность к сигналам микроокружения и определяющее влияние этих сигналов на изменение фенотипических и функциональных свойств клеток [3, 11]. Для понимания роли макрофагов в определенном органе необходимо использовать комплексный подход для изучения характеристик данной популяции клеток. Моноцит – циркулирующий вариант клеток ретикулоэндотелиальной системы, в то время как макрофаг – тканевый. Превращение моноцита в макрофаг, как правило, происходит под влиянием клеточного и тканевого микроокружения, приводит к экспрессии в ядре клетки новых генов и рассматривается как дифференцировка, регулируемая колониестимулирующим фактором макрофагов (M-CSF).

В ходе проведения исследования нами была сформулирована научная гипотеза, согласно которой моноциты у больных ТБ, еще находясь в

циркуляции, в процессе миграции в очаг воспаления, могут экспрессировать маркеры активации, ключевыми из которых являются молекулы CD80 и HLA-DR.

В ходе фенотипирования моноцитов мы установили, что при общем снижении численности циркулирующих CD14-позитивных моноцитов крови у больных ТБ независимо от его клинической формы и чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) к ПТС отмечается высокая экспрессия маркеров активации клеток по провоспалительному фенотипу (HLA-DR-позитивные моноциты). Эти изменения наиболее выражены у больных ИТБ и ЛУ ТБ. Интересно, что экспрессия костимулирующей молекулы CD80 на моноцитах крови не отличалась от группы контроля во всех обследованных группах больных ТБ (табл. 1).

Известно, что костимулирующая молекула CD80, наряду с маркером CD86, является членом семейства молекул B7 [7]. Маркеры CD80 и CD86 обнаружены не только на дендритных клетках,

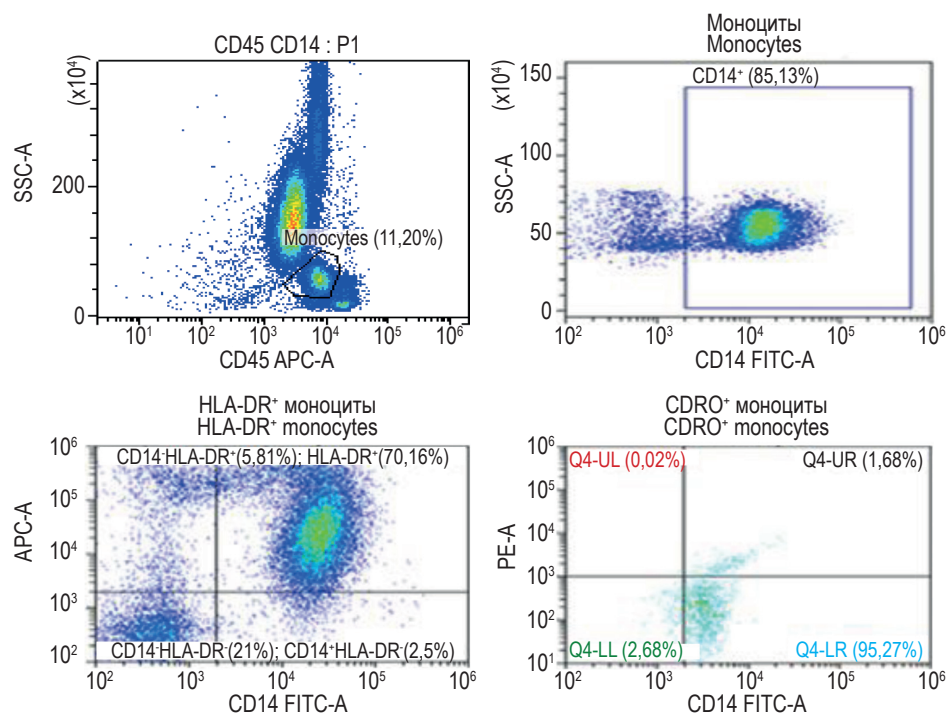


Рисунок 1. Скатерограммы распределения CD14-позитивных моноцитов в крови здорового донора

Примечание. Экспрессия провоспалительных маркеров HLA-DR и CD80 на CD14⁺ моноцитах у здоровых доноров, %.

Figure 1. Distribution scan pattern of CD14-positive monocytes in the blood of a healthy donor

Note. Expression of pro-inflammatory markers of HLA-DR and CD80 on CD14⁺ monocytes in healthy donors, %.

активированных В-клетках и макрофагах, но и на непрофессиональных антигенпрезентирующих клетках [10]. Молекула CD80, очень часто в тандеме с CD86, играет важную роль в регуляции как адаптивного, так и врожденного иммунитета. Эти молекулы являются лигандами для рецептора CD28 на наивном Т-лимфоците и их взаимодействие — важный костимулирующий сигнал в иммунологическом синапсе между макрофагом и Т-клеткой, который приводит к активации, пролиферации и дифференцировке Т-клеток в необходимом направлении [12]. CD80 является ключевым маркером активации моноцитов/макрофагов и в отсутствие антигенной нагрузки он не экспрессируется на клетках [14]. При воспалении взаимодействие макрофага через антиген главного комплекса гистосовместимости МНС-II с рецептором на Т-клетке приводит к активации CD80 [1].

Поскольку молекула CD86 экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках конститутивно, а для их активации необходима, в первую

очередь, молекула CD80, то отсутствие статистически значимых изменений экспрессии CD80 на моноцитах крови у больных ТБ в сравнении с группой контроля свидетельствует о недостаточности провоспалительного потенциала моноцитов при туберкулезной инфекции при наличии антигена в организме.

HLA-DR конститутивно экспрессируется на моноцитах, макрофагах и дендритных клетках. Моноциты здоровых людей экспрессируют на своей поверхности молекулы HLA-DR с высокой степенью плотности. Экспрессия маркера на моноцитах имеет ключевое значение для презентации микробных пептидов Т-клеткам, что способствует инициации адаптивного иммунного ответа [15]. Многие исследования показали отрицательную роль снижения экспрессии HLA-DR на макрофагах. Моноциты и макрофаги со сниженной или отсутствующей экспрессией молекул HLA-DR не могут выполнять свою антигенпрезентирующую функцию. Поэтому изменение экспрессии HLA-DR на моноцитах/

макрофагах считается оптимальным маркером динамики иммунного ответа у пациентов в критическом состоянии, например, при развитии сепсиса [13]. Снижение экспрессии HLA-DR на моноцитах описано при травмах, после операций, при остром панкреатите и обширных ожогах [5, 6]. Имеются данные о том, что при развитии внутрибольничной инфекции снижение экспрессии на моноцитах HLA-DR в дальнейшем способствовало развитию bacteriemia [4, 8]. Установленную нами высокую экспрессию HLA-DR на поверхности моноцитов у больных ТБ в целом можно рассматривать как позитивную тенденцию. Наличие маркера активации свидетельствует о сохранении антигенпрезентирующей функции клеток в ответ на проникновение *Mtb* в организм хозяина. Интересно, что в группе больных ИТБ — наиболее благоприятной клинической формой, экспрессия провоспалительного маркера HLA-DR на CD14⁺ моноцитах была на 15% выше, чем у больных с ДТБ (табл. 1). Таким образом, изучение экспрессии на моноцитах мо-

лекул CD80 и HLA-DR у больных туберкулезом легких позволило нам прийти к заключению, что предшественники макрофагов — моноциты — уже в процессе миграции в очаг воспаления начинают приобретать провоспалительный фенотип — экспрессировать маркеры активации и костимуляции, что в дальнейшем, вероятно, будет способствовать их трансформации в M1-макрофаги в очаге воспаления.

Выводы

Дисбаланс в структуре моноцитов крови у больных туберкулезом легких независимо от его клинической формы и лекарственной чувствительности возбудителя к противотуберкулезным средствам развивается вследствие снижения общего количества CD14⁺ клеток при повышении относительного числа моноцитов, экспрессирующих маркер активации HLA-DR, при этом экспрессия молекулы костимуляции CD80 на моноцитах соответствует норме.

Список литературы / References

1. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology: textbook]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
2. Castano D., Garcia L.F., Rojas M. Increased frequency and cell death of CD16⁺ monocytes with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*, 2011, Vol. 91, no. 5, pp. 348-360.
3. Gordon S., Pluddemann A., Estrada F.M. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 262, no. 1, pp. 36-55.
4. Grimaldi D., Louis S., Pène F., Sirgo G., Rousseau C., Claessens L., Vimeux Y.E., Cariou A., Mira J.P., Hosmalin A., Chiche J.D. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.*, 2011, Vol. 37, no. 9, pp. 1438-1446.
5. Monneret G., Lepape A., Voirin N., Bohé J., Venet F., Debarb A.L., Thizy H., Bienvenu J., Gueyffier F., Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.*, 2006, Vol. 32, no. 8, pp. 1175-1183.
6. Monneret G., Venet F., Pachot A., Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol. Med.*, 2008, Vol. 14, no. 1/2, pp. 64-78.
7. Peyravian N., Gharib E., Moradi A., Mobahat M., Tarban P., Azimzadeh P., Nazemalhosseini-Mojarad E., Aghdaei H.A. Evaluating the expression level of co-stimulatory molecules CD 80 and CD 86 in different types of colon polyps. *Curr. Res. Transl. Med.*, 2018, Vol. 66, no. 1, pp. 19-25.
8. Poehlmann H., Schefold J.C., Zuckermann-Becker H., Volk H.D., Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit. Care.*, 2009, Vol. 13, no. 4, R119. doi: 10.1186/cc7969.
9. Sampath P., Moideen K., Ranganathan U.D., Bethunaickan R. Monocyte subsets: phenotypes and function in tuberculosis infection. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1726. doi: 10.3389/fimmu.2018.01726.
10. Scarpa M., Brun P., Scarpa M., Morgan S., Porzionato A., Kotsafti A., Bortolami M., Buda A., Dina R., Macchi V., Sturmiolo G.C., Rugge M., Bardini R., Castagliuolo I., Angriman I., Castoro C. CD80-CD28 signaling controls the progression of inflammatory colorectal carcinogenesis. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, no. 24, pp. 20058-20069.
11. Sica A., Erreni M., Allavena P., Porta C. Macrophage polarization in Pathology. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2015, Vol. 72, no. 1, pp. 4111-4126.
12. Tae A.G., Khaled C.M., Barakat H. Revealing the atomistic details behind the binding of B7-1 to CD28 and CTLA-4: A comprehensive protein-protein modelling study. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, 2018, Vol. 1862, no. 12, pp. 2764-2778.

13. Venet F, Lukaszewicz A.C., Payen D., Hotchkiss R., Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr. Opin Immunol.*, 2013, Vol. 25, no. 4, pp. 477-483.
14. Wang L.X., Mei Z.Y., Zhou J.H., Yao Y.S., Li Y.H., Xu Y.H., Li J.X., Gao X.N., Zhou M.H., Jiang M.M., Gao L., Ding Y., Lu X.C., Shi J.L., Luo X.F., Wang J., Wang L.L., Qu C., Bai X.F., Yu L. Low dose decitabine treatment induces CD80 expression in cancer cells and stimulates tumor specific cytotoxic T lymphocyte responses. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 5, e62924. doi: 10.1371/journal.pone.0062924.
15. Zhuang Y., Peng H., Chen Y., Zhou S., Chen Y. Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, 2017, Vol. 22, pp. 1344-1354.

Авторы:

Чурина Е.Г. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры органической химии и ведущий научный сотрудник лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

Попова А.В. — аспирант кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Уразова О.И. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры комплексной информационной безопасности электронно-вычислительных систем ФГБОУ ВО «Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники», г. Томск, Россия

Патышева М.Р. — младший научный сотрудник лаборатории биологии опухолевой прогрессии, Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; младший научный сотрудник лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

Authors:

Churina E.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University; Professor, Department of Organic Chemistry, Leading Research Associate of Laboratory of Translational Cell and Molecular Biomedicine, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Popova A.V., Postgraduate Student, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Urazova O.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Pathophysiology Division, Siberian State Medical University; Professor, Department of Complex Information Security of Computer Systems, Tomsk State University of Control Systems and Radioelectronics, Tomsk, Russian Federation

Patysheva M.R., Junior Research Associate, Laboratory of Tumor Progression Biology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Junior Research Associate, Laboratory of Translational Cell and Molecular Biomedicine, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Чумакова С.П. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Колобовникова Ю.В. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Казакова Е.О. — младший научный сотрудник лаборатории трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

Chumakova S.P., PhD, MD (Medicine) Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Kolobovnikova Yu.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Kazakova E.O., Junior Research Associate, Laboratory of Translational Cell and Molecular Biomedicine, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 24.04.2021
Принята к печати 27.04.2021

Received 24.04.2021
Accepted 27.04.2021

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРОВ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА В ПЕРИОД АДАПТАЦИИ К ОБУЧЕНИЮ В МЕДИЦИНСКОМ ВУЗЕ

Сизякина Л.П., Андреева И.И., Уразмамбетов Р.Т., Чеботов С.А.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Адаптация к новым социальным условиям при поступлении в медицинский вуз — одно из неизбежных обстоятельств, с которым сталкиваются первокурсники. Иммунная система, являющаяся частью единого структурно-функционального комплекса гомеостаза, вовлечена в адаптационные реакции, ее участие в приспособлении к новому образу жизни у студентов-первокурсников не вызывает сомнений. Необходимо отметить, что существуют особенности реакции иммунной системы в зависимости от условий организации учебного процесса: несмотря на общность учебной программы, обстоятельства обучения первокурсников военного учебного центра (ВУЦ) отличны от таковых для студентов лечебно-профилактического факультета (ЛПФ).

Цель — сопоставление количественных и функциональных параметров иммунной системы студентов-первокурсников медицинского вуза в зависимости от особенностей организации учебного процесса.

Под наблюдением находились 36 студентов-первокурсников медицинского университета, разделенные на две группы, сопоставимые по возрасту, полу, физическому состоянию. В первую вошли 18 первокурсников ВУЦ, во вторую — 18 обучающихся ЛПФ. Исследование иммунологических показателей в периферической крови проводили через три месяца после начала обучения. Определяли количество и функциональный потенциал Т-лимфоцитов, их субпопуляционный состав, количество В-лимфоцитов и сывороточный уровень иммуноглобулинов классов А, М и G, общее количество и долю цитолитически активных форм натуральных киллеров, кислородпродуцирующую активность нейтрофилов, количество моноцитов периферического кровотока, экспрессирующих Toll-подобные рецепторы (TLR) 2-го, 4-го типов. Сопоставление показателей иммунной системы, характеризующих адаптивный иммунный ответ, принципиальных различий между группами не выявило. В то же время сравнительная характеристика показателей, отражающих функциональный потенциал клеточных факторов врожденного иммунитета, указала на наличие отличительных признаков реагирования в зависимости от факультета обучения первокурсников. Показано, что доля функционально активных форм NK-клеток, содержащих литические гранулы гранзима В, у студентов ВУЦ меньше. Также у военных студентов-медиков отмечается статистически значимо более низкое относительное и абсолютное количество моноцитов периферического кровотока, экспрессирующих на своей поверхности TLR 4.

Констатация признаков угнетения функционального потенциала клеток макрофагального ряда и натуральных киллеров у первокурсников ВУЦ является настораживающим фактором возможного

Адрес для переписки:

Чеботов Сергей Алексеевич
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону,
Нахичеванский пер., 29.
Тел.: 8 (863) 201-44-26.
E-mail: chebotovsergey@mail.ru

Address for correspondence:

Chebotov Sergey A.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Nakhichevan lane, 29.
Phone: 7 (863) 201-44-26.
E-mail: chebotovsergey@mail.ru

Образец цитирования:

Л.П. Сизякина, И.И. Андреева, Р.Т. Уразмамбетов, С.А. Чеботов «Характеристика параметров врожденного и приобретенного иммунного ответа в период адаптации к обучению в медицинском вузе» // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1191-1196. doi: 10.15789/1563-0625-COT-2393
© Сизякина Л.П. и соавт., 2021

For citation:

L.P. Siziakina, I.A. Andreeva, R.T. Urazmambetov, S.A. Chebotov "Characteristics of the parameters of the innate and acquired immune response during the period of adaptation to training at a Medical University", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1191-1196. doi: 10.15789/1563-0625-COT-2393
DOI: 10.15789/1563-0625-COT-2393

срыва адаптационных резервов системы иммунного реагирования. Полученные данные представляют интерес для разработки программ иммунореабилитации для профилактики клинической манифестации иммунной дисфункции.

Ключевые слова: адаптация, врожденный иммунитет, приобретенный иммунитет, обучение, медицинский вуз, студенты-медики

CHARACTERISTICS OF THE PARAMETERS OF THE INNATE AND ACQUIRED IMMUNE RESPONSE DURING THE PERIOD OF ADAPTATION TO TRAINING AT A MEDICAL UNIVERSITY

Sizyakina L.P., Andreeva I.A., Urazmambetov R.T., Chebotov S.A.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Adaptation for new social conditions is an inevitable factor which the first-year students undergo when entering a medical school. Immune system as a part of entire structural and functional homeostatic complex, is involved into the adaptive reactions, thus pointing to its participation in fitting the new lifestyle among first-year students. One should note some peculiarities of immune reactions which depend on the organization pattern of educational process: despite common features of studies, the training environment for beginners at the military training center (VTC) is different from those for students at the medical and preventive faculty (LPF). The purpose of our study was to compare quantitative and functional parameters of immune system in the first-year students at a medical university, depending on distinct features of educational arrangement.

The study included 36 first-year students of the Medical University divided into two groups, comparable for age, sex, and physical condition. The first group included 18 first-year VUTS students, whereas the second group consisted of 18 LPF pupils. Studies of immunological parameters in peripheral blood were carried out three months after the training was started. We have assessed counts and functional potential of T cells, their subpopulation profile, B lymphocyte counts, and serum level of IgA, IgM and IgG, total numbers of natural killer cells and proportion of cytolytically active forms, oxygen-producing activity of neutrophils, and the numbers of peripheral monocytes expressing type 2,4 Toll-like receptors (TLR). Comparison of the adaptive immune response parameters did not reveal any gross differences between the groups. At the same time, evaluation of markers reflecting functional potential of innate immunity cells revealed distinct signs of immune reactions, depending on the faculty of the first-year students. It has been shown that the proportion of functionally active NK-cells containing lytic granzyme B granules was lower in the EUTC students. Also, military medical students have a statistically significantly lower relative and absolute number of peripheral blood monocytes expressing surface TLR 4. The detected signs of suppressed functional potential of macrophages and natural killer cells in the first-year OUV students represent the possibly alarming factor of impaired adaptive reserves of immune system. The data obtained are of interest for development of immune rehabilitation programs to prevent clinical manifestations of immune dysfunction.

Keywords: adaptation, innate immunity, acquired immunity, training, medical university, medical students

Введение

Адаптация к новым социальным условиям при поступлении в медицинский вуз — одно из неизбежных обстоятельств, с которым сталкиваются первокурсники. Как известно, с физиологической точки зрения, адаптация — процесс приспособления к условиям существования с целью сохранения гомеостаза [3, 4, 7]. В результате формирования баланса в конструкции «организм-внешняя среда» гомеостатические системы подвергаются изменениям для поддержания своей эффективности. В силу того, что иммунная система, как одна из составляющих единого структурно-функционального комплекса гоме-

остаза, вовлечена в адаптационные реакции, ее участие в приспособлении к новому образу жизнедеятельности у студентов-первокурсников не вызывает сомнений [1, 10]. Вопрос возможного формирования изменений иммунного реагирования у априори практически здоровых молодых людей представляет интерес. Особого внимания заслуживает выявления особенностей реакции иммунной системы в зависимости от условий организации учебного процесса. Так, несмотря на общность учебной программы, обстоятельства обучения первокурсников военного учебного центра отличны от таковых для студентов лечебно-профилактического факультета. Факт воз-

возможного развития дисрегуляторных иммунных нарушений в адаптационных реакциях не исключается [6, 8], так же как и процесс трансформации физиологической интраиммунной дисрегуляции в клинически манифестированный вариант иммуноопосредованной патологии, что и определяет не только теоретический, но и практический аспект настоящего исследования.

Цель — сопоставление количественных и функциональных параметров иммунной системы студентов-первокурсников медицинского вуза в зависимости от особенностей организации учебного процесса.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 36 студентов-первокурсников (средний возраст 19 ± 2 года) медицинского университета. Обследуемые разделены на две группы. В первую вошли 18 первокурсников военного учебного центра (ВУЦ), во вторую — 18 студентов лечебно-профилактического факультета (ЛПФ). Критерии включения в I группу — мужской пол, обучение по программе военной подготовки. Критерии включения во II группу — мужской пол, обучение по программе лечебное дело, отсутствие хронической патологии. Критерием исключения для всех участников стала клиническая манифестация инфекционного процесса любой этиологии в течение трех месяцев, предшествовавших исследованию, женский пол. Группы были сопоставимы по возрасту (соответственно, лет: 19 ± 1 и 19 ± 2 , статистически значимых различий не было, $p > 0,05$), полу (все мужчины), физическому состоянию (соответствовали I группе здоровья).

Все участники исследования подписали информированное согласие в соответствии с протоколом, одобренным Локальным независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России (от 08.10.2020 г. № 15/20). Иммунологическое исследование периферической крови проводили через три месяца после начала обучения. Исследовали количество и функциональный потенциал Т-лимфоцитов, их субпопуляционный состав, количество В-лимфоцитов и сывороточный уровень иммуноглобулинов классов А, М и G, общее количество и долю цитолитически активных форм натуральных киллеров (NK), кислородпродуцирующую активность нейтрофилов, количество моноцитов периферического кровотока, экспрессирующих Toll-подобные рецепторы 2-го, 4-го типов (TLR). При характеристике перечисленных параметров иммунной системы исходили из стандартных методологических подходов [9]: использовали проточную цитофлуориметрию (Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США) и соответствующие поставленным задачам наборы моноклональных антител с двух и трехцветной меткой (про-

изводство Beckman Coulter, США). Образование активных форм кислорода нейтрофилами фиксировали с помощью НСТ-теста, а уровень иммуноглобулинов сыворотки крови — методом радиальной иммунодиффузии по Манчини. Статистические расчеты выполняли в программы StatTech v. 1.2.0 и Statistica SPSS v. 26. Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна-Уитни, а группы, имеющие нормальное распределение, сравнивались с помощью параметрического t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Сопоставление показателей иммунной системы, характеризующих адаптивный иммунный ответ, выявил лишь один параметр, статистически значимо отличный между исследуемыми группами: относительное количество Т-эффекторной субпопуляции у студентов ВУЦ превышает аналогичный показатель группы ЛПФ. Однако в абсолютном исчислении количество $CD8^+$ лимфоцитов в обеих исследуемых группах не имеет различий, так же как и все остальные оцененные в нашем исследовании параметры адаптивного иммунитета (табл. 1).

В то же время сопоставительная характеристика показателей, характеризующих функциональный потенциал клеточных факторов врожденного иммунитета, выявила наличие отличительных признаков реагирования у обучающихся первокурсников в зависимости от факультета (табл. 2). Эти отличия касаются лимфоидной популяции системы врожденного иммунного ответа. Так, несмотря на то, что относительное и абсолютное количество NK-клеток в обеих сравниваемых группах находится на одном уровне, доля функционально активных форм NK, содержащих литические гранулы гранзима В, у студентов ВУЦ меньше. Следует отметить, что этот параметр снижен как в относительных, так и в абсолютных показателях. Другой тип клеток, анализ свойств которых выявил статистически значимые отличия между исследуемыми группами, относится к макрофагальному ряду. Установлено, что у военных студентов-медиков статистически значимо ниже и относительное, и абсолютное количество моноцитов периферического кровотока, экспрессирующих на своей поверхности Toll-подобные рецепторы четвертого типа (табл. 2).

Анализ полученных результатов обращает внимание на то обстоятельство, что параметры адаптивного иммунитета в обеих группах наблюдения статистически значимо не отличались, в отличие от показателей, отвечающих за первичную антигеннеспецифическую реактивность. Следует отметить, что в настоящее время

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ АДАПТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПЕРВОКУРСНИКОВ РАЗЛИЧНЫХ ФАКУЛЬТЕТОВ МЕДИЦИНСКОГО ВУЗА, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. INDICATORS OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE OF FIRST-YEAR STUDENTS OF VARIOUS FACULTIES OF A MEDICAL UNIVERSITY, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Indicator	ВУЦ (n = 18) MTC (n = 18)	ЛПФ (n = 18) MPF (n = 18)	p
CD3 ⁺ , %	73 (69,50-76,25)	72 (65-76)	0,362
CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ , × 10 ⁹ /л	1,44 (1,90-1,63)	1,37 (1,90-1,66)	0,92
CD4 ⁺ , %	40,5 (37,50-43,25)	43 (38,0-46,0)	0,23
CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD4 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,78 (0,68-0,91)	0,82 (0,75-0,97)	0,31
CD8 ⁺ , %	30 (29,0-35,7)	28 (24-31)	0,02*
CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD8 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,6 (0,53-0,73)	0,55 (0,45-0,61)	0,15
CD8 ⁺ Gr ⁺ , %	11 (6,50-25,00)	15 (11-18)	0,759
CD8 ⁺ Gr ⁺ , × 10 ⁹ /л CD8 ⁺ Gr ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,2 (0,11-0,42)	0,31 (0,21-0,36)	0,891
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , %	2,6 (1,8-3,3)	2,1 (1,7-3,2)	0,36
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,04 (0,03-0,04)	0,03 (0,02-0,05)	0,76
CD19 ⁺ , %	8,72±2,92	8,74±3,20	0,99
CD19 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD19 ⁺ , × 10 ⁹ /л	0,16 (0,13-0,22)	0,17 (0,11-0,21)	0,83
IgA, г/л IgA, g/l	1,7 (1,26-2,22)	1,5 (1,10-1,99)	0,6
IgM, г/л IgM, g/l	1,14 (1,06-1,24)	1,2 (1,07-1,25)	0,51
IgG, г/л IgG, g/l	11,6 (11,28-11,98)	11,9 (10,99-13,14)	0,287

Примечание. * – различия статистически значимы при $p \leq 0,05$, согласно Манну–Уитни.

Note. *, the differences are statistically significant at $p \leq 0.05$, according to Mann–Whitney.

кардинально изменилось представление о значимости факторов врожденного иммунного ответа в иммуногенезе в целом. Клеточным элементам этого типа присуща не только элиминирующая доиммунная функция первичного реагирования, но и регуляция силы и направленности специфического иммунного ответа [11, 12]. Тот факт, что наше наблюдение не выявило не только значимых изменений показателей адаптивных реакций, но и выраженных клинических проявлений иммунной дисфункции в обеих группах в период наблюдения, документирует компенсаторные возможности иммунной системы. С другой стороны, констатация признаков угнетения функциональных потенций клеток макрофагального ряда и натуральных киллеров является настораживающим фактором возможного срыва адаптационных резервов системы иммунного реагирования, особенно в условиях неблагоприятного внешнего воздействия. Так, известно, что

лимфоциты врожденного иммунитета являются «психогенно чувствительным» компонентом иммунной системы, а продолжительный стресс любого генеза способствует снижению активности НК-клеток и, соответственно, формированию предпосылок для клинической манифестации несостоятельности их эффектов [2]. Показанное в наших исследованиях снижение литической функции НК у студентов ВУЦ в сравнении с первокурсниками ЛПФ согласуется с отмеченными выше литературными данными и представляет интерес с позиции контроля формирования признаков вторичной иммунной недостаточности. Небезынтересны и результаты, констатирующие снижение экспрессии TLR 4 на моноцитах периферического кровотока у военных студентов-медиков. Известно, что качественное и количественное снижение активности TLR может привести к формированию атипичных воспали-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПЕРВОКУРСНИКОВ РАЗЛИЧНЫХ ФАКУЛЬТЕТОВ МЕДИЦИНСКОГО ВУЗА, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. INDICATORS OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE OF FIRST-YEAR STUDENTS OF VARIOUS FACULTIES OF A MEDICAL UNIVERSITY, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Indicator	ВУЦ (n = 18) MTC (n = 18)	ЛПФ (n = 18) MPF (n = 18)	p
НСТ сп., у. е. NBT sp., c. u.	96 (88-102)	94,5 (83,8-101,0)	0,37
Кст. НСТ, Ед. Cs. NBT, Ed.	1,6 (1,5-1,7)	1,7 (1,60-1,73)	0,06
CD16 ⁺ , %	14 (11-20)	14 (11,75-18,25)	0,53
CD16 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD16 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,28 (0,19-0,43)	0,26 (0,21-0,41)	0,58
CD16 ⁺ Gr ⁺ , %	10 (7-13)	3 (1,9-4,8)	0,0001*
CD16 ⁺ Gr ⁺ , × 10 ⁹ /л CD16 ⁺ Gr ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,2 (0,14-0,28)	0,06 (0,02-0,10)	0,0001*
CD14 ⁺ CD282 ⁺ , %	70 (66-78)	74 (66,5-78,5)	0,49
CD14 ⁺ CD282 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD14 ⁺ CD282 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,2 (0,08-0,40)	0,34 (0,23-0,39)	0,17
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , %	19 (13-24)	13,5 (10-18)	0,03*
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , × 10 ⁹ /л CD14 ⁺ CD284 ⁺ , × 10 ⁹ /l	0,04 (0,01-0,06)	0,08 (0,03-0,11)	0,01*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

тельных процессов, доминированию условно-патогенной микрофлоры [13, 14].

Заключение

В период адаптации к обучению в медицинском вузе выявляются различия в параметрах функционирования иммунной системы у первокурсников в зависимости от особенностей организации учебного процесса. Констатация

признаков угнетения функционального потенциала клеток макрофагального ряда и натуральных киллеров у первокурсников ВУЦ является настораживающим фактором возможного срыва адаптационных резервов системы иммунного реагирования. Полученные данные представляют интерес для разработки программ иммунореабилитации для профилактики клинической манифестации иммунной дисфункции.

Список литературы / References

1. Безкишский Э.Н., Николаенко И.О., Загаров Е.С., Тягнерев А.Т., Линченко С.Н., Жмакин И.А., Чеботов С.А. Автоматизированный контроль процесса адаптации к учебно-образовательной деятельности у курсантов-моряков // Морская медицина, 2020. Т. 6, № 1. С. 74-81. [Bezkishkiy E.N., Nikolaenko I.O., Zagarov E.S., Tyagnerev A.T., Linchenko S.N., Zhmakin I.A., Chebotov S.A. Automated control of the process of adaptation to educational and educational activities among cadets-sailors. *Morskaya meditsina = Marine Medicine*, 2020, Vol. 6, no. 1, pp. 74-81. (In Russ.)]
2. Бухтояров О.В., Архангельский А.Е. Психогенный фактор канцерогенеза: возможности применения гипнотерапии. Под ред. В.А. Козлова. СПб.: Алетейя, 2008. 264 с. [Bukhtoyarov O.V., Arkhangelsky A.E. Psychogenic factor of carcinogenesis: the possibilities of using hypnotherapy. Ed.V. A. Kozlov]. St. Petersburg: Aleteya, 2008. 264 p.
3. Губина О.И., Евдокимов В.И., Федотов А.Н. Изучение качества жизни и адаптации у студентов медицинского вуза // Вестник новых медицинских технологий, 2006. Т. XIII, № 3. С. 167-169. [Gubina O.I., Evdokimov V.I., Fedotov A.N. Study of the quality of life and adaptation of medical students. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Bulletin of New Medical Technologies*, 2006, Vol. XIII, no. 3, pp. 167-169. (In Russ.)]
4. Заболотная С.Г. К вопросу об успешности адаптации студентов медицинского вуза // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 2012. Т. 19, № 4. С. 17-20. [Zabolotnaya S.G. On the question of the success of adaptation of medical university students. *Uchenye zapiski SPbGMU im. akad. I.P. Pavlova = Scientific Notes of the St. Petersburg State I. Pavlov Medical University*, 2012, Vol. 19, no. 4, pp. 17-20. (In Russ.)]

5. Никитина В.Б., Ветлугина Т.П., Лобачева О.А., Морозова О.Г., Лебедева В.Ф., Савочкина Д.Н., Шихова М.Ф. Неспецифические адаптационные реакции организма как один из индикаторов здоровья в микросоциальных группах // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2014. № 4. С. 93-96. [Nikitina V.B., Vetlugina T.P., Lobacheva O.A., Morozova O.G., Lebedeva V.F., Savochkina D.N., Shikhova M.F. Non-specific adaptive reactions of the body as one of the indicators of health in microsocial groups. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy* = *International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2014, no. 4, pp. 93-96. (In Russ.)]
6. Рахманов Р.С., Богомолова Е.С., Тарасов А.В. Оценка показателей гуморального иммунитета у курсантов военного института в период адаптации к обучению // Военно-медицинский журнал, 2021. Т. 342, № 5. С. 69-74. [Rakhmanov R.S., Bogomolova E.S., Tarasov A.V. Assessment of indicators of humoral immunity in cadets of a Military institute during the period of adaptation to training. *Voenno-meditsinskiy zhurnal* = *Military Medical Journal*, 2021, Vol. 342, no. 5, pp. 69-74. (In Russ.)]
7. Сеченов И.М. Рефлексы головного мозга. М.: URSS, 2007. 128 с. [Sechenov I.M. Reflexes of the brain.]. Moscow: URSS, 2007. 128 p.
8. Сизякина Л.П., Андреева И.И., Данилова Д.И. Дисрегуляторные процессы клеточного звена иммунной системы в динамике общевариабельной иммунной недостаточности // Клиническая лабораторная диагностика, 2021. Т. 66, № 3. С. 160-165. [Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Danilova D.I. Dysregulatory processes of the cellular link of the immune system in the dynamics of common variable immunodeficiency. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2021, Vol. 66, no. 3, pp. 160-165. (In Russ.)]
9. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 352 с. [Khaitov R.M., Pinegin B.V., Yarilin A.A. Guide to clinical immunology. Diagnostics of diseases of the immune system: a guide for doctors.]. Moscow: GEOTAR-Media. 2009. 352 p.
10. Berrón-Ruiz L. Immunological alterations in common variable immunodeficiency. *Rev. Alerg. Mex.*, 2017, Vol. 64, no. 1, pp. 87-108. [In Spanish]
11. Chen S., Fang L., Guo W., Zhou Y., Yu G., Li W., Dong K., Liu J., Luo Y., Wang B., Li Z., Zhao C., Sun Z., Shen Y., Leng Q., Zhou D., Han Z., Huang H., Ren H., Xu G., Feng X. Control of Treg cell homeostasis and immune equilibrium by Lkb1 in dendritic cells. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, 5298. doi: 10.1038/s41467-018-07545-8.
12. Kraj P., Ignatowicz L. The mechanisms shaping the repertoire of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunology*, 2018, Vol. 153, no. 3, pp. 290-296.
13. Skert C., Fogli M., Garaffa E., Perucca S., Fiorentini S., Cancelli V., Turra A., Ribolla R., Fili C., Malagola M., Bergonzi C., Cattina F., Bernardi S., Caruso A., Di Palma A., Russo D. A specific Toll-like receptor profile on T lymphocytes and values of monocytes correlate with bacterial, fungal, and cytomegalovirus infections in the early period of allogeneic stem cell transplantation. *Transpl. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 16, no. 5, pp. 697-712.
14. Zheng W., Xu Q., Zhang Y., E X., Gao W., Zhang M., Zhai W., Rajkumar R.S., Liu Z. Toll-like receptor-mediated innate immunity against herpesviridae infection: a current perspective on viral infection signaling pathways. *Virol. J.*, 2020, Vol. 17, no. 1, 192. doi: 10.1186/s12985-020-01463-2.

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

Уразмамбетов Р.Т. — аспирант кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Чеботов С.А. — 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

Urazmambetov R.T., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Chebotov S.A., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 04.08.2021
Принята к печати 29.09.2021

Received 04.08.2021
Accepted 29.09.2021

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-1β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64-69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Андреева И.И.	1191	Детгирева В.Г.	1137	Нелюбин В.Н.	1055
Андрюшин А.Е.	1079	Добрынина М.А.	1031	Орлова Р.В.	1105
Антипова А.Ю.	1177	Дробышевская В.Г.	1177	Останин А.А.	1137
Антонов И.И.	1055	Дроков М.Ю.	1125	Паровичникова Е.Н.	1125
Артемков А.А.	1005	Дубняк Д.С.	1125	Патышева М.Р.	1183
Артюшкин С.А.	1151	Ерещенко А.А.	1171	Попова А.В.	1183
Балацкая Н.В.	1079	Жукова Н.В.	1105	Попова Н.Н.	1125
Балдина О.А.	1171	Зурочка В.А.	1031	Процак Е.С.	1089
Бедина С.А.	1165	Иванов С.Ю.	1055	Рашупкин И.М.	1137
Безрукова Е.В.	1151	Казаква Е.О.	1183	Савченко В.Г.	1125
Благова А.В.	1017	Каледина Е.А.	1105	Селезнева И.А.	1171
Борисова О.В.	1171	Капранов Н.М.	1125	Семенова Н.Ю.	1089
Бородин И.А.	1171	Карасева А.Б.	1089	Сизякина Л.П.	1191
Борщева О.В.	1089	Кафанова М.Ю.	1137	Симбирцев А.С.	1151
Борщев В.Ю.	1089	Князева А.А.	1069	Сорожкина Е.С.	1079
Борщев Ю.Ю.	1089	Колобовникова Ю.В.	1183	Сосновская А.В.	1137
Бочкаева З.В.	1017	Колотьева Н.А.	1171	Сосунов А.В.	1151
Букаева А.А.	1017	Кондратов К.А.	1069	Спицина С.С.	1165
Бурмакина В.В.	1115	Конусова В.Г.	1151	Суворов А.Н.	1089
Буровенко И.Ю.	1089	Кричевская Г.И.	1079	Трофименко А.С.	1165
Васильева В.А.	1125	Кузьмина Л.А.	1125	Уразмамбетов Р.Т.	1191
Васюткина М.Л.	1069	Куликова И.Г.	1079	Уразова О.И.	1183
Воробейчиков Е.В.	1151	Лисицына Т.А.	1079	Федоров А.В.	1069
Воронова Е.В.	1137	Ма И.	1069	Хамитова И.В.	1177
Галагудза М.М.	1089	Макаров В.В.	1017	Хасанова Е.М.	1115
Гальцева И.В.	1125	Малкова А.М.	1105	Чеботов С.А.	1191
Ганковская Л.В.	1115	Мамус М.А.	1165	Черных Е.Р.	1137
Гильмиярова Ф.Н.	1171	Масликова У.В.	1125	Чумакова С.П.	1183
Головкин А.С.	1069	Минасян С.М.	1089	Чурина Е.Г.	1183
Гриценко В.А.	1031	Михайлова Е.Д.	1125	Шамцян М.М.	1151
Губаль А.Р.	1105	Мозговая Е.Э.	1165	Шаройко В.В.	1105
Гусякова О.А.	1171	Мудров В.П.	1055	Шевела Е.Я.	1137
Давыдова Г.А.	1079	Мурзав А.А.	1055		
Давыдова Ю.О.	1125				

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптация	1192	M2-фенотип	1138	синтетический пептид активного	
алалия	1138	макрофаги	1138	центра	1032
аллельный полиморфизм	1115	медицинский вуз	1192	солидные опухоли	1106
антибиотик-индуцированный		моноциты	1166	соотношение нейтрофилов	
дисбиоз	1090	моноциты	1184	и лимфоцитов	1106
болезнь Бехчета	1079	мРНК-1273	1017	спермограмма	1115
вакцина	1017	неинвазивная диагностика	1172	способ доставки лекарственных	
внеклеточные ловушки моноцитов	1166	нейроиммунноэндокринные		средств	1056
внеклеточные ловушки нейтрофилов	1166	взаимосвязи	1005	стресс	1005
воспаление	1069	нейтрофилы	1166	студенты-медики	1192
врожденный иммунитет	1184, 1192	обучение	1192	терапия	1032
гаплоидентичная трансплантация	1126	острый назофарингит	1152	трансплантация костного мозга	1126
герпес	1177	пандемия	1017	туберкулез легких	1184
гидрогели	1056	парвовирус В19	1177	увеит активный	1079
гранулоцитарно-макрофагальный		пародонтит	1056	увеит в ремиссии	1079
колониестимулирующий фактор	1032	подвижность сперматозоидов	1115	факторы роста	1056
дисрегуляция	1005	посттрансплантационный		хемокины	1079
ДНК	1177	циклофосфамид	1126	цитокины	1056, 1079, 1090, 1138
животные жиры	1090	почки	1069	челюстно-лицевая хирургия	1056
идиопатическое бесплодие	1115	приобретенный иммунитет	1192	экспрессия генов	1069, 1115
изолированное сердце	1090	противомикробный пептид	1115	BNT162b2	1017
иммунитет	1177	протоочная цитометрия	1126	C-реактивный белок	1172
иммунная терапия	1106	размер инфаркта	1090	CD80	1184
иммунный ответ	1005, 1184	расстройства речевого развития	1138	COVID-19	1017, 1172
иммунобиологические эффекты	1032	растительные жиры	1090	Danio rerio	1069
иммуномодуляторы	1056	реакция «трансплантат против		DEFB126	1115
иммуностарение	1005	хозяина»	1126	EToz	1166
иммунотропные препараты	1056	ревматоидный артрит	1166	HBD126	1115
иммунофенотипирование	1126	рекомбинантный интерферон α2b	1152	HLA-DR	1184
интерлейкин-6	1172	рецептор ГМ-КСФ	1032	IFN	1177
интерлейкин-8	1172	РНК-вакцина	1017	IL-1ra	1152
интраназальные ингаляции	1138	ротовая жидкость	1172	IL-1β	1106, 1152
инфекция	1177	сердце	1069	NEToz	1166
кишечная микробиота	1005	синдром Жильбера	1177	PD-L1	1106
коронавирус	1017	синдром системной воспалительной		SARS-CoV-2	1017
корреляция	1106	реакции	1090	β-D-глюканы	1152
липополисахарид	1069				

**ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ РНК-ВАКЦИН: ЧТО ИЗВЕСТНО НА СЕГОДНЯШНИЙ ДЕНЬ»
(АВТОРЫ: БЛАГОВ А.В., БУКАЕВА А.А., МАКАРОВ В.В., БОЧКАЕВА З.В. [с. 1017-1030])**

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "SAFETY AND EFFICACY OF RNA VACCINES: STATE OF THE ART" (AUTHORS: BLAGOV A.V., BUKAEVA A.A., MAKAROV V.V., BOCHKAIEVA Z.V. [pp. 1017-1030])

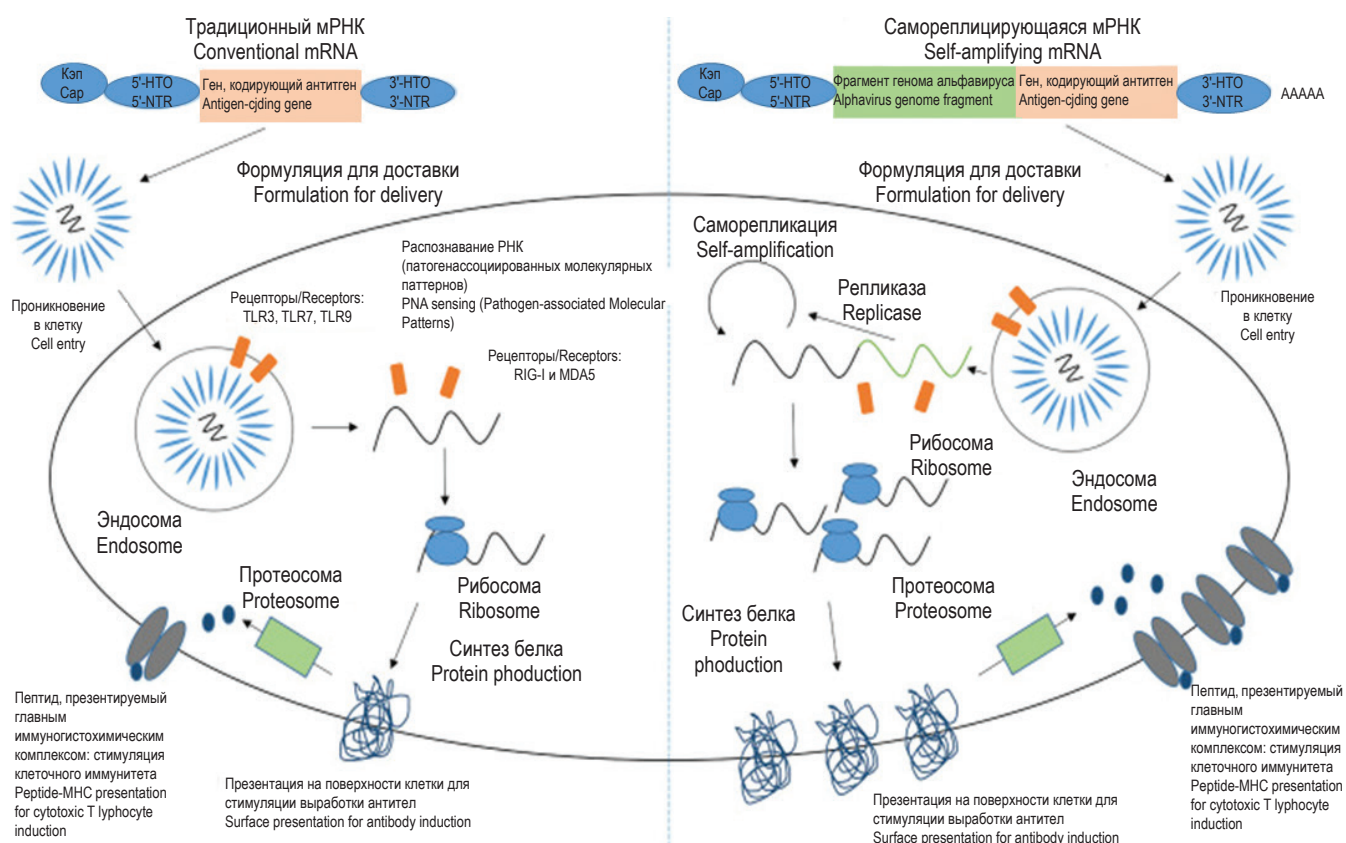


Рисунок 2. Сравнение механизмов действия традиционных и самореплицирующихся мРНК-вакцин (переведено и адаптировано с разрешения авторов, полученного по электронной почте [37])

Примечание. 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область, 3'-НТО – 3'-нетранслируемая область.

Figure 2. mRNA and self-replicating RNA protein production in cells (translated with kind permission of authors from [37])

Note. 5'-UTR, 5'-untranslated region; 3'-UTR, 3'-untranslated region.

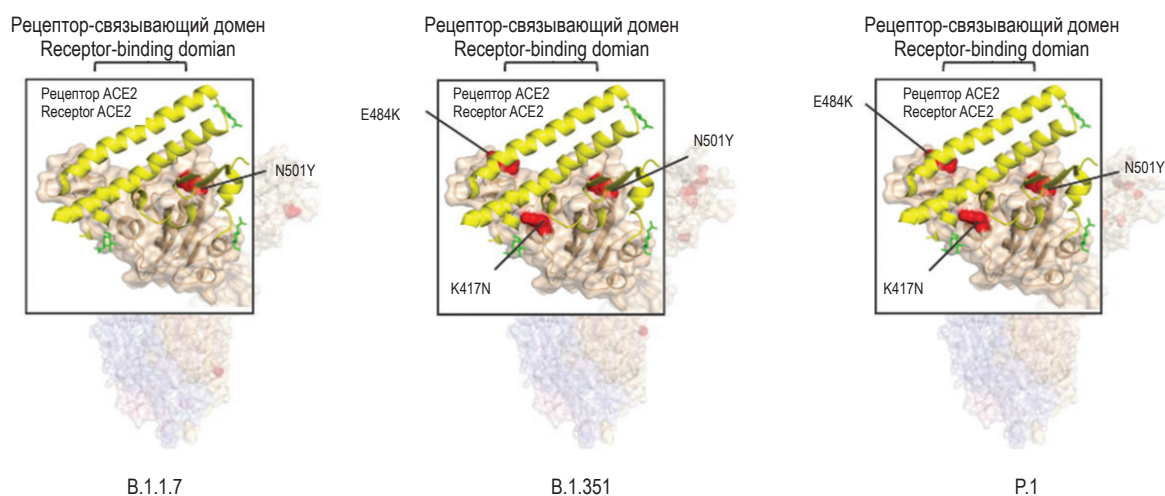


Рисунок 3. Аминокислотные замены, найденные в области рецептор-связывающего домена в высокотрансмиссивных штаммах вируса SARS-CoV-2 (скопировано из презентации, доступной для общего пользования на сайте компании Модерна [27])

Figure 3. Amino acid changes in RBD of highly transmissible SARS-CoV-2 (copied from the presentation published at Moderna's site [27])

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

