

ЦИТОКИНЫ И ВОСПАЛЕНИЕ

Журнал является официальным органом
Ассоциации исследователей цитокинов
и антицитокиновой терапии
(Российского цитокинового общества)

Том 19, № 1-4. С. 1-84

2022

2022

Журнал является официальным органом
Ассоциации исследователей цитокинов
и антицитокиновой терапии
(Российского цитокинового общества)

Журнал издается с 2002 г.
один раз в квартал (4 выпуска в год).

ЦИТОКИНЫ И ВОСПАЛЕНИЕ

Главный редактор

Симбирцев Андрей Семенович,
д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН (Санкт-Петербург)

Заместители главного редактора:

Козлов Владимир Александрович,
д.м.н., профессор, академик РАН (Новосибирск)

Иванов Андрей Михайлович,
д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН (Санкт-Петербург)

Кудлай Дмитрий Анатольевич,
д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН (Москва)

Журнал включен в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и соискание ученой степени доктора наук (по состоянию на 2022 год).

Свидетельство Роскомнадзора ПИ № 77 – 11439

Дата регистрации 21.12.2001

Допечатная подготовка и печать: типография ООО «Версона»
Адрес: 660079, г. Красноярск, ул. А. Матросова, 30к
Тел. (391) 235-04-89, e-mail: versona24@yandex.ru
Подписано в печать 23.12.2022 г. Дата выхода в свет 30.12.2022 г.
Формат 60x84/8, Печать офсетная. Заказ № 2717. Тираж 200 экз.

Редколлегия:

Головизнин Марк Васильевич, к.м.н. (Москва)
Головкин Алексей Сергеевич, д.м.н. (Санкт-Петербург)
Гусев Евгений Юрьевич, профессор (Екатеринбург)
Зурочка Александр Владимирович, профессор (Челябинск)
Иванов Андрей Михайлович, профессор, чл.-корр. РАН (Санкт-Петербург)
Калинина Наталья Михайловна, профессор (Санкт-Петербург)
Караулов Александр Викторович, академик РАН (Москва)
Козлов Иван Генрихович, профессор (Москва)
Кудрявцев Игорь Владимирович, к.б.н. (Санкт-Петербург)
Литвинова Лариса Сергеевна, профессор (Калининград)
Маркелова Елена Владимировна, профессор (Владивосток)
Недоспасов Сергей Артурович, академик РАН (Москва)
Нестерова Ирина Вадимовна, профессор (Москва)
Полевщиков Александр Витальевич, профессор (Санкт-Петербург)
Полторах Александр Николаевич, профессор (Бостон, США)
Потапнев Михаил Петрович, профессор (Минск, Беларусь)
Продеев Андрей Петрович, профессор (Москва)
Свитич Оксана Анатольевна, чл.-корр. РАН (Москва)
Сенников Сергей Витальевич, профессор (Новосибирск)
Топтыгина Анна Павловна, д.м.н. (Москва)
Хайдуков Сергей Валерьевич, профессор (Москва)
Черешнев Валерий Александрович, академик РАН (Екатеринбург)
Черных Елена Рэмовна, чл.-корр. РАН (Новосибирск)

Редакционный совет:

Балдуева Ирина Александровна, профессор (Санкт-Петербург)
Варюшина Елена Анатольевна, д.б.н. (Санкт-Петербург)
Ганковская Людмила Викторовна, профессор (Москва)
Гариб Фируз Юсупович, профессор (Москва)
Гриценко Виктор Александрович, профессор (Оренбург)
Зверев Виталий Васильевич, академик РАН (Москва)
Ищенко Александр Митрофанович, к.б.н. (Санкт-Петербург)
Колесникова Наталья Владиславовна, профессор (Краснодар)
Перцов Сергей Сергеевич, чл.-корр. РАН (Москва)
Савченко Андрей Анатольевич, профессор (Красноярск)
Семенов Александр Владимирович, профессор (Екатеринбург)
Сизякина Людмила Петровна, профессор (Ростов-на-Дону)
Суворов Александр Николаевич, чл.-корр. РАН (Санкт-Петербург)
Тотолян Арег Артемович, академик РАН (Санкт-Петербург)
Тузанкина Ирина Александровна, профессор (Екатеринбург)
Тутельян Алексей Викторович, чл.-корр. РАН (Москва)
Уразова Ольга Ивановна, чл.-корр. РАН (Томск)
Чердынцева Надежда Викторовна, чл.-корр. РАН (Томск)
Заморина Светлана Анатольевна, д.б.н. (Пермь)

СОДЕРЖАНИЕ

ОТ РЕДАКТОРА	3
А.В. Полевщиков	
Петр Григорьевич Назаров – основатель журнала «Цитокины и воспаление»	4
О.В. Валикова, В.В. Здор	
Клеточно-молекулярные иммунные механизмы в патогенезе синдрома поликистозных яичников	6
К.А. Васильев, А.-П.С. Шурыгина, М.В. Сергеева, Е.А. Романовская-Романько, В.З. Кривицкая, И.В. Амосова, Е.А. Варюшина, Ж.В. Бузицкая, М.А. Стукова, Д.А. Лиознов	
Многофакторный анализ параметров иммунного ответа после иммунизации инактивированными гриппозными вакцинами	13
О.А. Васильева, Т.С. Прохоренко, Ю.В. Колобовникова, В.С. Полетика, О.И. Уразова, Т.Е. Кононова, Е.Г. Чурина, Г.В. Рейнгарт, А.В. Курносенко	
Галектин-3 как модулятор цитокиноопосредованной кооперации лимфоцитов in vitro	21
О.Д. Денисенко, С.А. Перепелица, Л.С. Литвинова	
Влияние метаболического ацидоза на адгезиоактивность эритроцитов у новорожденных.....	28
Е.В. Маркелова, М.П. Ручкин, Г.Ф. Федяшев	
Сывороточный уровень цитокинов у пациентов с нейродегенерацией сетчатки при диабетической ретинопатии на фоне сахарного диабета II типа.....	34
И.В. Нестерова, Е.О. Халтурина, В.Н. Нелюбин, С.В. Хайдуков, Г.А. Чудилова, В.В. Малиновская	
Неоднозначность влияний рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ в эксперименте in vitro на уровне экспрессии ядерного фактора NF-κB, рецепторов IFNα βR и IFNγR (CD119) нейтрофильных гранулоцитов пациентов с хроническими герпес-вирусными инфекциями	38
Я.В. Полонская, Е.В. Каштанова, Е.М. Стахнёва, В.С. Шрамко, Е.В. Садовский, С.Р. Ледовских, А.Д. Худякова, Ю.И. Рагино	
Влияние абдоминального ожирения на уровни маркеров воспаления у молодых людей с артериальной гипертензией.....	47
И.В. Радьков, Н.Г. Плехова, С.В. Зиновьев, В.Б. Шуматов	
Иммунный ответ при нейровоспалении, вызванном легкой черепно-мозговой травмой (экспериментальное исследование).....	54
А.А. Савченко, Э.В. Каспаров, С.А. Борисов, А.А. Мастерова, А.Г. Борисов	
Эффективность детоксикации для коррекции системного воспалительного ответа при иммунореабилитации онкологических больных	61
Н.А. Скрипкина, Л.П. Сизякина, Е.А. Антонова, Д.В. Сизякин, В.Я. Закурская	
Особенности врожденного и адаптивного иммунитета у пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 при различных степенях поражения легочной ткани.....	69
А.И. Смолягин, А.С. Симбирцев, И.В. Михайлова, Е.В. Ермолина, А.А. Исенгулова, Л.А. Пушкарева, Н.А. Кузьмичева, Ю.В. Филиппова, И.Н. Чайникова, И.В. Мирошниченко	
Оценка физиологических и иммунологических показателей у потомства, родившегося от пассивно куривших крыс, получавших тетрапептид КК1	75
Н.С. Чепурнова, О.Н. Бирко, Я.А. Юцковская, Л.В. Герасименко, Д.Е. Русанова, А.Г. Петухова, Е.В. Маркелова	
Состояние системы цитокинов у женщин разного возраста	80

Перед читателями новый номер журнала «Цитокины и воспаление», издание которого редакционная коллегия решила возобновить после двухлетнего перерыва, связанного с трагическим событием – уходом из жизни Петра Григорьевича Назарова, главного редактора журнала в течение 20 лет с момента выпуска первого номера в 2002 году. Надеемся, что продолжение издания журнала будет лучшей памятью о человеке, посвятившем многие годы своей жизни этому благородному делу.

Цитокины – это эндогенные полипептидные медиаторы межклеточного взаимодействия. Цитокины представляют собой эволюционно древнюю систему полипептидных молекул, регулирующих многие жизненно важные физиологические процессы в организме, защитные реакции против патогенов и восстановление гомеостаза, нарушенного любыми причинами, включая биологические, химические и физические факторы. Смысл существования данной системы – организация взаимодействия между клетками различного происхождения и с разными функциональными свойствами на местном и системном уровнях.

Многочисленные исследования последних лет убедительно продемонстрировали роль цитокинов в индивидуальном развитии, выполнении многих физиологических функций, участии в формировании и регуляции защитных реакций против патогенов и восстановления после травм. В то же время выяснилось, что цитокины, будучи главными медиаторами иммунной системы, участвуют в патогенезе всех без исключения аутоиммунных, аутовоспалительных, аллергических заболеваний, объединенных понятием иммуновоспалительные заболевания. К этой же категории патологических состояний сейчас отнесены и многие болезни, где воспаление играет важную роль в патогенезе. Прежде всего, это опухоли, метаболический синдром и заболевания сердечно-сосудистой системы, включая такие серьезные состояния, как инфаркт миокарда и инсульт головного мозга. Таким образом, цитокины предстали медиаторами большинства социально значимых заболеваний человека.

Цель издания журнала – представить и, насколько возможно, систематизировать имеющиеся на сегодняшний день результаты экспериментальных исследований, а также данные о роли цитокинов в диагностике и их участии в патогенезе наиболее распространенных заболеваний человека. Изучение системы цитокинов – очень бурно развивающаяся область науки, особенно это касается клинических исследований. Надеюсь, что публикации в журнале дадут пищу для новых интересных идей и почву для перспективных научных изысканий.

Главный редактор А.С. Симбирцев



ПЕТР ГРИГОРЬЕВИЧ НАЗАРОВ – основатель журнала «Цитокины и воспаление»

Мы впервые встретились с ним в начале декабря 1984 г. Войдя на территорию Института, я спросил у первого встречного сотрудника «Как пройти в отдел иммунологии?». Тот оценивающе посмотрел на меня, подсказал дорогу и тут же, почти не сомневаясь, спросил: «К Назарову?» и на мой утвердительный ответ понимающе кивнул. Вскоре меня встретил и сам Петр Григорьевич, который с первого взгляда производил впечатление очень обаятельного и целеустремленного человека. Ему было всего 39, но мне он показался несколько старше своих лет. Мы проговорили около часа, и с этого началось наше научное сотрудничество, длившееся до последних дней его жизни.

П.Г. Назаров родился сразу после окончания Великой Отечественной войны, 20 июля 1945 года в городе Новогеоргиевске Кировоградской области Украины, где в то время несли службу его родители, военврач и блестящий хирург Григорий Дмитриевич и медсестра Анна Трофимовна Назаровы. Наверное, родители сыграли не последнюю роль в выборе жизненного пути Петра Григорьевича, который в 1963 г. поступил в 1-й Ленинградский медицинский институт им. акад. И.П. Павлова. Вся

научная карьера Петра Григорьевича неразрывно связана с Институтом экспериментальной медицины, в аспирантуру которого он поступил в 1970 г. С работами профессора П.Г. Назарова связано развитие приоритетного направления – иммунологии белков острой фазы воспаления: формирование концепции, предвосхитившей появление гипотезы патогенассоциированных молекулярных паттернов. Уже в рамках кандидатской диссертации, защищенной в 1974 г. под руководством академика В.И. Иоффе, содержались первые наброски будущей концепции, которые получили свое развитие в рамках докторской диссертации, защищенной в 1988 г. под руководством проф. Б.Н. Софронова. Именно в рамках докторской диссертации и последующих монографий были сформулированы и разработаны основные положения приоритетной гипотезы о роли белков острой фазы воспаления и особенно С-реактивного белка в регуляции иммунного ответа. Около 30 лет П.Г. Назаров возглавлял лабораторию общей иммунологии нашего отдела, а в период с 2014 по 2019 гг. П.Г. Назаров руководил отделом иммунологии ИЭМ. За последние годы под его руководством получены принципиально новые результаты, затрагивающие ключевые механизмы иммунологии воспаления. Изучение пентраксинов позволило обнаружить и охарактеризовать новые лиганды С-реактивного белка. Его исследования показали, что пентраксины играют защитную анти-токсическую роль на ранних этапах инфекции, до появления антител, а С-реактивный белок является не только защитным, но и атерогенным фактором, участвующим в иммунопатологических механизмах развития атеросклероза.

Работы П.Г. Назарова, вся жизнь которого неразрывно была связана с ИЭМ, привели к созданию новой научной школы. Под руководством Петра Григорьевича защищено 13 кандидатских и 3 докторских диссертации. Многие годы профессор П.Г. Назаров читал курсы лекций по общей иммунологии, иммунологии воспаления, неспецифическим факторам резистентности на разных кафедрах и факультетах Санкт-Петербургского государственного университета и СПбГМУ им. И.П. Павлова, был автором более 450 публикаций, в том числе 6 монографий, входил в состав редколлегии журналов «Медицинская иммунология» и «Пятиминутка».

В середине 2000 года он впервые сказал нам, его ученикам, о плане создания журнала, посвященного анализу механизмов воспаления и способов его контроля. Рассматривая концепции тематически родственных зарубежных журналов, Петр Григорьевич не скрывал, что ориентирами для него были такие авторитетные издания, как *Inflammation* и *The Journal of Leukocyte Biology*. Ближайшими сподвиж-

никами П.Г. Назарова в непростом деле создания, регистрации и издания журнала стали С.А. Кетлинский, В.А. Козлов и А.С. Симбирцев. Название будущего журнала Петр Григорьевич обсуждал с коллегами и учениками, но вариант «Цитокины и воспаление» был поддержан всеми довольно быстро. В результате в декабре 2001 г. журнал был официально зарегистрирован именно под этим названием. Петр Григорьевич оставался бессменным главным редактором журнала, а в дальнейшем и его издателем до конца жизни. Со дня регистрации именно журнал «Цитокины и воспаление» стал для него основным делом жизни. Даже в годы руководства отделом иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» с 2014 по 2019 гг. для П.Г. Назарова работа по журналу все равно стояла на первом месте, и в эту работу он вкладывал все свои силы, знания, талант исследователя, редактора, издателя и весь свой жизненный опыт.

Осенью 2019 г., после тяжелой болезни Петра Григорьевича и последовавшей отставки с поста заведующего отделом иммунологии ИЭМ, я подумал: «Да нет же, для ученого ему еще совсем немного лет. Мы ещё поработаем вместе! Надо будет помочь ему проверить его любимую идею о синтезе С-реактивного белка лимфоцитами. Ведь для этого есть все. Это же сейчас совсем несложно, а он будет рад». Но прошел всего год, и странная эпидемия оборвала жизнь замечательного человека, прекрасного ученого, настоящего Учителя и Друга, отдавшего полвека Институту экспериментальной медицины и двадцать лет жизни журналу «Цитокины и воспаление». Человека, который многие годы, не занимая никаких больших постов и не имея академических регалий, на самом деле был одним из главных авторитетов в иммунологии Петербурга и всей России.

О Петре Григорьевиче Назарове каждое поколение авторов и читателей журнала «Цитокины и воспаление» скажет что-то свое. Без сомнения, старшее поколение помнит энергичного новатора, немедленно внедрявшего в исследовательскую практику отсутствовавшие в стране совершенно новые методы, генератора ярких и парадоксальных идей, щедро делившегося своими знаниями, находками и задумками не только с коллегами и учениками, но и с любым человеком, который обращался к нему за помощью или советом. Люди среднего поколения, наверно, запомнят П.Г. Назарова как авторитетно-

го ученого и мудрого, заботливого руководителя, создателя и первого главного редактора журнала, сформировавшего свою школу и защищавшего приоритетность науки даже в период труднейших социально-экономических преобразований в стране. Надеюсь, что молодые читатели «Цитокинов и воспаления» сохранят память о Петре Григорьевиче как об одном из главных звеньев, связывавших классическую и современную иммунологию, знатоке и хранителе научных традиций, моральном авторитете высшей пробы. Он умел дружить, число его друзей было огромным во всех уголках некогда единой великой страны, поэтому такой болью отозвалась его безвременная кончина в сердцах всех, кого объединяет иммунология.

Мы шли вместе с П.Г., как его неформально называли коллеги, целых 36 лет. За эти годы мы и работали вместе, и стояли рядом плечом к плечу, а когда было надо – и спина к спине. Поэтому с его кончиной 21 ноября 2020 г. я потерял не только Учителя, но и наставника, соратника и друга, с которым мог обсуждать все – от новой научной идеи до перспектив развития отдела, и от которого всегда мог получить мудрый совет. Родившийся в 1945 году, Петр Григорьевич был настоящим интеллигентом-шестидесятником, добрым и принципиальным одновременно, но в любом случае глубоко порядочным и совершенно беззащитным человеком. Наверное, в его интересе к истории руководимого им отдела, к судьбе безвинно репрессированного О.О. Гартоха были и какие-то личные мотивы. Но мы об этом уже не узнаем никогда. Несмотря на большое число друзей, он был весьма закрытым человеком, старавшимся скрывать глубоко в душе свои переживания и боль разочарований в людях.

В истории Института экспериментальной медицины и всей иммунологии Санкт-Петербурга П.Г. Назаров оставил не просто светлый, но очень яркий след. И этот след измеряется не только числом подготовленных учеников, сотнями статей и томами монографий. Яркость этого следа определяется памятью о нем десятков и сотен людей, в которой он остался навсегда. И пусть возобновление издания его главного детища, журнала «Цитокины и воспаление» поможет всем нам сохранить светлую память о нем.

А.В. Полевщиков

КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ СИНДРОМА ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ

¹Центральная научно-исследовательская лаборатория ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России.

²ГБУЗ Краевая клиническая больница № 2.

³Клиника диабета и эндокринных заболеваний; г. Владивосток, Приморский край.

Резюме. Несмотря на многочисленные исследования нейроиммуноэндокринных механизмов развития синдрома поликистозных яичников, патогенез этого заболевания до сих пор не ясен, что не позволяет полностью решить комплекс репродуктивных, метаболических и психологических проблем при данной патологии. Клетки врожденного иммунитета – мастоциты – и их молекулярные маркеры являются предметом активного исследования при патологии эндокринной системы. Обзор литературы посвящен анализу исследований клеточно-молекулярных иммунных механизмов в патогенезе синдрома поликистозных яичников. Поиск дополнительных молекулярных и клеточных маркеров для контроля течения заболевания и, следовательно, прогноза фертильности пациенток является весьма актуальной медицинской проблемой и требует применения современных клинко-иммунологических методов и технологий.

Ключевые слова: мастоциты, синдром поликистозных яичников, цитокины, половые гормоны.

Образец цитирования: Валикова О.В., Здор В.В. Клеточно-молекулярные иммунные механизмы в патогенезе синдрома поликистозных яичников // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 6-12.

CELL-MOLECULAR IMMUNE MECHANISMS IN THE PATHOGENESIS OF POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education TSMU, Central Research Laboratory of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education TSMU of the Ministry of Health of Russia;

²GBUZ Regional Clinical Hospital No. 2;

³Clinic "Diabetes and Endocrine Diseases"; Vladivostok, Primorsky Territory.

Summary. The literature review is devoted to studies of the role of innate immunity cells – mast cells in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. In recent years, the cells of innate immunity have been the subject of active research in the pathology of the endocrine system. Despite numerous studies of the mechanisms of the disease, the immunopathogenesis of polycystic ovary syndrome is still not clear, which does not allow to completely solve the complex of reproductive, metabolic and psychological problems in this pathology. The search for molecular markers to control the course and prognosis of the disease is an urgent medical problem.

Keywords: mast cells, polycystic ovary syndrome, cytokines, sex hormones.

Введение

В настоящее время от 5 до 20 % женщин репродуктивного возраста страдают синдромом поликистозных яичников (СПКЯ), являющегося одной из самых частых причин женского эндокринного бесплодия [1]. Распространенность СПКЯ зависит от применяемых критериев диагностики [1, 4, 8]. СПКЯ считается полигенным эндокринным расстройством, обусловленным наследственными и эпигенетическими факторами [1, 4, 8, 33]. В патогенезе СПКЯ условно можно выделить нарушения на четырех уровнях нейроэндокринной системы, каждое из которых претендует на роль триггера заболевания: нарушения на уровне гипоталамо-гипофизарной системы, яичников, надпочечников и периферических инсулинчувствительных тканей [1]. Основными кли-

нически значимыми проявлениями СПКЯ являются: клиническая и/или биохимическая гиперандрогения, нарушение менструального цикла на фоне овulatorной дисфункции и морфологически кистозные изменения яичников [1, 4, 8, 33]. Патологический путь превращения половых стероидов в яичнике при СПКЯ обусловлен нарушенными нейроиммуноэндокринными механизмами, что усугубляется гиперандрогенией и висцеральным ожирением, гипергликемией [1, 4, 8]. Несмотря на многочисленные исследования, до настоящего времени не сформулирована единая концепция иммунопатогенеза СПКЯ.

Роль воспаления в патогенезе СПКЯ

При исследовании этиопатогенеза СПКЯ появляются новые доказательства в поддержку этиоло-

гической роли системного воспаления, вероятно, не связанного напрямую с ожирением, так как существуют формы СПКЯ без висцерального ожирения [40]. В метаанализе 2016 г. представлены данные, свидетельствующие о том, что у пациенток с СПКЯ были значимо увеличены уровни С-реактивного белка (СРБ), провоспалительных цитокинов: фактор некроза опухоли (TNF α), интерлейкин 6 (IL-6), интерлейкин 18 (IL-18), маркеров перекисного окисления липидов, продуктов карбонилирования белков на фоне повышения концентрации в крови лимфоцитов и моноцитов [32]. На основании системного анализа нескольких рандомизированных исследований авторы пришли к заключению, что значимо высокий уровень IL-6 не является характерной чертой СПКЯ, но может быть высокочувствительным маркером для мониторинга эффективности лечения СПКЯ [32]. В ряде работ при СПКЯ найдена положительная корреляция в содержании провоспалительных IL-18 и IL-6 в сыворотке крови и выраженности симптомов гиперандрогении независимо от индекса массы тела пациенток [32, 37]. Данные подтверждают положение о значимости клеток и факторов воспаления, которые могут являться важными триггерами каскада патологических процессов при СПКЯ.

Изучение содержания IL-18 в крови и его взаимосвязь с инсулинорезистентностью у пациенток с СПКЯ при нормальной массе тела и ожирении было проведено ранее, в 2004 г., где выявлено значимое повышение показателей, не зависящих от веса пациенток [17]. Кроме того, другой группой исследователей в 2006 г. было сделано сообщение о повышении уровня растворимой молекулы адгезии-1 (sICAM-1), растворимой молекулы адгезии эндотелиальных лейкоцитов-1 (sE-селектин), растворимой молекулы адгезии сосудистых клеток-1 (sVCAM-1) и С-реактивного белка при СПКЯ в сравнении с контрольной группой, и коррекция показателей приемом метформина [16], что в дальнейшем было подтверждено еще рядом исследований.

В 2016 г. группа ученых во главе с de Alencar J.B. проанализировала исследования, проводимые в ряде азиатских стран о полиморфизме генов провоспалительных цитокинов при СПКЯ [6]. Восприимчивость к заболеванию связана с аллелями и генотипами интерлейкинов: IL1A, IL1B, IL1RN и IL6. Фактор некроза опухоли TNF-1032 генотип С/Т был фактором повышенного риска развития СПКЯ, а генотип Т/Т является протекторным маркером, что дополнительно подтверждает прямую связь между воспалением и развитием СПКЯ. Ген IL-18 не связан с развитием СПКЯ, но его аллели С и G IL 18-137 обладают протективным эффектом при инсулинорезистентности и нарушениях толерантности к глюкозе [6] и могут присутствовать у женщин с СПКЯ без ожирения, что требует уточнения [6].

В 2019 г. М. Moulana на экспериментальной модели СПКЯ получила доказательства значительного изменения субпопуляций Т-лимфоцитов и различных популяций лейкоцитов у крыс HAF с этим заболеванием. Результаты исследования подразумевают дисрегуляцию иммунного ответа в яичниках при СПКЯ и могут указывать на связь избытка андрогенов на фоне хронического воспаления при этой патологии [30].

На экспериментальной модели СПКЯ в 2019 г. исследователи Li Y. и соавторы [27] изучали роль провоспалительных цитокинов в патогенезе СПКЯ и установили, что при индуцированном поликистозе яичников у крыс, вызванном дегидроэпиандростероном (ДГЭА), уровень IFN- γ в крови животных был значимо ниже, чем в контрольной группе. На культуре клеток гранулы яичника было продемонстрировано, что ДГЭА снижает экспрессию рецепторов и синтез IFN- γ в клетках яичника [27]. Учитывая, что IFN- γ усиливает пролиферацию и ингибирует апоптоз гранулематозных клеток яичника, а ДГЭА, наоборот, ингибирует пролиферацию и способствует апоптозу этих клеток, можно говорить об обратной взаимосвязи гормона и IFN- γ . Интерферон- γ потенциально может служить важным маркером для прогноза течения СПКЯ, а экспрессия его рецепторов может быть восстановлена антагонистами андрогенных рецепторов в случае необходимости [27]. Значение цитокинов в патогенезе СПКЯ необходимо уточнить на экспериментальных моделях заболевания, так как ранее были получены данные о негативном влиянии повышенного уровня IFN- γ в фолликулярной жидкости, приводящего к ингибированию овуляции и ранних потерях беременности [35].

Предположение, что активация макрофагов влияет на менструальный цикл и дисфункцию яичников при СПКЯ, нашло подтверждение в зафиксированных измененных воспалительными реакциями макрофагах и в снижении уровня ЛПВП у женщин с СПКЯ по сравнению с контрольной группой [38]. Существуют также данные, что хроническое воспаление на фоне избытка андрогенов увеличивает риск развития аутоиммунных заболеваний [21], влияет на физиологические процессы, вызывающие бесплодие у женщин, в том числе нарушает овуляцию и имплантацию эмбриона [21].

В 2020 г. He S. и соавторы [20] впервые доказали, что патогенез полиэтиологического СПКЯ тесно связан с аутоиммунными механизмами, в которых активное участие принимают Т-лимфоциты и NK-клетки [20], но аутоиммунный генез СПКЯ до сих пор не доказан. Исследователи из Саудовской Аравии во главе с Alissa E.M. определили, что повышенные уровни TNF- α и IL-6 в плазме у женщин с СПКЯ

адекватно отражают состояние хронического воспаления с потенциальным влиянием на резистентность к инсулину независимо от наличия ожирения [7]. В обзоре 2021 г. продемонстрированы корреляции между повышенным уровнем СРБ, IL-18, TNF α , IL6, количеством лейкоцитов, количеством моноцитарного хемотаксического фактора 1 (MCP-1) и макрофагального воспалительного белка-1 α (MIP-1 α) у женщин с СПКЯ по сравнению с контрольной группой, соответствующей по возрасту и ИМТ (индексу массы тела). По данным авторов, маркеры воспаления, провоспалительные цитокины и/или их генные маркеры, слабовыраженное воспалительное состояние матки были зафиксированы преимущественно у больных СПКЯ, а хроническое воспалительное состояние усугублялось ожирением и гиперинсулинемией [34]. Однако вопрос о первичности воспаления в органах малого таза в патогенезе СПКЯ остается дискуссионным, воспаление может быть причиной осложнений при беременности, начиная от невынашивания беременности и заканчивая плацентарной недостаточностью, но отсутствие значимых доказательств первичности воспаления требует дополнительного подтверждения. В 2021 г. Liu Y. и соавторы доказали увеличение IL-1 β и IL-18 в фолликулярной жидкости у пациенток с СПКЯ и обратили внимание, что внутриклеточное воспаление при этой патологии не только повреждает структуру митохондрий, создавая окислительный стресс, но и действует на клеточный метаболизм и пролиферацию гранулезных клеток [28]. Несмотря на то, что проанализированные нами исследования доказывают роль воспаления при СПКЯ, дальнейшее изучение иммунных механизмов поликистоза яичников и верификация его новых молекулярных маркеров позволит значительно расширить наши представления о патогенезе заболевания и позволит более точно определить значимые этиологические факторы СПКЯ.

Роль клеток врожденного иммунитета – мастоцитов в ткани яичника

Как известно, клетки врожденного иммунитета – мастоциты (тучные клетки, MC), впервые описанные П. Эрлихом в конце XIX века, присутствуют практически во всех органах и тканях человека, располагаясь в основном периваскулярно, встречаются преимущественно в тканях и практически не обнаруживаются в периферическом кровотоке [36]. MC принимают активное участие во врожденном и адаптивном иммунном ответе, выполняют эффекторные функции [24]. Доказано наличие у MC рецепторов к ряду гормонов: эстрогенам, гонадотропинам, тиреотропину и кортикотропин-рилизинг-гормонам, тиреоидным гормонам [10, 39]. MC как гранулярные клетки происходят из CD34 гемопоэтических предшественни-

ков костного мозга. Фактором для дифференцировки MC является мембраносвязывающий цитокин SCF (Stem Cell Factor – CD117) [29]. В цитоплазме MC расположены многочисленные крупные гранулы, содержащие различные биогенные амины (гистамин, серотонин, дофамин), протеоглики (серглицин), мукополисахариды (гепарин, хондроитинсульфат), протеазы (триптазы, химазы, карбоксипептидаза А), цитокины, ростовые факторы [5]. За счет наличия в цитоплазматических гранулах MC гепарина высокой кислотности щелочные красители претерпевают метакромазию при окраске тучных клеток и базофилов: толуидиновый синий специфично для MC окрашивает их секреторные гранулы в ярко-фиолетовый цвет [2]. После того, как гранулы вытесняются из MC, они теряют свои метакроматические свойства и окрашиваются в розовый цвет толуидиновым синим [2]. MC костномозгового происхождения, принадлежат к миелоидному ряду, относили ранее к клеткам врожденного иммунитета [42], но в последние годы появились свидетельства участия MC не только в фазе индукции, но и в эффекторной фазе адаптивного иммунитета [24, 42].

Имеются доказательства участия MC в адаптивном иммунном ответе путем рекрутирования лимфоцитов из регионарных лимфатических узлов [9, 11]. В литературе MC описаны как тканевые клетки, имеющие своих предшественников в костном мозге и селезенке, которые при определенной стимуляции поступают в кровоток, затем мигрируют во все васкуляризованные ткани и там завершают свое созревание, приобретая характеристики и свойства, специфичные для конкретной ткани [15]. В качестве ко-факторов, определяющих дифференцировку, пролиферацию и формирование гранул в MC, могут выступать интерлейкины: IL-3, IL-4, IL-10, IL-33. При активации MC могут освобождать определенный профиль медиаторов и других факторов: гистамин, триптазы, химазы, карбоксипептидазу А, протеоглики, TNF- α , IL-13, IL-3, GM-CSF, IL-5, GM-CSF, CXCL8 / IL-8, CCL3 / MIP-1 α , VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D, липидные медиаторы [15, 24, 42].

В 1989 г. А. Krishna и соавторы впервые выявили изменение количества и качества дегрануляции тучных клеток в яичниках у грызунов [26]. MC у них были ограничены воротами яичника и не определялись в фолликулах и желтом теле, что отличается от человека, у которого MC располагаются по всему яичнику, а гистамин MC участвует в проницаемости капилляров и в кровотоке яичника [26]. Впервые была доказана роль гистамина в стимуляции сократимости яичников, в овуляции и секреции фолликулярного прогестерона *in vitro*, что важно для понимания роли этого медиатора (Krishna A., Beesley K., Terranova P.F., 1989) [26].

В 1996 г. Jaiswal K. и Krishna A., применяя лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий (ФСГ) и тиреотропный гормон (ТТГ), 17 β -эстрадиол, вызывали увеличение количества тучных клеток в воротах яичников мышей по сравнению с контролем [22]. Применение ФСГ, ЛГ, эстрадиола увеличивало процент дегрануляции МС в коре, бурсе, мозговых отделах яичника. Исследователи пришли к выводу, что именно 17 β -эстрадиол является наиболее мощным среди примененных гормонов, активатором дегрануляции МС во всех отделах яичника [22], что требует дальнейшего исследования. Группа ученых из Северной Ирландии в 2001 г. выявила экспрессию рецептора эстрадиола и прогестерона на МС в верхних дыхательных путях человека, что является дополнительным доказательством участия половых гормонов наряду с иммунocyтaми в процессах воспаления. Значимо также доказанное воздействие прогестерона и эстрадиола в более высоких концентрациях на количество МС и синтез ими ряда цитокинов [44].

В 2003 г. ученые во главе с Weidinger S. определили, что триптаза напрямую взаимодействует со сперматозоидами человека во время их миграции через женские половые пути. МС генитального тракта могут являться клетками, влияющими на фертильность человека [43]. В 2009 г. Chen W. и соавторы при помощи иммуноцитохимического исследования (ИЦХ) впервые определили экспрессию рецептора андрогенов на тучных клетках человека [12]. В 2010 г. исследователи во главе с Jensen F. при использовании модели овариэктомированных животных доказали, что *in vivo* эстрадиол и прогестерон привлекают МС в матку и в дальнейшем провоцируют их дегрануляцию, что может быть фактором подготовки матки к имплантации плодного яйца [23]. Уточнение этих новых функций мастоцитов может помочь в таргетном воздействии на восстановление фертильности при СПКЯ.

В 2018 г. Zhu T.H. с соавторами определили, что концентрация эстрадиола, количество и активность МС были значительно выше в эндометриомах яичников, чем в здоровом яичнике, а параметры коррелировали с тяжестью связанной с эндометриозом дисменореи. Было доказано, что повышенные концентрации эстрадиола являются ключевым фактором дегрануляции и рекрутирования МС в яичник при эндометриомах, что может играть ключевую роль в дисменорее [45].

Впервые описание распределения МС в различные фазы эстрального цикла в яичнике млекопитающих проведено Намозова Р. и соавторами в 2017 году [19]. Выявлена прямая взаимосвязь между значениями эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови и количеством МС в мозговом веществе

яичника, поскольку наименьшее количество было обнаружено в анэструсе, когда уровни гормонов были наиболее низкими [19]. В последующие годы этой группой ученых впервые определено количество МС в коре и мозговом веществе яичников, рогах матки экспериментальных животных, эндометрии и миометрии в ранней фолликулярной фазе, лютеиновой фазе и анэструсе. Наибольшее число МС было обнаружено в ранней фолликулярной и лютеиновой фазах, а во время анэструса МС зафиксировано значимо меньше. Результаты исследований свидетельствуют о прямой зависимости количества МС в яичниках от фазы эстрального цикла и о возможном взаимном влиянии мастоцитов и половых стероидов на овуляцию [18, 19].

В 2019 г. Derbala Y. с соавторами опубликовали результаты анализа биопсий эндометрия на 7-е сутки после овуляции, где было выявлено повышенное количество МС в эндометрии у пациенток с привычным невынашиванием беременности по сравнению с фертильными женщинами. В этом исследовании представлено, что МС являются сверхактивными у пациенток с потерями беременности – это предполагает новую провоспалительную роль МС в иммуннопатологии привычного невынашивания беременности [14].

Исследуя локализацию и функции тучных клеток в матке, были определены три фенотипа локальных МС, и обнаружена экспрессия ими рецепторов стероидных гормонов – эстрогенов (ER α , ER β), прогестерона (PR) и глюкокортикоидов (GR). В ткани эндометрия выявили три специфических фенотипа МС: триптаза+/химаза- и триптаза+/химаза+, триптаза-/химаза+. Триптаза+ МС имели фенотип ER β +/ER α -/PR-/GR+. Экспрессия ER β и GR на тучных клетках эндометрия предполагает, что функция локальных МС может быть определена местным стероидным статусом и изменяется в зависимости от него [13].

Роль мастоцитов в патогенезе СПКЯ

Первые упоминания об участии МС в патогенезе СПКЯ опубликованы в 2001 г. [25]. Kim M. и соавторы при культивировании МС человека в отсутствие эстрогенов выявили наличие блокирующего эффекта эстрогенов на синтез цитокинов в МС, то есть наибольший синтез TNF- α и IL-6 тучными клетками зафиксировано в отсутствие эстрогенов [25].

В 2006 г. Vasiadi M. и соавторы установили, что прогестерон может ингибировать секрецию гистамина перитонеальными МС у крыс оба исследования демонстрируют участие прогестерона и эстрадиола в регуляции секреции мастоцитами биогенных аминов и, следовательно, частично объясняют усугубление симптомов воспаления у женщин с де-

фицитом прогестерона и дисбалансом эстрогенов при СПКЯ [41].

Российские ученые во главе с В.В. Еньковой изучили видовой состав и функциональную активность МС в децидуальной ткани пациенток с СПКЯ и неразвивающейся беременности. Определено, что количество тучных клеток в децидуальной ткани пациенток с неразвившейся беременностью выше, чем у пациенток с физиологической беременностью [3]. Морфологической особенностью являлось увеличение количества МС в децидуальной ткани и сдвиг протеазного профиля в сторону гиперэкспрессии химазы. Уточнение роли химаза-позитивных МС в патогенетических механизмах СПКЯ перспективно и требует дальнейшего исследования [3].

В 2022 г. проведено исследование, в котором проанализированы гены, связанные с иммунным ответом, дифференцированно активированные при СПКЯ. Идентифицированные диагностические биомаркеры при СПКЯ: домен HD, содержащий 3 (HDDC3) и синдекан 2 (SDC2; AUC 0,918 и 0,816 соответственно). Анализ иммунной инфильтрации показал, что уменьшение количества активированных МС и увеличение количества эозинофилов могут быть частью патогенеза СПКЯ. HDDC3 положительно коррелировал с Т-регуляторными клетками, активированными МС и моноцитами, но отрицательно коррелировал с активированными CD4-лимфоцитами при СПКЯ. SDC2 положительно коррелировал с активированными МС, плазматическими клетками и макрофагами M2, но отрицательно коррелировал с эозинофилами, нейтрофилами при СПКЯ. HDDC3 и SDC2 могут служить потенциальными биомаркерами, обозначающими новое представление о молекулярных механизмах иммунной регуляции при СПКЯ [31].

Заключение

Проанализированные исследования свидетельствуют об актуальности изучения клеточно-молекулярных иммунных механизмов патогенеза СПКЯ. Однако большинство экспериментальных исследований проведены на грызунах и крупных млекопитающих и достаточно малочисленны. Гипотеза о влиянии воспаления яичников как прямого стимулирующего фактора продукции андрогенов при СПКЯ требует дополнительного подтверждения в экспериментах с клеточными культурами. При подтверждении данной гипотезы – латентное воспаление яичников может оказаться наиболее эффективно курируемым звеном патогенеза СПКЯ [32, 37]. Актуально также дальнейшее изучение при СПКЯ морфо-функциональных свойств тучных клеток в яичнике, системы протеолиз-антипротеолиз, взаимодействия половых стероидов, кумулюсных кле-

ток и иммунцитов в яичнике. Малоизучена роль кумулюсных клеток при СПКЯ, в том числе в нарушении процессов обмена гиалуроновой кислоты и формировании фиброза ткани яичника, что крайне актуально при ановуляции. Учитывая, что большая часть предшествующих исследований проведена на экспериментальных животных с гормонально-индуцированной овуляцией, исследования на первичных клеточных культурах позволят более точно описать механизмы взаимодействия клеток яичника, МС и их медиаторов, влияние половых стероидов на функциональную активность и межклеточные контакты МС и, следовательно, на функциональную активность яичника и фертильность пациенток.

Список литературы / References

1. Адамян Л.В., Андреева Е.Н., Абсатарова Ю.С., Григорян О.Р., Дедов И.И., Карахалис Л.Ю., Мельниченко Г.А., Сутурина Л.В., Филиппов О.С., Чернуха Г.Е., Шереметьева Е.В., Ярмолинская М.И. Синдром поликистозных яичников. Клинические рекомендации. – М.: Минздрав России, 2021. – 61 с. ID: 258. URL.
2. Быков В.Л. Цитология и общая гистология (Функциональная морфология клеток и тканей человека). – 2001. – https://jennyk.ucoz.ru/Bykov_V_L_Tsitologia_i_obschaya_gistologia.pdf.
3. Енькова В.В., Хоперская О.В., Енькова Е.В., Олина А.А., Новикова Л.А. // Особенности видового состава и функциональной активности тучных клеток в децидуальной ткани пациенток с неразвивающейся беременностью и синдромом поликистозных яичников // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2020. – Т. 6, № 1. С. 107-117. DOI: 10.18413/2658-6533-2020-6-1-0-9, URL: <http://rrmedicine.ru/journal/annotation/1966/>.
4. Сутурина Л.В. Синдром поликистозных яичников в XXI веке // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. – 2017. – № 3. – С. 86-90. DOI: 10.24411/2303-9698-2017-00040.
5. Хаитов Р. М., Гариб Ф.Ю. Иммунология. Атлас. 2-е изд., обновл. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 416 с. – DOI: 10.33029/9704-5525-8-IMM-2020-1-416. 26
6. Alencar J.B. de, Alves H.V., Elpidio L.N., Visentainer J.E., Sell A.M. // Polymorphisms of Cytokine Genes and Polycystic Ovary Syndrome: A Review Metab Syndr Relat Disord 2016 Dec;14(10):468-474.doi: 10.1089/met.2016.0101. Epub 2016 Nov 3. PMID: 27809669 DOI: 10.1089/met.2016.0101.
7. Alissa E.M., Algarni S.A., Khaffji A.J., Al Mansouri N.M. Role of inflammatory markers in polycystic ovaries syndrome: In relation to insulin resistance. J Obstet Gynaecol Res. 2021 Apr;47(4):1409-1415. doi: 10.1111/jog.14684. Epub 2021 Jan 31. PMID: 33522094.
8. Azziz R., Carmina E., Dewailly D., Diamanti-Kandarakis E., Escobar-Morreale H.F., Futterweit W., Janssen O.E., Legro R.S., Norman R.J., Taylor A.E., Witchel S.F.; Task Force on the

Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen Excess and PCOS Society. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009 Feb;91(2):456-88. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.06.035. Epub 2008 2

9. Benoist C., Mathis D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):875-8. doi: 10.1038/nature01324. PMID: 12490961.

10. Borriello F., Granata F., Varricchi G., Genovese A., Triggiani M., Marone G. Immunopharmacological modulation of mast cells. *Curr Opin Pharmacol*. 2014 Aug;17:45-57. doi: 10.1016/j.coph.2014.07.002. Epub 2014 Jul 24. PMID: 25063971.

11. Brown M.A., Tanzola M.B., Robbie-Ryan M. Mechanisms underlying mast cell influence on EAE disease course. *Mol Immunol*. 2002 Sep;38(16-18):1373-8. doi: 10.1016/s0161-5890(02)00091-3. PMID: 12217411.

12. Chen W., Beck I., Schober W., Brockow K., Effner R., Buters J., Behrendt H., Ring J. // Human mast cells express androgen receptors but treatment with testosterone exerts no influence on IgE-independent mast cell degranulation elicited by neuromuscular blocking agents.// *Exp Dermatol* 2010 Mar;19(3):302-4. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00969.x. Epub 2009 Sep 16. PMID: 19758318. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2009.00969.x.

13. De Leo B., Esnal-Zufiaurre A., Collins F., Critchley H.O.D., Saunders P.T.K. Immunoprofiling of human uterine mast cells identifies three phenotypes and expression of ER β and glucocorticoid receptor. *F1000Res*. 2017 May 12;6:667. doi: 10.12688/f1000research.11432.2. PMID: 28620462; PMCID: PMC5461902.

14. Derbala Y., Elazzamy H., Bilal M., Reed R., Salazar Garcia M.D., Skariah A., Dambaeva S., Fernandez E., Germain A., Gilman-Sachs A., Beaman K., Kwak-Kim J. // Mast cell-induced immunopathology in recurrent pregnancy losses. *J Reprod Immunol*. 2019 Jul;82(1):e13128. doi: 10.1111/aji.13128. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31006153.

15. Detoraki A., Staiano R.I., Granata F., Giannattasio G., Prevete N., de Paulis A., Ribatti D., Genovese A., Triggiani M., Marone G. Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 May;123(5):1142-9. doi: 10.1016/j.jaci.2009.01.044. Epub 2009 Mar 10. PMID: 19275959.

16. Diamanti-Kandarakis E., Paterakis T., Alexandraki K., Piperi C., Aessopos A., Katsikis I., Katsilambros N., Kreatsas G., Panidis D. Indices of low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin. *Hum Reprod*. 2006 Jun;21(6):1426-31. doi: 10.1093/humrep/del003. Epub 2006 Feb 23. PMID: 16497699.

17. Escobar-Morreale H.F., Botella-Carretero J.I., Villuendas G., Sancho J., San Millán J.L. Serum interleukin-18 concentrations are increased in the polycystic ovary syndrome: relationship to insulin resistance and to obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Feb;89(2):806-11. doi: 10.1210/jc.2003-031365. PMID: 14764799.

18. Hamouzova P., Cizek P., Bartoskova A., Vitasek R., Tichy F. Changes in the mast cell distribution in the canine ovary and

uterus throughout the oestrous cycle. *Reprod Domest Anim*. 2020 Apr;55(4):479-485. doi: 10.1111/rda.13641. Epub 2020 Feb 3. PMID: 31961006.

19. Hamouzova P., Cizek P., Novotny R., Bartoskova A., Tichy F. Distribution of mast cells in the feline ovary in various phases of the oestrous cycle. *Reprod Domest Anim*. 2017 Jun;52(3):483-486. doi: 10.1111/rda.12938. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28211113.

20. He S., Mao D., Lei H., Dong B., Guo D., Zheng B., Sun P. Peripheral Blood Inflammatory-Immune Cells as a Predictor of Infertility in Women with Polycystic Ovary Syndrome. // *J Inflamm Res* 2020 Aug 18;13:441-450. doi: 10.2147/JIR.S260770. eCollection 2020. PMID: 32884325 PMCID: PMC7443446 DOI: 10.2147/JIR.S260770.

21. Hu C., Pang B., Ma Z., Yi H. Immunophenotypic Profiles in Polycystic Ovary Syndrome.// *Mediators Inflamm*. 2020 Mar 19;2020:5894768. doi: 10.1155/2020/5894768. PMID: 32256193; PMCID: PMC7106920.

22. Jaiswal K., Krishna A. Effects of hormones on the number, distribution and degranulation of mast cells in the ovarian complex of mice. *Acta Physiol Hung*. 1996;84(2):183-90. PMID: 9046364.

23. Jensen F., Woudwyk M., Teles A., Woidacki K., Taran F., Costa S., Malferttheiner S.F., Zenclussen A.C. Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. *PLoS One*. 2010 Dec 22;5(12):e14409. doi: 10.1371/journal.pone.0014409. PMID: 21203555; PMCID: PMC3008683.

24. Jönsson F., Daëron M. Mast cells and company / F. Jönsson, M. Daëron // *Front. Immun.* – 2012. – Vol. 3. – P. 16. doi: 10.3389 / fimmu.2012.00016. eCollection 2012.

25. Kim M.S., Chae H.J., Shin T.Y., Kim H.M., Kim H.R. Estrogen regulates cytokine release in human mast cells.// *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2001 Nov;23(4):495-504. doi: 10.1081/iph-100108596. PMID: 11792009.

26. Krishna A., Beesley K., Terranova P.F. Histamine, mast cells and ovarian function. // *J. Endocrinol*. 1989 Mar; 120(3): 363-71. doi: 10.1677/joe.0.1200363. PMID: 2647889.

27. Li Y., Zheng Q., Sun D., Cui X., Chen S., Bulbul A., Liu S., Yan Q. Dehydroepiandrosterone stimulates inflammation and impairs ovarian functions of polycystic ovary syndrome.// *J Cell Physiol*. 2019 May;234(5):7435-7447. doi: 10.1002/jcp.27501. PMID: 30580448 DOI: 10.1002/jcp.27501.

28. Liu Y., Liu H., Li Z., Fan H., Yan X., Liu X., Xuan J., Feng D., Wei X. The Release of Peripheral Immune Inflammatory Cytokines Promote an Inflammatory Cascade in PCOS Patients via Altering the Follicular Microenvironment. *Front Immunol*. 2021 May 17;12:685724. doi: 10.3389/fimmu.2021.685724. PMID: 34079559; PMCID: PMC8165443.

29. Mohajeri M., Kovanen P.T., Bianconi V., Pirro M., Cicero A.F.G., Sahebkar A. Mast cell tryptase - Marker and maker of cardiovascular diseases.// *Pharmacol Ther*. 2019 Jul;199:91-110. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.03.008. Epub 2019 Mar 12. PMID: 30877022.

30. Moulana M. Immunophenotypic profile of leukocytes in hyperandrogenemic female rat an animal model of polycystic

ovary syndrome. // Life Sci 2019 Mar 1;2:44-49. doi: 10.1016/j.lfs.2019.01.048. Epub 2019 Jan 29.

31. Na Z., Guo W., Song J., Feng D., Fang Y., Li D. Identification of novel candidate biomarkers and immune infiltration in polycystic ovary syndrome. *J Ovarian Res.* 2022 Jul 6;15(1):80. doi: 10.1186/s13048-022-01013-0. PMID: 35794640; PMCID: PMC9258136.

32. Peng Z., Sun Y., Lv X., Zhang H., Liu C., Dai S. Interleukin-6 Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016 Feb 5;11(2):e0148531. doi: 10.1371/journal.pone.0148531. PMID: 26849353; PMCID: PMC4746122.

33. Rotterdam ESHRE/ ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus of diagnostic criteria and longterm health risk related polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* 2004. Jan;19 (1):41-7. DOI:10.1093/humrep/deh098/ PMID:14688154.

34. Rudnicka E., Suchta K., Grymowicz M., Calik-Ksepka A., Smolarczyk K., Duszewska A.M., Smolarczyk R., Meczekalski B. Chronic Low Grade Inflammation in Pathogenesis of PCOS. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 6;22(7):3789. doi: 10.3390/ijms22073789. PMID: 33917519; PMCID: PMC8038770

35. Sarapik A., Velthut A., Haller-Kikkatalo K., Faure G.C., Béné M.C., de Carvalho Bittencourt M., Massin F., Uibo R., Salumets A. // Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:606459. doi: 10.1155/2012/606459. Epub 2011 Oct 5. PMID: 22007253; PMCID: PMC3189459.

36. Sayed B.A., Christy A., Quirion M.R., Brown M.A. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance // *Annual Review of Immunology.* 2008. Vol. 26. P. 705–739. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090320.

37. Tao T., Li S., Zhao A., Zhang Y., Liu W. Expression of the CD11c gene in subcutaneous adipose tissue is associated with cytokine level and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. // *Eur J Endocrinol.* 2012 Nov;167(5):705-13. doi: 10.1530/EJE-12-0340. Epub 2012 Sep 3. PMID: 22945299.

38. Tedesco S., Pia M., Ronda N., Cappellari R., Mioni R., Barbot M., Pinelli S., Plebani M., Bolego C., Scaroni C., Bernini B., Fadini P., Cignarella A. // Activation profiles of monocyte-macrophages and HDL function in healthy women in relation to menstrual cycle and in polycystic ovary syndrome patients. // *Endocrine* 2019 Nov;66(2):360-369. doi: 10.1007/s12020-019-01911-2. Epub 2019 Apr 16. PMID: 30993600 DOI: 10.1007/s12020-019-01911-2.

39. Theoharides TC, Stewart JM. Genitourinary mast

cells and survival. *Transl Androl Urol.* 2015 Oct;4(5):579-86. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.10.04. PMID: 26813805; PMCID: PMC4708553.

40. Turan V., Sezer E.D., Zeybek B., Sendag F. Infertility and the presence of insulin resistance are associated with increased oxidative stress in young, non-obese Turkish women with polycystic ovary syndrome. // *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2015 Apr;28(2):119-23. doi: 10.1016/j.jpog.2014.05.003. Epub 2014 May 20. PMID: 25850594.

41. Vasiadi M., Kempuraj D., Boucher W., Kalogeromitros D., Theoharides T. Progesterone inhibits mast cell secretion // *Int J Immunopathol Pharmacol* actions Oct-Dec 2006;19(4):787-94. doi: 10.1177/039463200601900408.

42. Walker M.E., Hatfield J.K., Brown M.A. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action? *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jan;1822(1):57-65. doi: 10.1016/j.bbdis.2011.02.009. Epub 2011 Feb 25. PMID: 21354470; PMCID: PMC4424662.

43. Weidinger S., Mayerhofer A., Frungieri M.B., Meineke V., Ring J., Kohn F.M. Mast cell-sperm interaction: evidence for tryptase and proteinase-activated receptors in the regulation of sperm motility. *Hum Reprod.* 2003 Dec;18(12):2519-24. doi: 10.1093/humrep/deg476. PMID: 14645166.

44. Zhao X.J., McKerr G, Dong Z., Higgins C.A., Carson J., Yang Z.Q., Hannigan BM. Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways. // *Thorax.* 2001 Mar;56(3):205-11. doi: 10.1136/thorax.56.3.205. PMID: 11182013; PMCID: PMC1758779.

45. Zhu T.H., Ding S.J., Li T.T., Zhu L.B., Huang X.F., Zhang X.M. Estrogen is an important mediator of mast cell activation in ovarian endometriomas. // *Reproduction.* 2018 Jan;155(1):73-83. doi: 10.1530/REP-17-0457. Epub 2017 Oct 26. PMID: 29074615.

Сведения об авторах:

Валикова О.В., 690012 Россия, г. Владивосток, ул. Фастовская, 14; e-mail: renalex.99@mail.ru; тел. 89025217772.

Здор В.В., 690090, Россия, г. Владивосток, ул. 1-я Морская, 20; e-mail: Victoria.zdor@mail.ru; тел. 89147919625.

Автор для переписки

Валикова Ольга Владимировна, 690012, Россия, г. Владивосток, ул. Фастовская, 14; e-mail: renalex.99@mail.ru; тел. 89025217772.

Васильев К.А., Шурыгина А.-П.С., Сергеева М.В., Романовская-Романько Е.А., Кривицкая В.З., Амосова И.В., Варюшина Е.А., Бузицкая Ж.В., Стукова М.А., Лioзнов Д.А.

МНОГОФАКТОРНЫЙ АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОГО ОТВЕТА ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ ГРИППОЗНЫМИ ВАКЦИНАМИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Резюме. Вирусы гриппа А и В являются широко распространенными респираторными патогенами человека и вызывают как единичные случаи и локальные вспышки заболевания, так и массовые сезонные эпидемии и пандемии. Вакцинация является основной стратегией борьбы с гриппом, а увеличение охвата вакцинированных в популяции определяет успех вакцинопрофилактики. Для выявления закономерностей формирования и оценки значимости множественных параметров иммунного ответа для вакцин различных типов важно использовать адекватные статистические методики. Эти методы позволяют оперировать множествами данных и уменьшить размерность этих данных, при этом сохранив максимальное количество информации о различиях между отдельными наблюдениями. Целью нашего исследования являлся анализ изменений показателей гуморального и клеточного иммунитета после вакцинации инактивированными гриппозными вакцинами (ИГВ) разных типов с применением статистических методов комплексного анализа данных. Исследование проведено на базе клинического отделения ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России в эпидемический по гриппу сезон 2018-2019 гг. В многофакторный анализ параметров иммунного ответа после иммунизации ИГВ «Гриппол плюс», «Совигрипп» и «Ультрикс» были включены данные, полученные для 39 добровольцев в период до вакцинации, на 7-е и 21-е сутки после вакцинации одной из перечисленных ИГВ. Для выявления параметров со значимыми различиями между группами применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) отдельно для каждого параметра и временной точки. Для визуализации различий по отобранным в дисперсионном анализе параметрам был использован метод главных компонент (Principal component analysis, PCA). Проведенные исследования выявили особенности формирования поствакцинального иммунного ответа на ИГВ различных типов. Показано, что наибольший вклад в формирование различий приходится на антиген-специфического CD4+ и CD8+ Т-клеточного иммунного ответа. Использованный подход является полезным инструментом при анализе параметров иммунного ответа в клинических исследованиях противогриппозных вакцин и других средств специфической профилактики инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: инактивированные противогриппозные вакцины, иммунный ответ, адьюванты, мультифакторный анализ, анализ главных компонент.

Образец цитирования: Васильев К.А., Шурыгина А.-П.С., Сергеева М.В., Романовская-Романько Е.А., Кривицкая В.З., Амосова И.В., Варюшина Е.А., Бузицкая Ж.В., Стукова М.А., Лioзнов Д.А. Многофакторный анализ параметров иммунного ответа после иммунизации инактивированными гриппозными вакцинами // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 13-20.

Vasiliev K.A., Shurygina A.-P. S., Sergeeva M.B., Romanovskaya-Romanko E.A., Krivitskaya V.Z., Amosova I.V., Varyushina E.A., Buzitskaya Z.V., Stukova M. A., Lioznov D.A.

MULTIVARIATE ANALYSIS OF THE PARAMETERS OF THE IMMUNE RESPONSE AFTER IMMUNIZATION WITH INACTIVATED INFLUENZA VACCINES

Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Influenza A.A. Smorodintsev» of the Ministry of Health of Russia

Abstract. Influenza A and B viruses are widely spread respiratory pathogens of humans and cause both isolated cases and local outbreaks of the disease, as well as massive seasonal epidemics and pandemics. Vaccination is the main strategy for combating influenza, and an increase in the proportion of vaccinated people in the population determines the success of vaccination. To identify patterns of postvaccination immune response formation to different types of vaccines and assess the significance of its multiple parameters the appropriate statistical methods should be applied. These methods allow to operate with large datasets and reduce their dimension, while keeping the maximum of information about the differences between individual observations. The aim of our study was the analysis of parameters of humoral and cellular immunity and their dynamics after vaccination with different types of inactivated influenza vaccines

(IIV) using statistical methods of complex data analysis. The study was conducted in the clinical department of the Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, in the flu season 2018 – 2019. The multivariate analysis of the immune response parameters after immunization with IIV “Grippol plus”, “Sovigripp” “Ultrix” included data obtained for 39 volunteers before vaccination, on the 7th and 21st days after vaccination. To identify parameters with significant differences between groups, one-factor analysis of variance (ANOVA) was used separately for each parameter and time point. To visualize the differences in the parameters selected in the analysis of variance, the Principal component analysis (PCA) method was used. The conducted studies revealed the peculiarities of the formation of a post-vaccination immune response to various types of IIV. It was shown that the factors of antigen-specific CD4+ and CD8+ T-cell immune response introduced the major contribution to the formation of the differences between groups. The approach is a powerful tool in analyzing the parameters of the immune response in clinical trials of influenza vaccines and other preventive medicine.

Keywords: inactivated influenza vaccines, post-vaccinal immune response, adjuvants, multivariate analysis, principal component analysis.

Введение

Вирусы гриппа А и В являются опасными респираторными патогенами человека и вызывают как единичные случаи и локальные вспышки заболевания, так и массовые сезонные эпидемии и пандемии. Вакцинация является основной стратегией борьбы с гриппом, а увеличение доли вакцинированных в популяции определяет успех вакцинопрофилактики [15]. По существующим оценкам, заболевание поражает одного из пяти непривитых детей и одного из десяти непривитых взрослых [13]. Кроме того, высокую актуальность сохраняет всестороннее исследование и совершенствование гриппозных вакцин [15]. Одним из подходов к совершенствованию вакцин против гриппа является включение в их состав адъювантов, усиливающих интенсивность и длительность иммунного ответа [1].

Используемые в России вакцины «Гриппол плюс», «Совигрипп» и «Ультрикс» относятся к трехвалентным инактивированным гриппозным вакцинам. Из них к адъювантным вакцинам относятся «Гриппол плюс» (адъювант «Полиоксидоний») и «Совигрипп» (адъювант «Совидон»). Вакцина «Ультрикс» является расщепленной (сплит) вакциной последнего поколения. Все три вакцины обладают хорошей переносимостью, безопасны и являются достаточно иммуногенными, согласно результатам ранее проведенных исследований [1-3].

Комплексный анализ множественных показателей гуморального, Т- и В-клеточного ответа после иммунизации противогриппозными вакцинами крайне важен для оценки поствакцинального иммунитета [4, 7, 8, 10-12]. При этом статистические методики, в том числе метод главных компонент (Principal component analysis, PCA), являются полезными инструментами для выявления закономерностей взаимодействия множественных факторов иммунного ответа. В настоящее время PCA широко используется в медицинских исследованиях и позволяет снизить размерность наборов данных, сохранив максимальное количество информации о различиях между отдельными наблюдениями [6].

Целью нашего исследования являлся анализ 64 показателей гуморального и клеточного иммунитета и их динамики после вакцинации разными типами ИГВ («Гриппол плюс», «Совигрипп» и «Ультрикс») с применением статистических методов комплексного анализа данных.

Материалы и методы

Наблюдательное проспективное исследование проведено на базе клинического отделения ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России в эпидемический период 2018-2019 гг. Со всеми участниками было подписано письменное информированное согласие. В исследование включали добровольцев в возрасте от 18 лет и старше, привитых одной из ИГВ. Вакцины вводились в/м в дозе 0,5 мл однократно. «Гриппол плюс» – субъединичная вакцина, содержит по 5 мкг гемагглютинаина (ГА) каждого из трех эпидемических штаммов вирусов гриппа типов А/Н1N1pdm09, А/Н3N2, В/Victoria и 500 мкг иммуноадъюванта Полиоксидоний® (ООО «НПО Петровакс Фарм»). «Совигрипп» – субъединичная вакцина, содержит по 5 мкг ГА двух эпидемических штаммов вирусов гриппа типов А/Н1N1pdm09, А/Н3N2, 11 мкг – В/Victoria и 500 мкг адъюванта «Совидон» (АО «НПО «Микроген»). Вакцина «Ультрикс», расщепленная (сплит-вакцина) содержит по 15 мкг ГА каждого из трех эпидемических штаммов вирусов гриппа типов А/Н1N1pdm09, А/Н3N2 и В/Victoria (ООО «Форт»). Образцы венозной крови участников были получены до вакцинации (день 0), на 7-е и 21-е сутки после вакцинации.

В комплексный анализ поствакцинального иммунного ответа были включены данные по 64 параметрам гуморального, Т- и В-клеточного иммунного ответа. При статистической обработке с целью нормализации данных был рассчитан Log2 кратности отношения каждого из исходных 64 параметров на 7-й и 21-й дни после вакцинации к исходным значениям (день 0) (FC, fold change):

$$\text{Log}_2 FC_{d7} = \text{Log}_2 \left(\frac{\text{value}_{d7}}{\text{value}_{d0}} \right); \text{Log}_2 FC_{d21} = \text{Log}_2 \left(\frac{\text{value}_{d21}}{\text{value}_{d0}} \right)$$

Для исключения случаев деления на «0» (при отсутствии иммунного ответа на 0-й день) к каждому значению было прибавлено минимальное ненулевое значение по соответствующей группе наблюдений. Средние значения Log2FC по каждой группе наблюдений были сравнены с «0» при помощи одновыборочного t-теста Стьюдента. Для выявления параметров иммунного ответа, по которым были обнаружены наибольшие различия у лиц, привитых разными ИГВ, группы были сравнены при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Для сравнения использовали Log2 кратности изменений по каждому из показателей иммунного ответа на 7-й и 21-й дни после вакцинации. Данные участников исследования, у которых по какой-либо причине отсутствовали показания хотя бы по одному из выбранных в дисперсионном анализе параметров, были исключены из анализа.

Для визуализации различий между группами был использован метод PCA. Для анализа использовали значения Log2 кратности изменений (Log2FC) параметров иммунного ответа, по которым между группами наблюдали достоверные различия ($p < 0.05$) в дисперсионном анализе (21 параметр). Координатные плоскости представляют собой двумерную аппроксимацию исходного 21-мерного набора данных. Координаты PC1 и PC2 подобраны таким образом, чтобы максимизировать среднеквадратичные расстояния между отдельными наблюдениями. Близкое расположение точек друг к другу указывает на наличие сходных значений, а удаленное – на различия Log2FC по каждому параметру иммунного ответа у соответствующих участников исследования. Путем сопоставления расположения точек и векторов определяют параметры с наиболее выраженными различиями между отдельными наблюдениями. Чем ближе друг к другу находятся проекции точек на некоторый вектор, тем более сходные значения Log2FC параметра иммунного ответа имеют данные участники исследования. Для оценки взаимосвязи соответствующих параметров учитываются длины векторов (факторные нагрузки на компоненты PC1 и PC2) и углы между ними. Острый угол между векторами свидетельствует о наличии положительной

корреляции, а угол, близкий к 180° – об отрицательной корреляции между Log2FC соответствующих параметров иммунного ответа. Если угол между двумя векторами близок к 90° , то между соответствующими переменными нет выраженной корреляции. Длины векторов определяют вклад соответствующих параметров иммунного ответа в обеспечение различий между исследуемыми группами.

Статистический анализ данных был проведен с использованием программ STATISTICA Version 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), RStudio Desktop 1.0.153 (RStudio Inc., USA).

Результаты и обсуждение

Характеристика групп добровольцев приведена в табл. 1. Сформированные группы были сопоставимы по количеству участников и возрасту.

В комплексный анализ поствакцинального иммунного ответа были включены 64 параметра. Из них 46 параметров отражали изменения антиген-специфического (A/H1N1pdm09, A/H3N2 и B/Victoria) Т-клеточного иммунного ответа (относительный состав популяций CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокины IFN- γ , IL-2 и TNF- α в различных сочетаниях, молекулы CD107a и Gransyme B). 12 параметров характеризовали изменения гуморального иммунного ответа (титр антител к вирусам гриппа A/H1N1pdm09, A/H3N2, B/Victoria и B/Yamagata в РТГА и РМН, а также авидность антител). 6 параметров отражали неспецифические изменения субпопуляционного состава В-лимфоцитов на 7-й и 21-й дни после вакцинации.

Гуморальный иммунный ответ (титр антител к вирусам гриппа A/H1N1pdm09, A/H3N2, B/Victoria и B/Yamagata) оценивали в стандартных серологических реакциях торможения гемагглютинации (РТГА) и микронейтрализации (РМН) [10]. Измерение авидности антител в ИФА проводили к трем компонентам вакцин, а также дополнительно к вирусу гриппа В генетической линии Yamagata, не входившему в состав вакцин.

В дополнение к серологическим параметрам существенный вклад по защитной эффективности вакцин вносит анализ клеточных коррелятов протекции [4, 5]. Адекватным методом изучения функ-

Таблица 1

Характеристика групп добровольцев, привитых трехвалентными инактивированными гриппозными вакцинами

Группы ИГВ	Количество в группе, чел.	Распределение по полу, чел. (%)		Возраст, лет M $\pm$ SD
		Мужчины	Женщины	
«Гриппол плюс»	14	4 (28,6%)	10 (71,4%)	43,0 $\pm$ 11,9
«Совигрипп»	15	7 (46,7%)	8 (53,3%)	46,0 $\pm$ 14,4
«Ультрикс»	10	2 (20,0%)	8 (80,0%)	51,0 $\pm$ 17,5
Всего	39	13 (33,3%)	26 (66,7%)	46,0 $\pm$ 14,3

циональной гетерогенности Т-клеточного ответа является проточная цитометрия, поскольку она предоставляет информацию как о фенотипе, так и о продукции цитокинов Т-клетками. Известно, что инфекция, вызванная вирусом гриппа, вызывает CD4+ Т-клеточный ответ, при этом происходит смещение в сторону Th1-ответа. CD4+ Т-клетки продуцируют различные цитокины, которые регулируют функции В-клеток и CD8+ Т-клеток. CD8+ Т-клетки или цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) способствуют элиминации вируса путем прямого лизиса инфицированных клеток с помощью перфорина и гранзимов или экспрессии лигандов фактора некроза опухоли (TNF). Показана важность Т-клеток памяти в защите от повторного заражения сезонным гриппом [10, 12]. Работа Paterson et al. демонстрирует, что количество специфичных для гриппа CD8+ Т-клеток памяти в циркуляции обратно коррелируют с вирусной нагрузкой [12]. Полифункциональные Т-лимфоциты являются одним из ключевых компонентов поствакцинального Т-клеточного ответа. Функции этих клеток включают дегрануляцию цитотоксических белков и одновременно продукцию различных цитокинов. Функционально они превосходят клетки, продуцирующие один цитокин, и играют важную роль в контроле гриппозной инфекции [7]. CD107a был описан как маркер дегрануляции CD8+ Т-клеток после стимуляции, а также как маркер функци-

ональной активности NK-клеток. Анализ продукции Gransyme В используется для количественной оценки цитотоксического Т-клеточного ответа. По данным Salk et al., специфичные для гриппа реакции на Gransyme В усиливаются после вакцинации [13]. По данным ряда публикаций, после вакцинации гриппозными вакцинами наблюдаются изменения количественного состава субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови у человека [8].

Для выявления параметров иммунного ответа, по которым были выявлены наибольшие различия у лиц, привитых разными ИГВ, соответствующие группы были сравнены при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Результаты анализа ANOVA показали, что статистически значимые различия между группами на 7-й и/или 21-й дни после вакцинации были определены по 21 параметру иммунного ответа. Эти параметры были выбраны для дальнейшего анализа методом PCA.

Два из них отражали изменения популяционного состава В-лимфоцитов (относительное количество В-лимфоцитов, относительное количество наивных В-лимфоцитов). Четыре параметра были связаны с гуморальным ответом (авидность антител к антигенам вируса A/H1N1pdm09, A/H3N2, B/Victoria и B/Yamagata). 15 параметров отражали изменения относительного состава антиген-специфичных (A/H1N1pdm09, A/H3N2, B/Victoria, B/Yamagata) CD4+

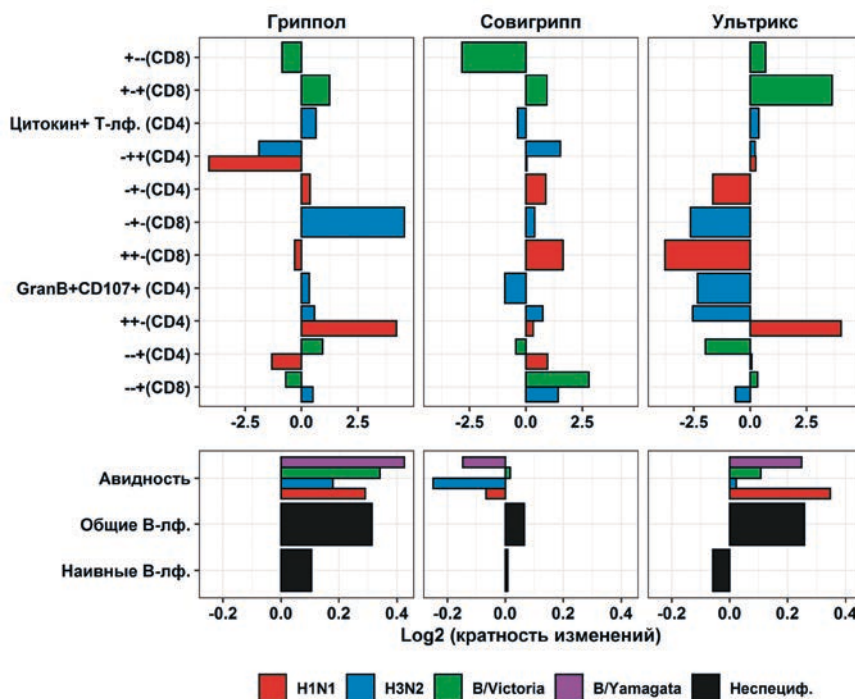


Рис. 1. Средняя кратность изменений параметров иммунного ответа, по которым наблюдали наиболее выраженные различия между исследуемыми группами на 7-й день после вакцинации. Цвет столбцов обозначает специфичность параметра иммунного ответа к подтипу вируса гриппа А или В. Символами ++, +, ++ и т. д. обозначены популяции цитокин-продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов: IFN γ -IL2+TNF α +, IFN γ -IL2+TNF α - и т. д.)

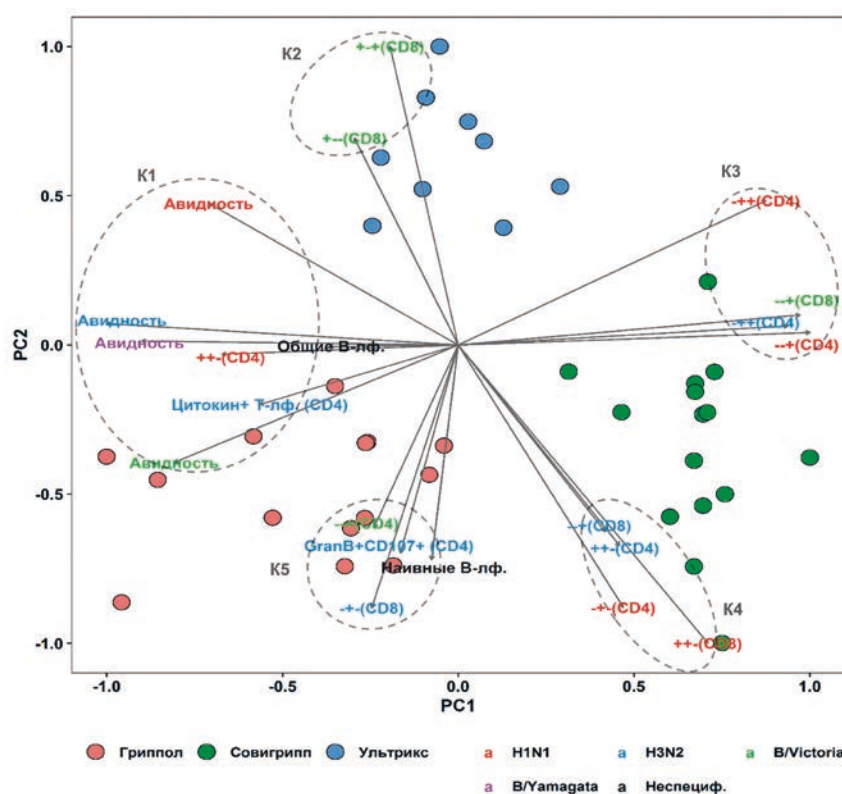


Рис. 2. Визуализация различий параметров иммунного ответа между группами при помощи метода главных компонент (PCA) на 7-й день после вакцинации. Применена «min-max» нормализация. Все данные расположены на шкале [-1;1] с сохранением исходных расстояний между точками. Цветными символами обозначены значения первых двух главных компонент у каждого участника исследования. Цвет точек обозначает принадлежность соответствующих наблюдений к группам вакцин «Совигрипп», «Гриппол плюс» или «Ультрикс». Текстом на графике обозначены названия изучаемых параметров иммунного ответа. Символами ++, +-, +++ и т. д. обозначены популяции цитокин-продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов: IFN γ -IL2+TNF α +, IFN γ -IL2+TNF α -, IFN γ +IL2+TNF α - и т. д. Цвет текста обозначает специфичность того или иного параметра иммунного ответа к вирусам гриппа подтипа А или В. Пунктирные линии вокруг вершин векторов ограничивают кластеры переменных, характеризующихся близкими значениями факторных нагрузок на две первые главные компоненты

и CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокины IFN- γ , IL-2 и TNF- α , а также молекулы CD107a и Gransyme B в различных сочетаниях.

На рис. 1 представлены средние значения Log2FC параметров иммунного ответа со статистически значимыми различиями между группами на 7-й день после вакцинации. Как показано на рисунке 1, ряд параметров Т-клеточного иммунного ответа (относительное содержание H1N1- и H3N2-специфичных CD4+/CD8+ IFN γ -IL2+TNF α - и CD8+IFN γ +IL2+TNF α - Т-лимфоцитов) в группах вакцин «Совигрипп» и «Гриппол плюс» прирастали по сравнению с Д0 либо значительно не изменялись, в то время как в группе вакцины «Ультрикс» наблюдали снижение значений в 1,5-2 раза. В группе вакцины «Совигрипп», в отличие от групп «Гриппол плюс» и «Ультрикс», происходило снижение авидности антител к вирусам гриппа А/Н1N1, А/Н3N2 и В/Yamagata. Группы «Гриппол плюс» и «Ультрикс» ха-

рактеризовались различными степенями прироста данных показателей.

При визуализации указанных выше различий между группами методом PCA на 7-й день выявляются четкие кластеры на графике главных компонент (PC) (рис. 2). При этом первая главная компонента (PC1) обуславливает преимущественно различия между группами вакцин «Гриппол плюс» и «Совигрипп», а также «Совигрипп» и «Ультрикс». Различия между группой вакцины «Ультрикс» и двумя другими группами обусловлены в основном второй главной компонентой (PC2). Можно выделить 5 кластеров параметров иммунного ответа с наиболее выраженными различиями между группами (рис. 2).

Первый кластер (K1) включал преимущественно параметр гуморального иммунного ответа, дающий наибольшие факторные нагрузки на первую главную компоненту – авидность антител к А/

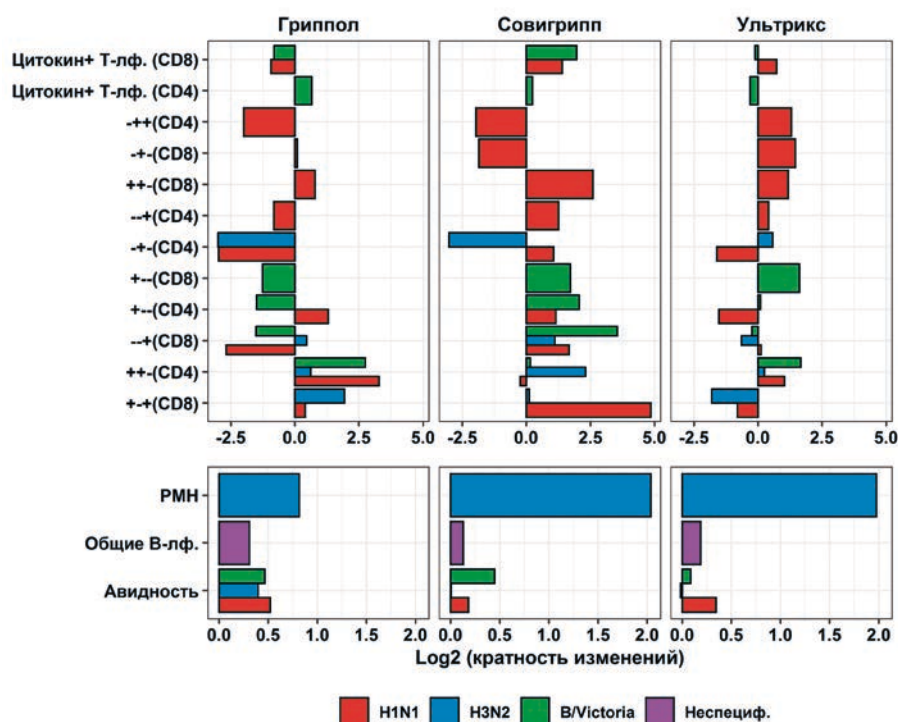


Рис. 3. Средняя кратность изменений параметров иммунного ответа, по которым наблюдались наиболее выраженные различия между исследуемыми группами на 21-й день после вакцинации. Обозначения те же, что на рис. 1

H1N1pdm09, A/H3N2, B/Victoria и B/Yamagata. К K1 также относилось изменение общего содержания В-лимфоцитов и H1N1-специфичных CD4+ Т-лимфоцитов в крови участников исследования. Кластеры K2-K5 содержали параметры, связанные с изменением уровня различных популяций цитокин-продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов. Параметры, входящие в состав кластеров K2 и K5, имели сходный характер изменений в группах вакцин «Совигрипп» и «Гриппол плюс», что отличало эти две группы от группы «Ультрикс». Кластер K3, как и кластер K1, обуславливал различия между группами вакцин «Гриппол плюс» и «Совигрипп», а также «Совигрипп» и «Ультрикс». Параметры, входящие в состав кластера K4, давали высокие факторные нагрузки на обе главные компоненты. Все три группы отличались друг от друга по показателям, входящим в состав данного кластера. Таким образом, три исследуемые группы отличались друг от друга по большинству параметров иммунного ответа, о чем свидетельствует формирование трех равноудаленных друг от друга кластеров, объединяющих наблюдения в соответствии с наименованиями вакцин.

Направление и средняя величина Log2 кратности изменений анализируемых параметров иммунного ответа на 21-й день приведены на рис. 3. Параметры Т-клеточного иммунного ответа (показатели CD4+ и CD8+ Т-клеточного иммунного ответа на антигены A/H1N1pdm09 и B/Victoria) характеризуются

выраженным приростом у лиц, привитых вакциной «Совигрипп», в то время как участники исследования, получавшие вакцины «Ультрикс» и «Гриппол плюс», характеризовались менее выраженным приростом или снижением указанных параметров.

Визуализация различий методом PCA на 21-й день показала, что группы участников исследования, привитых вакцинами «Совигрипп», «Гриппол плюс» и «Ультрикс», наиболее сильно отличались друг от друга по значениям PC1 (рис. 4). Параметры, входящие в K1, дают наибольшие факторные нагрузки на PC1, в значительной степени обуславливая различия между группами. В состав K1 входят показатели CD4+ и CD8+ Т-клеточного иммунного ответа на антигены A/H1N1pdm09 и B/Victoria. Близкое расположение вершин соответствующих векторов на графике главных компонент свидетельствует о выраженной корреляции значений Log2FC указанных параметров иммунного ответа. Исходя из представленных данных, можно заключить, что на 21-й день после вакцинации различия между исследуемыми группами были связаны преимущественно с разными значениями Log2FC параметров Т-клеточного иммунного ответа в исследуемых группах.

Проведенный в данной работе мультифакторный анализ позволил выявить ведущие факторы при формировании иммунного ответа после введения препаратов «Гриппол плюс» «Совигрипп» или «Ультрикс». Обнаруженные особенности иммуно-

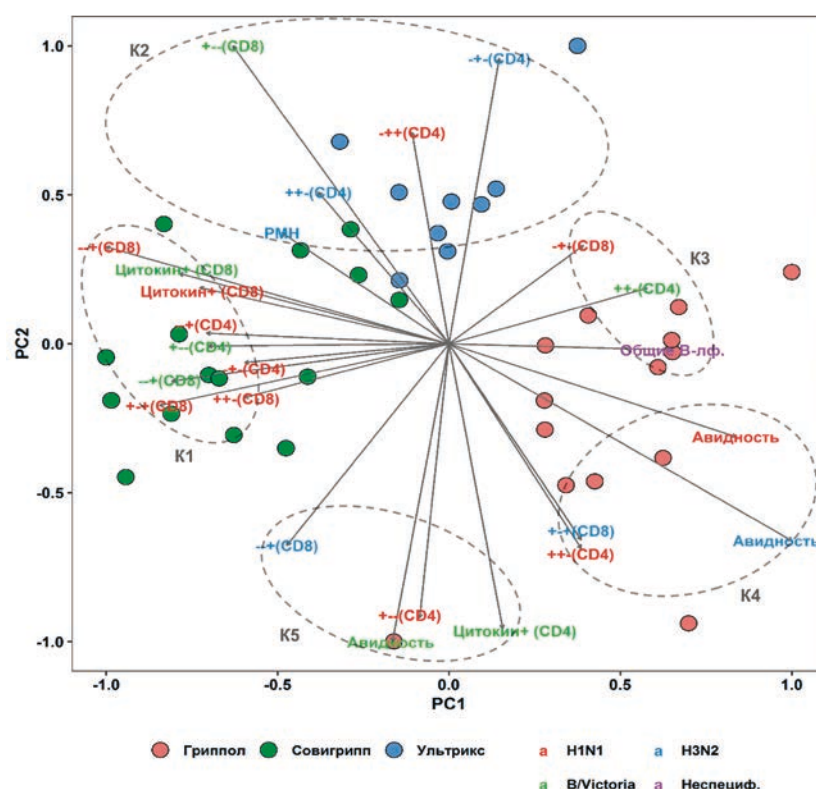


Рис. 4. Визуализация различий между группами при помощи метода главных компонент (PCA) на 21-й день после вакцинации. Обозначения те же, что на рис. 2

генных свойств вакцин «Гриппол» и «Совигрипп» могут быть связаны, по нашему мнению, с наличием адъювантов в их составе. Ранее было показано, что включение адъюванта «Совидон» в состав вакцин повышает их эффективность, стимулирует антителогенез и завершенность фагоцитоза *in vivo* [3]. Вакцина «Гриппол плюс», благодаря иммуномодулирующим свойствам адъюванта «Полиоксидоний» обладает выраженным действием на параметры клеточного и гуморального иммунного ответа [1].

В то же время на обнаруженные различия показателей в исследуемых группах могли оказать влияние и другие факторы, такие как уровень предсуществующего иммунитета к гриппу у участников данного исследования [9].

Закключение

Проведенный в данной работе комплексный анализ позволил выявить особенности формирования иммунного ответа после вакцинации разными ИГВ («Гриппол плюс», «Совигрипп» или «Ультрикс») в эпидемическом сезоне 2018-2019 гг. Результаты, полученные при помощи визуализации данных методом PCA, позволяют сделать вывод о том, что наибольший вклад в формирование различий между группами приходится на антиген-специфического CD4+ и CD8+ Т-клеточного иммунного ответа. Данный подход с использованием метода PCA является полезным инструментом при

анализе параметров иммунного ответа в клинических исследованиях противогриппозных вакцин и других средств специфической профилактики инфекционных заболеваний.

Финансовая поддержка. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации по теме «Оценка напряженности коллективного иммунитета и эпидемиологической эффективности гриппозных вакцин в Российской Федерации» 2019-2021 гг.

Список литературы / References

1. Караулов А.В., Быков А.С., Волкова Н.В. Обзор исследований вакцин группы Гриппол и развитие современных адъювантов. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2019; 18 (3): 101–119. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-101-119>.
2. Karaulov A. V., Bykov A. S., Volkova N. V. [Review of Grippol Family Vaccine Studies and Modern Adjuvant Development]// Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2019. Vol.18. №3. P.101–119. (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-101-119>.
3. Михайлова Е.В., Яшина А.Е., Романовская А.В., Хворостухина Н.Ф. Клиническая эффективность, безопасность, иммуногенность отечественной противогриппозной вакцины нового поколения // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2016. – № 3. – С. 100-103.
4. Mikhailova E.V., Yashina A.E., Romanovskaya A.V., Hvorostukhina N.F. [Clinical efficacy and safety of domestic vaccines

against influenza in children of Volgograd // Vestnik of the Volgograd State Medical University. 2016. № 3, P. 100–103. (In Russ.).

3. Никифорова А.Н., Исакова-Сивак И.Н., Ерофеева М.К., Фельдблюм И.В., Руденко Л.Г. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественной субъединичной адъювантной вакцины Совигрипп у добровольцев 18–60 лет // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – №2. – С. 72–78.

Nikiforova A.N., Isakova-Sivak I.N., Erofeeva M.K., Feldblum I.V., Rudenko L.G. The results of studying the safety and immunogenicity of the domestic subunit adjuvant vaccine Sovigripp in volunteers aged 18–60 years]. 2014. Epidemiology and vaccine prevention. №2. P. 72–78.

4. Altenburg A.F., Rimmelzwaan G.F., de Vries R.D.. Virus-specific T cells as correlate of (cross-)protective immunity against influenza //Vaccine. 2015. Vol. 33. No 4. P. 500–6. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.11.054

5. Janssens Y., Joye J., Waerlop G., Clement F., Leroux-Roels G., Leroux-Roels I. The role of cell-mediated immunity against influenza and its implications for vaccine evaluation // Front. Immunol. 2022. 13:959379. doi: 10.3389/fimmu.2022.959379

6. Jolliffe I.T., Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments // Phil. Trans. R. Soc. A. 2016. 2016374: 20150202. <http://dx.doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>

7. Kannanganat S., Ibegbu C., Chennareddi L., Robinson H.L., Amara R.R. Multiple-Cytokine-Producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-Cytokine-Producing cells // J. Virol. 2007. Vol.81. No16. P.8468–76. doi: 10.1128/JVI.00228-07

8. Lam J.H., Baumgarth N. The multifaceted B cell response to influenza virus // J. Immunol. 2019. Vol. 202. No 2. P.351–359. doi: 10.4049/jimmunol.1801208

9. Lewnard J. A., Cobey S. Immune History and Influenza Vaccine Effectiveness // Vaccines. 2018. Vol. 6. No 2. P. 28. doi: 10.3390/vaccines6020028.

10. McKinsty K.K., Strutt T.M., Kuang Y., Brown D.M., Sell S., Dutton R.W., Swin S.L. Memory CD4+ T cells protect against influenza through multiple synergizing mechanisms // J. Clin. Invest. 2012. Vol. 122. No 8. P.2847–56. doi: 10.1172/JCI63689

11. Ohmit S.E., Petrie J.G., Cross R.T., Johnson E., Monto A.S. Influenza hemagglutination-inhibition antibody titer as a correlate of vaccine-induced protection // J. Infect. Dis. 2011. Vol. 204. No 12. P.1879–85. doi: 10.1093/infdis/jir661

12. Paterson S., Kar S., Ung S.K., Gardener Z., Bergstrom E., Ascough S., Kalyan M., Zyla J., Maertzdorf J., Mollenkopf H.-J., Weiner J., Jozwik A., Jarvis H., Jha A., Nicholson B.P., Veldman T., Woods C.W., Mallia P., Kon O.M., Kaufmann S.H.E., Openshaw P.J., Chiu C. Innate-like gene expression of lung-resident memory

CD8(+) T cells during experimental human influenza: A clinical study // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2021. Vol. 204. No 7. P. 826–41. doi: 10.1164/rccm.202103-0620OC

13. Salk HM, Haralambieva IH, Ovsyannikova IG, Goergen KM, Poland GA. Granzyme b ELISPOT assay to measure influenza-specific cellular immunity // J. Immunol. Methods. 2013. 398-399:44–50. doi: 10.1016/j.jim.2013.09.007

14. Somes M.P., Turner R.M., Dwyer L.J., Newall A.T. Estimating the annual attack rate of seasonal influenza among unvaccinated individuals: a systematic review and meta-analysis // Vaccine. 2018. Vol. 36. No 23. P.3199–3207. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.04.063

15. World Health Organization. Vaccines against influenza: WHO position paper – May 2022 // Wkly Epidemiol. Rec. 2022. Vol. 97, No 19. P. 185–208.

Сведения об авторах:

Васильев К.А., кандидат биологических наук, научный сотрудник.

Шурыгина А.-П.С., кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник.

Сергеева М.В., ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук.

Романовская-Романько Е.А., старший научный сотрудник, кандидат биологических наук.

Кривицкая В.З. ведущий научный сотрудник лаборатории изучения факторов риска при гриппе и ОРВИ, доктор биологических наук.

Амосова И.В. заведующая лабораторией клеточных культур, кандидат биологических наук.

Варюшина Е.А., доктор биологических наук, ведущий специалист в области лабораторных исследований.

Бузицкая Ж.В., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник.

Стукова М.А., кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией.

Леоэнов Д.А., доктор медицинских наук, директор института.

Автор для переписки

Варюшина Елена Анатольевна, доктор биологических наук, ведущий специалист в области лабораторных исследований лаборатории векторных вакцин. ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» МЗ РФ, 197376, ул. профессора Попова, д. 15/17, г. Санкт-Петербург, Россия. Тел. +7 (906) 244-95-19; e-mail: elenavaryush@gmail.com; elena.varyushina@influenza.spb.ru.

О.А. Васильева¹, Т.С. Прохоренко², Ю.В. Колобовникова¹, В.С. Полетика¹, О.И. Уразова¹,
Т.Е. Кононова¹, Е.Г. Чурина¹, Г.В. Рейнгардт¹, А.В. Курносенко¹

ГАЛЕКТИН-3 КАК МОДУЛЯТОР ЦИТОКИНОПОСРЕДОВАННОЙ КООПЕРАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ IN VITRO

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск

²ОГБУЗ «Томский региональный центр крови», г. Томск

Резюме. Цель работы. Исследовать влияние рекомбинантного галектина-3 на секрецию цитокинов, свойственных различным субпопуляциям лимфоцитов-хелперов (Th1, Th2, Th17, Treg) в культуре in vitro. Материалы и методы. Материалом для исследования служила периферическая кровь от здоровых людей (n=17), из которой выделяли лимфоциты методом градиентного центрифугирования. Лимфоциты культивировали в течение 72 часов в CO₂-инкубаторе с рекомбинантным галектином-3 и активирующими антителами (антиCD3/антиCD28). В супернатантах культур лимфоцитов определяли концентрацию цитокинов (IL-10, IL-13, IL-17A, IL-22, IFN γ , TNF α , TGF β 1) методом иммуноферментного анализа. Результаты. Рекомбинантный галектин-3 усиливал in vitro секрецию лимфоцитами IL-17A, IL-22 в дозе 0,5 мкг/мл, а также IL-13, TNF α и IFN γ в дозах 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл (в большей степени при действии в дозе 0,5 мкг/мл) и угнетал образование IL-17, IL-22 в дозе 1 мкг/мл и IL-10, TGF β 1 при тестировании обеих концентраций. Заключение. Галектин-3 оказывает дозозависимое модулирующее влияние на цитокинсекреторную функцию лимфоцитов здоровых доноров in vitro. Функциональный дисбаланс в лимфоцитах крови при действии рекомбинантного галектина-3 проявляется индукцией секреции провоспалительных цитокинов (IFN γ , IL-17, IL-22, TNF α) и противовоспалительного интерлейкина-13 на фоне подавления образования супрессорных цитокинов IL-10 и TGF β 1. Детальное изучение иммуотропных эффектов галектина-3 в отношении отдельных субпопуляций лимфоцитов актуально с точки зрения разработки новых подходов терапии опухолевых и аутоиммунных заболеваний, сопровождающихся избыточной продукцией данного лектина.

Ключевые слова: галектин-3, цитокины, Т-хелперы, интерлейкины, лимфоциты.

Образец цитирования: Васильева О.А., Прохоренко Т.С., Колобовникова Ю.В., Полетика В.С., Уразова О.И., Кононова Т.Е., Чурина Е.Г., Рейнгардт Г.В., Курносенко А.В. Галектин-3 как модулятор цитокиноопосредованной кооперации лимфоцитов in vitro // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 21-27.

О.А. Vasil'eva¹, T.S. Prokhorenko², Y.V. Kolobovnikova¹, V.S. Poletika¹, O.I. Urazova¹,
T.E. Kononova¹, E.G. Churina¹, G.V. Reynhardt¹, A.V. Kurnosenko¹

GALECTIN-3 AS A MODULATOR OF CYTOKINE-MEDIATED LYMPHOCYTE COOPERATION IN VITRO

¹Siberian State Medical University, SSMU, Tomsk

²Tomsk Regional Blood Center

Abstract. Aim of the study. To investigate the effect of recombinant galectin-3 on the cytokines secretion of various subpopulations of helper-lymphocytes (Th1, Th2, Th17, Treg) in culture in vitro. Material and methods. The material for the study was peripheral blood from healthy people (n=17), from which lymphocytes were isolated by gradient centrifugation. Lymphocytes were cultured for 72 hours in a CO₂-incubator with recombinant galectin-3 and activating antibodies (antiCD3/antiCD28). The concentration of cytokines (IL-10, IL-13, IL-17A, IL-22, IFN γ , TNF α , TGF β 1) in the supernatants of lymphocyte cultures was determined by enzyme immunoassay. Results. Recombinant galectin-3 in vitro enhanced the secretion of IL-17A, IL-22 by lymphocytes, acting at a dose of 0.5 μ g/ml; IL-13, TNF α and IFN γ at doses of 0.5 μ g/ml and 1 μ /ml (more pronounced when acting at a dose of 0.5 μ g/ml) and inhibited the production of IL-17, IL-22 at a dose of 1 μ g/ml and IL-10, TGF β 1 when testing both concentrations. Conclusion: Galectin-3 has a dose-dependent modulating effect on the cytokine-producing function of healthy donors lymphocytes in vitro. Functional imbalance in blood lymphocytes under the action of recombinant galectin-3 is manifested by induction of pro-inflammatory (IFN γ , IL-17, IL-22, TNF α) and anti-inflammatory (interleukin-13) cytokines secretion, against the background of oppression of the suppressor cytokines (IL-10 and TGF β 1) production. A detailed study of the immunotropic effects of galectin-3 in relation to individual lymphocytes subpopulations is relevant from the view point of development new approaches to the treatment of tumor and autoimmune diseases accompanied by excessive production of this lectin.

Key words: galectin-3, cytokines, T-helper, interleukins, lymphocytes.

Введение

На сегодняшний день известно много биологически активных молекул, обладающих влиянием на иммунную систему, которая, в свою очередь, имеет уникальные инструменты для поддержания иммунологической реактивности организма. Ключевым событием в патогенезе иммунозависимых заболеваний является дифференцировка наивных Т-лимфоцитов в определенный клон клеток. С нарушением механизмов иммунного ответа связано развитие социально значимых аутоиммунных и опухолевых заболеваний. В качестве возможного регулятора иммунного гомеостаза рассматривается галектин-3, который способен влиять на процессы трансдукции сигналов, межклеточную кооперацию и реализацию запрограммированной гибели клеток.

Галектин-3 – низкомолекулярный белок, относящийся к семейству лектинов, который секретируется моноцитами (макрофагами), эпителиальными клетками, клетками тимуса, лимфоузлов, селезенки, а также лимфоцитами, дендритными и опухолевыми клетками. Он функционирует как экстрацеллюлярная молекула и принимает участие в активации различных типов клеток, таких как моноциты, макрофаги, тучные клетки, нейтрофилы и лимфоциты [6].

Основной подход для идентификации и изучения эффекторных функций субпопуляций Т-лимфоцитов заключается в оценке спектра продуцируемых ими цитокинов, что характеризует их природу и функцию. Цитокины регулируют амплитуду и продолжительность воспалительного и иммунного ответов, они действуют в очень низких концентрациях, связываясь с высокоаффинными рецепторами. Избыточная или недостаточная продукция цитокинов является одним из звеньев патогенеза многих заболеваний [2]. Основываясь на этом, уже разработаны и апробированы как рекомбинантные препараты цитокинов, так и антицитокиновые препараты, и в настоящее время ведется поиск новых регуляторов иммунологического баланса.

В качестве регуляторов Т-клеточного гомеостаза в данном исследовании *in vitro* оценивается способность галектина-3 влиять на продукцию основных эффекторных цитокинов Т-лимфоцитов. Основными субпопуляциями лимфоцитов, участвующими в регуляции иммунного ответа, являются Т-хелперы, а именно Th1, Th2, Th17 и Т-регуляторные клетки [3]. Особенностью галектинов является их разнонаправленное действие на клетки в зависимости от их субпопуляционной принадлежности, стадии активации и наличия других костимулирующих сигналов [6].

Предполагается, что галектины, принимая участие в межклеточной кооперации, способны модулировать направление иммунного ответа и

рассматриваются в качестве возможных мишеней для создания новых подходов к терапии патологических процессов, связанных с гиперактивацией или, напротив, недостаточной функцией иммунитета. В связи с этим целью нашей работы явилось исследование влияния рекомбинантного галектина-3 на секрецию цитокинов, свойственных различным субпопуляциям лимфоцитов-хелперов (Th1, Th2, Th17, Treg) в культуре *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила периферическая кровь от здоровых людей обоего пола ($n=17$), средний возраст которых составил 26 ± 4 года. Взятие крови производилось утром натощак из локтевой вены в количестве 20 мл в вакуумные пробирки с антикоагулянтом КЗ-ЭДТА. Из цельной крови методом градиентного центрифугирования с использованием фиколла ($\rho=1,077$) выделяли лимфоциты. Количество выделенных клеток стандартизировали до $2,0 \times 10^6$ /мл, разбавляя полной питательной средой RPMI-1640 (ЗАО «Вектор», Новосибирск). Культивирование клеток проводили в специализированных 48-луночных стерильных планшетах с крышкой (BD Falcon™, США) в CO_2 -инкубаторе. Для оценки влияния галектина-3 на секрецию цитокинов лимфоцитами в ходе предварительных экспериментов определили оптимальные дозы данного лектина для воздействия на клетки. Для этого воспользовались рекомендациями производителя рекомбинантного галектина-3 (RnD Systems, США) и имеющимися данными литературы. Экспериментально были протестированы следующие концентрации галектина-3: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 5,0 мкг/мл. Оценивали влияние данных доз рекомбинантного галектина-3 на апоптоз лимфоцитов. В результате определения концентраций галектина-3, индуцирующих апоптотическую гибель лимфоцитов, нами были выбраны две концентрации (1,0 и 0,5 мкг/мл) – в 2 и 4 раза ниже проапоптотических, которые в дальнейшем использовались в эксперименте. Для оценки влияния галектина-3 на секрецию цитокинов Th-лимфоцитами выделенные клетки культивировали в течение 72 ч. с рекомбинантным галектином-3 (в дозах 0,5 и 1,0 мкг/мл) вместе с активирующими антителами. Для активации клеток использовали моноклональные антитела – антиCD3/антиCD28 (BD Pharmingen™, США), имитирующие взаимодействие Т-лимфоцитов с антигенпрезентирующими клетками в дозах 1 и 2 мкг/мл соответственно. Контролем служила культура клеток без добавления галектина-3. За 4 ч. до окончания инкубации в культуры клеток добавляли стимуляторы форболмиристил-ацетат (ФМА) в дозе 50 нг/мл и кальция иономицин в дозе 1 мкг/мл. После окончания культивирования

среду с клетками переносили из лунок планшета в пробирки типа эппендорф, центрифугировали 10 мин. при 1500 об./мин. и супернатант использовали для детекции цитокинов. Измеряли концентрацию интерлейкинов (IL) 10, IL-13, IL-17A, IL-22, интерферона (IFN) γ , трансформирующего ростового фактора (TGF) β 1, фактора некроза опухоли (TNF) α в культуральных супернатантах методом твердофазного иммуноферментного анализа типа «сэндвич» согласно протоколам фирмы-производителя (RnDSystems, США). Результаты выражали в пг/мл. В случае получения значений, превышающих диапазон линейности набора, производилось кратное разведение образцов (от 2 до 10 раз) и повторное проведение анализа с умножением результата на фактор разведения.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью стандартного пакета программ Statistica for Windows (Version 10.0) фирмы StatSoft Inc. Оценку нормальности распределения полученных результатов проводили с использованием критерия Шапиро Вилка. Достоверность различий ($p < 0,05$) оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Данные представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q1–Q3).

Результаты исследований

Накопление знаний о практическом применении галектинов для регуляции функциональной активности Т-хелперов на сегодняшний день приобретает практическую значимость, поскольку установление природы факторов, которые осуществляют контроль функционирования Т-клеток, причастных к патогенезу аутоиммунных, аллергических и опухолевых заболеваний, считается современным фармакологическим подходом для терапии иммунонезависимых заболеваний.

Ключевым моментом специализации клеток является смена профиля экспрессируемых генов, на которые оказывают влияние внутриклеточные сигнальные каскады, а конкретно их конечные продукты – транскрипционные факторы. Модель культивирования *in vitro*, выбранная нами, воспроизводит условия дифференцировки CD4⁺-лимфоцитов под влиянием сигналов от микроокружения и дендритных клеток при активации, которые мы имитировали с помощью антител к CD3 и CD28. В процессе активации клеток и воздействия галектина-3 менялся и спектр секретируемых цитокинов.

Так, инкубация мононуклеарных лейкоцитов с галектином-3 сопровождалась значительным повышением образования IFN γ – цитокина, продуцируемого преимущественно Th1-клетками: в 1,5 раза при

действии галектина-3 в дозе 0,5 мкг/мл и в 1,3 раза – при дозе 1 мкг/мл относительно соответствующих значений в контроле (табл. 1). Однонаправленные изменения отмечались и в секреции TNF α мононуклеарными лейкоцитами: добавление галектина-3 в культуральную среду сопровождалось увеличением концентрации данного цитокина в 1,8 раза по сравнению с контролем независимо от дозы галектина-3.

Анализ результатов проведенного исследования позволил установить стимулирующее действие галектина-3 на секрецию IL-13 – Th2-ассоциированного цитокина. Так, при добавлении в культуру мононуклеарных лейкоцитов галектина-3 в дозе 0,5 мкг/мл концентрация IL-13 была в 3,5 раза выше соответствующих значений в контроле. При увеличении дозы до 1 мкг/мл уровень секреции IL-13 снижался в 2,4 раза по сравнению с таковым при действии галектина-3 в дозе 0,5 мкг/мл, но при этом оставался в 1,5 раза выше контрольных значений (табл. 1).

Концентрация IL-17A – основного цитокина, продуцируемого Th17-лимфоцитами, – в контроле на третьи сутки культивирования составила 5492,5 (4647,8–6643,5) пг/мл. При этом действие галектина-3 на секрецию данного цитокина оказалось сильно зависимым от дозы, а именно при действии 0,5 мкг/мл галектина-3 происходило статистически значимое увеличение концентрации IL-17A в супернатантах клеточных культур, тогда как влияние галектина-3 в дозе 1 мкг/мл характеризовалось 3-кратным снижением содержания IL-17A относительно контрольных значений.

Сходные изменения обнаруживались относительно секреции IL-22, который также является профильным цитокином Th17-лимфоцитов. Под влиянием галектина-3 в дозе 0,5 мкг/мл происходило ее увеличение в 2,5 раза по сравнению с контролем. С увеличением дозы галектина-3 до 1 мкг/мл отмечалось достоверное снижение концентрации IL-22 в супернатантах по сравнению с действием галектина-3 в меньшей дозе, однако уровень IL-22 оставался достоверно выше такового в контрольной культуре клеток (табл. 1).

Для установления влияния галектина-3 на функциональную активность Т-регуляторных лимфоцитов мы оценивали концентрацию двух супрессорных цитокинов: IL-10 и TGF β 1. При исследовании влияния галектина-3 на концентрацию IL-10 было выявлено значительное дозозависимое снижение содержания данного цитокина. При добавлении в культуральную среду исследуемого лектина в дозах 0,5 и 1 мкг/мл уровень IL-10 соответственно уменьшался в 4,8 и 10,8 раза относительно контрольных значений показателя (табл. 1).

Содержание трансформирующего ростового фактора $\beta 1$ при действии обеих тестируемых концентраций галектина-3 достоверно снижалось по сравнению с контролем, но различий в зависимости от дозы выявлено не было (табл. 1).

Таким образом, рекомбинантный галектин-3 *in vitro* повышал секрецию лимфоцитами IL-17A, IL-22, действуя в дозе 0,5 мкг/мл; IL-13, TNF α и IFN γ в дозах 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл (более значительно при действии в дозе 0,5 мкг/мл) и угнетал образование IL-17, IL-22 в дозе 1 мкг/мл и IL-10, TGF $\beta 1$ при тестировании обеих концентраций.

В целом влияние рекомбинантного галектина-3 является дозозависимым, и с увеличением его концентрации до 1 мкг/мл степень стимулирующего влияния на Th-лимфоциты становится менее выраженной, и преобладает ингибирующее действие на лимфоциты, что может быть обусловлено активацией апоптотической гибели клеток.

Результаты и обсуждение

Анализируя полученные результаты, следует отметить, что под влиянием галектина-3 отмечалась стимуляция секреции провоспалительных цитокинов (IFN- γ , TNF α , IL-17, IL-22) и закономерное угнетение образования супрессорных цитокинов (IL-10, TGF $\beta 1$). При этом известно, что продукция цитокинов напрямую зависит от экспрессии транскрипционных факторов, определяющих дифференцировку лимфоцитов. Так, ранее было показано, что под действием рекомбинантного галектина-3 происходит активация экспрессии мРНК транскрипционных факторов Gata-3 (Th2) и Rorc (Th17) и угнетение реципрокных факторов транскрипции Tbet (Th1) и FoxP3 (Treg) соответственно [14].

IFN γ является сильнейшим индуктором макрофагов, в результате чего возрастает их фагоцитарная и микробицидная активность, проявляется

Таблица 1

Концентрация цитокинов в супернатантах суспензионной культуры лимфоцитов здоровых доноров при действии рекомбинантного галектина-3, Me (Q1-Q3)

Концентрация цитокинов, пг/мл	Условия культивирования клеток <i>in vitro</i>		
	Контроль (интактная культура)	При добавлении галектина-3 в дозе 0,5 мкг/мл	При добавлении галектина-3 в дозе 1,0 мкг/мл
IFN γ	6097,1 (3920,4-7216,6)	9116,2 (8218,2-9724,7) P=0,005	7930,6 (7532,8-10395) P=0,005
TNF α	11321,8 (9326,3- 13253,6)	20280,9 (18453,6- 21035,4) P=0,017	20271,82 (16490,0- 21599,1) P=0,017
IL-13	246,9 (130,8-323,6)	919,5 (564,9-1200,5) P=0,005	374,2 (230,1-460,3) P=0,005 P ₁ =0,009
IL-17A	5492,5 (4647,8-6643,5)	6568,5 (5314,4-8020,6) P=0,011	1802,5 (832,2-3046,7) P=0,011 P ₁ =0,007
IL-22	1061,3 (234,0- 1150,4)	2714,0 (603,1- 3383,1) P=0,017	1201,3 (501,3- 1417,6) P=0,017 P ₁ =0,017
IL-10	2204,8 (1574,5-2391,9)	453,4 (137,3-823,4) P=0,005	203,4 (76,5-466,7) P=0,005 P ₁ =0,011
TGF β_1	17444,3 (15596,0-23109,3)	13789,3 (11314,3-17941,0) P=0,017	15716,0 (13251,0-17439,3) P=0,027

Примечание: P – уровень значимости различий по сравнению с аналогичным показателем в контроле; P1 – при добавлении галектина-3 в дозе 0,5 мкг/мл.

антигенпрезентирующая функция, а также способность секретировать белки системы комплемента и цитокины. Кроме этого, IFN γ активирует NK-клетки, в результате чего усиливается цитоллиз клеток-мишеней. IFN γ повышает также экспрессию молекул HLA-I и HLA-II на различных клетках, способствуя представлению антигена Т-лимфоцитам. Еще одним важным провоспалительным цитокином является TNF α . Локальное высвобождение TNF приводит к повышению миграции клеток, активации фагоцитоза, повышенной продукции других провоспалительных цитокинов, реэкспрессии HLA I/II, сдвигу иммунного ответа в направлении Th1-реакций [2].

Таким образом, индукция продукции иммунорегуляторных цитокинов IFN γ и TNF α под влиянием галектина-3 является весьма полезным эффектом для обеспечения адекватной защиты организма от внутриклеточных патогенов.

Под действием галектина-3 в дозе 0,5 мкг/мл также наблюдалась стимуляция секреции IL-17A и IL-22 – маркерных провоспалительных цитокинов Th17-лимфоцитов. IL-17A опосредует свои эффекты через рецептор IL-17R, который экспрессируется многими клетками – лимфоцитами, фибробластами, моноцитами, эндотелиальными клетками сосудов. IL-17A участвует в реализации воспаления синергично с TNF α и играет важную патогенетическую роль в развитии аутоиммунной патологии, прежде всего, аутоиммунного колита, болезни Крона, рассеянного склероза (модель на мышах – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит), ревматоидного артрита и псориаза [4]. Интерлейкин-22 по своей биологической активности отдаленно напоминает IL-10, но в отличие от него не подавляет секрецию провоспалительных цитокинов моноцитами в ответ на внедрение антигена. Секреция IL-22 находится под контролем TGF β . Данный цитокин играет важную роль в координации как врожденного, так и приобретенного иммунного ответа. Отмечено, что при некоторых состояниях провоспалительная активность IL-22 сочетается с коэкспрессией IL-17 [15].

К биологическим эффектам IL-17 относятся: индукция выделения провоспалительных цитокинов, в частности IL-2, повышение экспрессии IL-6 и CXCL-1 в фибробластах эпителия дыхательных путей. Роль IL-17 и Th17 чрезвычайно важна для состояния поверхности слизистых оболочек различной локализации, так как IL-17 индуцирует сигналы, опосредующие провоспалительную реакцию, привлечение нейтрофилов и мобилизацию различных антимикробных факторов [4]. Исследователями на модельных мышах с аутоиммунным гепатитом показано, что галектин-3 усиливает продукцию IL-17A и

снижает концентрацию IL-10, а также способствует активации Т-лимфоцитов, NK и дендритных клеток и индуцирует апоптоз мононуклеарных лейкоцитов, что сопровождается более тяжелым течением заболевания [9].

Таким образом, действие галектина-3 распространяется на группу взаимосвязанных цитокинов, вызывая однонаправленные изменения секреции синергичных цитокинов, например, IL-17 и TNF α , IL-17 и IL-22.

Повышение концентрации IL-13 под действием галектина-3 свидетельствует об активации Th2-лимфоцитов, что согласуется с данными литературы. Участие галектина-3 в Th2-поляризации иммунного ответа было продемонстрировано в опытах на мышах с атопическим дерматитом с нокаутом гена галектина-3 (gal3 $^{-/-}$). Исследователями у нокаутированных животных регистрировался более низкий уровень IgE, чем у особей дикого типа (gal3 $^{+/+}$), а иммунный ответ развивался по пути Th1 [10]. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что галектин-3, индуцируя продукцию IL-13, может способствовать развитию аллергических заболеваний.

Негативный контроль провоспалительной активности адаптивных и врожденных иммунных клеток осуществляют регуляторные Т-лимфоциты, в том числе Treg-клетки. Treg, обладая иммуносупрессорной активностью, играют важную роль в патогенезе рецидивирующих и персистирующих инфекций, аллергических болезней, а также злокачественных новообразований, реакциях «трансплантат против хозяина» [7]. Однако полученные нами данные свидетельствуют о супрессорном действии галектина-3 на популяцию Treg, характеризующемся снижением секреции основных ингибиторных цитокинов – IL-10 и TGF β 1.

Согласно мнению ряда авторов, IL-10, ключевой цитокин, экспрессируемый также Tr1-подгруппой регуляторных Т-лимфоцитов, является иммуносупрессорным цитокином, подавляющим как Th1, так и Th2-зависимый иммунный ответ [13]. Были проведены исследования по влиянию галектина-3 на функциональную активность различных субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов при инфицировании мышей возбудителем лейшманиоза. Так, у мышей с нокаутом гена галектина-3 концентрация IL-10 и количество Treg в лимфатических узлах и очагах инфекции было выше, чем у мышей дикого типа, что сопровождалось более тяжелым течением заболевания [8]. Эти данные согласуются с полученными нами результатами действия рекомбинантного галектина-3 на Treg *in vitro*.

IL-10, кроме ингибирования дифференцировки Th1, также подавляет образование Th17 и экспрессию ROR γ t и IL-17 [5]. По нашим данным, галектин-3

уменьшал секрецию IL-10 и не оказывал супрессорного влияния на Th17-лимфоциты, а напротив, приводил к усилению продукции интерлейкина-17 лимфоцитами. Сходные результаты описаны в литературе: так, например, в эксперименте F. L. Tana et al. (2021) с мышами, инфицированными *Brucella abortus*, была показана повышенная экспрессия галектина-3, который модулировал уровень провоспалительных цитокинов [12].

Активация Th17-лимфоцитов и подавление Т-регуляторных клеток под влиянием галектина-3 может способствовать развитию аутоиммунных заболеваний и прогрессии опухолевого роста. В настоящее время галектин-3 рассматривается как маркер опухолевой трансформации клеток. Исследования рака щитовидной железы, толстой кишки и желудка показали, что экспрессия галектина-3 возрастает пропорционально прогрессированию роста клеток опухолей [1]. Галектин-3 играет роль проопухолевого фактора, помогая ускользать от иммунного надзора, в том числе посредством его влияния на цитокиноопосредованную кооперацию лимфоцитов [11].

Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что галектин-3 оказывает дозозависимое модулирующее влияние на цитокинсекреторную функцию лимфоцитов здоровых доноров *in vitro*. Функциональный дисбаланс в лимфоцитах крови при действии рекомбинантного галектина-3 проявляется индукцией образования провоспалительных цитокинов (IFN γ , IL-17, IL-22, TNF α) и противовоспалительного интерлейкина-13 на фоне подавления продукции супрессорных цитокинов IL-10 и TGF β 1.

Детальное изучение иммуотропных эффектов галектина-3, реализуемых в отношении отдельных (в том числе минорных) субпопуляций лимфоцитов актуально с точки зрения разработки новых подходов терапии опухолевых и аутоиммунных заболеваний, связанных с дисрегуляцией основных функций иммунной системы (защитной, акцептивной, регуляторной) и сопровождающихся избыточной продукцией данного лектина.

Список литературы / References

1. Полетика В.С., Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Васильева О.А., Дмитриева А.И., Янкович К.И., Новицкий В.В., Рябова Л.М., Грищенко М.Ю. Роль галектина-1, -3 в механизмах дисрегуляции Т-клеточного звена иммунного ответа при раке толстого кишечника // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т.19, № 3. – С. 76–82.
2. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. – 2004. – № 2. – С. 16-21.

3. Ярилин А.А. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов // Иммунология. – 2010. – № 3. – С. 153-168.
4. Chen K. Kolls J.K. Interleukin-17A (IL17A). *Gene*, 2017, Vol. 30, pp. 8-14.
5. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., Kuchroo V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006, Vol. 441, pp. 235–238.
6. Compagno D., Tiraboschi C., Garcia J.D., Rondón Y., Corapi E., Velazquez C. Laderach D.J. Galectins as Checkpoints of the Immune System in Cancers, Their Clinical Relevance, and Implication in Clinical Trials. *Biomolecules*, 2020, Vol. 10, no 5, pp. 750-774.
7. Di Giovangiulio M., Rizzo A., Franzè E., Caprioli F., Facciotti F., Onali S., Favale A., Stolfi C., Fehling H. J., Monteleone G., Fantini M. C. Tbet Expression in Regulatory T Cells Is Required to Initiate Th1-Mediated Colitis. *Frontiers in immunology*, 2019, Vol.10, pp. 2158-2173.
8. Fermino M.L., Dias F.C., Lopes C.D., Souza M.A., Cruz Â.K., Liu Fu-T., Chammas R., Roque-Barreira M.C., Rabinovich G. A., Bernardes E.S. Galectin-3 negatively regulates the frequency and function of CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells and influences the course of *Leishmania* major infection. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, pp. 1806–1817.
9. Radosavljevic G., Volarevic V., Jovanovic I., Milovanovic M., Pejnovic N., Arsenijevic N., Hsu D.K., Lukic M.L. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol Res.*, 2012, Vol. 52, no 1-2, pp. 100-110.
10. Saegusa J., Daniel K., Chen H. Y., Yu Lan, Fermin Agnes, Fung Maxwell A, Liu Fu-Tong. Galectin-3 Is Critical for the Development of the Allergic Inflammatory Response in a Mouse Model of Atopic Dermatitis. *The American Journal of Pathology*, 2009, Vol. 174, no 3, pp. 922–931.
11. Sciacchitano S., Lavra L., Morgante A. Ulivieri A., Magi F., Francesco G.P., Bellotti C., Salehi L.B., Ricci A. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no 2, pp. 379-438.
12. Tana F.L., Guimarães E.S., Cerqueira D.M., Campos P.C., Gomes M.T.R., Marinho F.V., Oliveira S.C. Galectin-3 regulates proinflammatory cytokine function and favours *Brucella abortus* chronic replication in macrophages and mice. *Cell Microbiol.*, 2021, Vol.23, no.10, pp.1-24.
13. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self-control. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 2, pp. 239–243.
14. Vasil'eva O.A., Yakushina V.D., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Tashireva L.A., Starikova E.G., Zima A.P., Prokhorenko T.S., Krasnova T.U., Nebesnaya I.S. Regulation of Gene Expression of CD4+ T Lymphocyte Differentiation Transcription Factors by Galectin-3 *in vitro*. *Molecular Biology*, 2013, Vol. 47, no 6, pp. 879–884.
15. Zenewicz, L.A., Flavell, R.A. Recent advances in IL-22 biology. *International Immunology*, 2011, Vol. 23, no. 3, pp. 159–163.

Сведения об авторах:

Васильева О. А., канд. мед. наук, доцент кафедры патофизиологии, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики.

Прохоренко Т. С., канд. мед. наук, врач клинической лабораторной диагностики

Колобовникова Ю. В., д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры патофизиологии, и.о. зав. кафедрой нормальной физиологии.

Полетика В. С., канд. мед. наук, доцент кафедры патофизиологии.

Уразова О. И., д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой патофизиологии.

Кононова Т. Е., канд. мед. наук, доцент кафедры патофизиологии.

Чурина Е. Г., д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии.

Рейнгарт Г. В., аспирант кафедры патофизиологии.

Курносенко А. В., аспирант кафедры патофизиологии.

Автор для переписки

Васильева Ольга Александровна, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2, тел. 8-906-947-35-73; e-mail: vasiljeva-24@yandex.ru.

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО АЦИДОЗА НА АДРЕНОРЕАКТИВНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ

БФУ им. И. Канта, г. Калининград

Резюме. Целью настоящей работы было изучение показателей адренореактивности в остаточной пуповинной крови доношенных новорожденных, в зависимости от степени ацидоза. Исследование кислотно-основного состояния и газов остаточной пуповинной крови новорожденных позволило оценить показатели диагностических критериев ацидоза и выделить степени его выраженности у детей при рождении. Методом количественной оценки степени ингибирования гипоосмотического гемолиза эритроцитов в присутствии бета-адреноблокаторов оценены адренореактивные свойства эритроцитов, и определена адренореактивность организма у 58 новорожденных. Установлено, что нарушение метаболических процессов в организме новорожденных сопровождалось активацией симпатoadrenalной системы разной степени выраженности. Нарастание метаболического ацидоза у детей ассоциировано со снижением адренореактивности организма. Уровень показателей β -АРМ эритроцитов зависит от тяжести и длительности гипоксии.

Ключевые слова: новорожденные, кровь, кислотно-основное состояние, адренореактивность.

Образец цитирования: Денисенко О.Д., Перепелица С.А., Литвинова Л.С. Влияние метаболического ацидоза на адренореактивность эритроцитов у новорожденных // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 28-33.

O.D. Denisenko^{1*}, S.A. Perepelitsa², L.S. Litvinova³

INFLUENCE OF METABOLIC ACIDOSIS ON ERYTHROCYTE ADRENOREACTIVITY IN NEWBORN

IKBFU I. Kant, Kaliningrad

Summary. The aim of this work was to study the indicators of adrenoreactivity in the residual cord blood of full-term newborns, depending on the degree of acidosis. The study of the acid-base state and gases of the residual umbilical cord blood of newborns made it possible to evaluate the indicators of the diagnostic criteria for acidosis and highlight the degree of its severity in children at birth. Adrenoreactive properties of erythrocytes were assessed by the method of quantitative assessment of the degree of inhibition of hypoosmotic hemolysis of erythrocytes in the presence of beta-blockers and adrenoreactivity of the body was determined in 58 newborns. It was established that the violation of metabolic processes in the body of newborns was accompanied by activation of the sympathoadrenal system to varying degrees. The increase in metabolic acidosis in children is associated with a decrease in the body's adrenoreactivity. The level of indicators of β -ARM of erythrocytes depends on the severity and duration of hypoxia.

Key words: newborns, blood, acid-base state, adrenoreactivity.

Введение

Исследование различных показателей гомеостаза у новорожденных детей является важным направлением в перинатологии [4]. Перинатальная гипоксия в зависимости от степени тяжести вызывает различные изменения гомеостаза, способствующие нарушениям центральной гемодинамики и церебрального кровотока, развитию шока, дыхательной недостаточности в неонатальном периоде [14]. Частота встречаемости асфиксии тяжелой степени находится в диапазоне от 0,5 до 6‰ живорожденных [13].

Важнейшим компонентом нейрогуморальной регуляции функций организма как в норме, так и при развитии гипоксии, нарушениях гомеостаза является симпатoadrenalная система (САС). Адренореактив-

ность (АРМ) отражает реакции организма в ответ на изменение САС и является системным показателем адренореактивности организма. Связывание адренорецепторов с адренергическими веществами вызывает функциональные изменения в клетках [6]. Эритроидные ядросодержащие клетки – это самая значительная клеточная популяция, составляет 84 % от общего клеточного состава. Эритроциты являются перспективным объектом научных исследований об адренорецепторах организма. Их функции многочисленны и важны в инфекционной и неинфекционной патологии [10]. Цитозольный протеом эритроцитов на 90 % состоит из гемоглобина [9], благодаря которому они выполняют буферную функцию, активно участвуют в метаболизме катехоламинов, ацетил-

холина, иммунных комплексов и ряда лекарственных веществ. Результаты исследований, полученные при разных методах определения функционального состояния адренорецепторов мембраны эритроцитов, вносят новые представления о физиологии эритроцитов, об особенностях адренореактивности организма, функциональных свойств в норме и при различной патологии, что может помочь врачу сделать правильный выбор патогенетического лечения и контролировать эффективность назначенной терапии [3]. По уровню адренореактивности клеток можно судить о развитии стрессовой ситуации в организме, которая возникает в процессе его адаптации к новым экстремальным условиям среды, в том числе при рождении.

Под влиянием длительной или сильной стимуляции катехоламинами, например, при гипоксии, адренорецепторы могут изменяться количественно и функционально, способствуя десенситизации мембран к стрессорным медиаторам и гормонам. Адренорецепторы представляют собой специфический, но не стабильный компонент клеточной мембраны. Это позволяет считать β -АРМ системным показателем адренореактивности организма. Функциональное состояние детекторного звена САС находится под контролем обратной связи с количеством адреноактивных веществ, которые действуют на клетку [8, 11]. В настоящее время не существует универсальных тестов, позволяющих дать исчерпывающий ответ на все вопросы относительно оценки здоровья и функционального состояния организма [7].

Важную роль в оценке новорожденного играют газовый состав и кислотно-основное состояние (КОС) крови. Данные исследований позволяют оценить степень тяжести и длительность гипоксии, при которой изменяется системное и региональное кровообращение, приводящее к нарушениям в кислотно-основном состоянии крови: респираторному или метаболическому ацидозу. Ацидоз, определяемый при рождении, используется в качестве критерия степени тяжести асфиксии. Декомпенсированный метаболический ацидоз ассоциирован с высокой смертностью и, в случае выживаемости детей, неврологическими расстройствами, проявляющимися в различные периоды жизни [1, 12]. рН крови – это важная характеристика кислотно-основного гомеостаза. Только узкий диапазон нормальных значений рН обеспечивает физиологические метаболические процессы. Изменение рН за пределы нормальных величин приводит к появлению патологических изменений, влияющих на функцию клетки, в том числе эритроциты. Чем сильнее выражены эти изменения, тем больше меняется гомеостаз организма. Определение рН в остаточной пуповинной крови (ОПК) представляет научно-практическую ценность в выявлении степени тяжести перина-

тальной гипоксии и степени ацидоза плода и новорожденного, а также позволяет разрабатывать стратегию лечения и коррекцию выявленных нарушений. Изучение адренореактивности организма и возможности использования величин этих показателей может стать еще одним критерием степени тяжести перинатальной гипоксии у новорожденных.

Целью работы является изучение показателей адренореактивности в остаточной пуповинной крови доношенных новорожденных, в зависимости от степени ацидоза.

Материалы и методы

Материалом исследования служила остаточная пуповинная кровь, полученная сразу после пересечения пуповины 58 доношенных новорожденных, родившихся через естественные родовые пути со сроком гестации 38–41 неделя. В зависимости от величины адренореактивности эритроцитов, определенной в ОПК, выделены три группы исследования:

- группа А – 9 новорожденных, у которых показатели адренореактивности эритроцитов находились в диапазоне от 4 до 25 усл. ед., средняя масса тела составляла $3316 \pm 78,7$ г;
- группа В – 23 новорожденных, у которых показатели адренореактивности эритроцитов находились в диапазоне от 25 до 51 усл. ед., средняя масса тела составляла $3317 \pm 83,6$ г;
- группа С – 26 детей, у которых показатели адренореактивности эритроцитов были выше 51 усл. ед., средняя масса тела $3428 \pm 61,4$ г.

По массе тела при рождении достоверных отличий между группами не выявили ($p > 0,05$).

Кислотно-основное состояние крови оценивали на биохимическом анализаторе ABL серии 700, фирма RADIOMETER, США, 2000 г. С применением гепаринизированных шприцев, рекомендованных фирмой-производителем аппаратов, на которых проводилось дальнейшее исследование материала. Определяли рН, напряжение углекислого газа pCO_2 и дефицит буферных оснований BE. Измеряли с помощью ионоселективных электродов, калибровали их по растворам с известным содержанием электролитов и растворенных газов. Во время анализа образцы крови находились внутри электродов при температуре $37^\circ C$ и были защищены от окружающего воздуха. На протяжении всего периода исследований ежедневно проводили контроль качества с применением контрольных образцов, содержащих параметры на низком, среднем и высоком уровнях. Исключали наличие пузырьков воздуха, перемешивая пробы с помощью магнита в капиллярах, избегая его встряхивания. Исследование проводили в первые 10 мин. после взятия пробы. Во избежание ошибок вели контроль тем-

пературы в помещении 24-26 °С, относительной влажности до 85 %.

Исследование адренореактивных свойств эритроцитов определяли по методу Р.И. Стрюк и И.Г. Длусской [6] с использованием наборов «Бета-АРМ-Агат». Реакцию эритроцитов на адреноблокатор определяли дважды во всех пробах. Определяли распад эритроцитов в забуференном рабочем растворе. Цельную кровь с антикоагулянтом разводили физиологическим раствором 1:1 и вносили 0,05 мл приготовленного биологического материала в 2,5 мл буферного раствора (разведение цельной крови составляло 1:51). Перемешивали трехкратно, избегая пенообразования. Инкубацию проводили в течение 15 мин. при комнатной температуре 20-23 °С. Надосадочную жидкость получали после центрифугирования проб в течение 10 мин. при 1500 об./мин. Величину оптической плотности надосадочной жидкости опытной пробы выражали в процентах от величины оптической плотности контрольной пробы. Единицы процентов принимали за условные единицы β -АРМ.

Полученные результаты были обработаны методами дескриптивной и непараметрической статистики с использованием пакета программ Statistica 6.0. Отличия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

Степень выраженности ацидоза при рождении является маркером тяжести перинатальной гипоксии. Для этого используются следующие диагностические критерии ацидоза, определяемые в ОПК: рН, ВЕ и pCO_2 .

В исследовании установлено, что в группах А и В величина рН соответствовала ацидозу легкой степени, достоверно не отличалась между этими группами ($p > 0,05$). Для новорожденных группы С характерен ацидоз тяжелой степени, величина рН была статистически значимо ниже по сравнению с группами А и С ($p = 0,009$), В и С ($p = 0,0001$) (рис. 1).

Другим важным показателем, определяющим характер ацидоза (дыхательный или метаболический), является избыток или недостаток буферных оснований (base excess, ВЕ). Для всех детей, включенных в исследование, характерен дефицит оснований, который определяет степень выраженности метаболического ацидоза. Если у детей группы А определялся субкомпенсированный ацидоз, то в группах В и С метаболические нарушения были наиболее выражены, для них характерен декомпенсированный ацидоз (рис. 2). Несмотря на различие в степени тяжести нарушений, статистически значимых отличий между группами не установлено ($p > 0,05$).

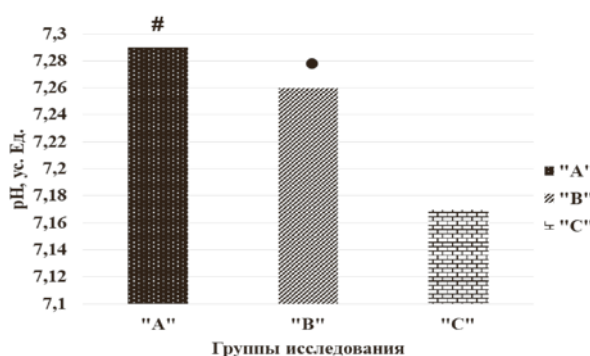


Рис. 1. Уровень рН в остаточной пуповинной крови новорожденных

$p < 0,05$ – статистически значимые отличия между группами А и С

• $p < 0,05$ – статистически значимые отличия между группами В и С

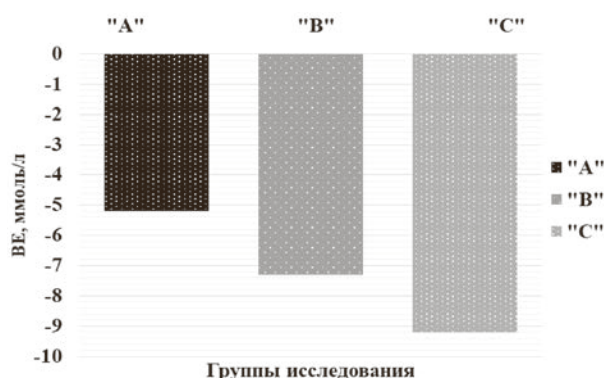


Рис. 2. Уровень ВЕ в остаточной пуповинной крови новорожденных

В ОПК новорожденных групп А и В содержание pCO_2 находилось в пределах нормальных величин (рис. 3). В группе С уровень исследуемого показателя был повышен и статистически значимо отличался от групп А и В (соответственно $p = 0,05$; $p = 0,04$).

Таким образом, в группах регистрировался метаболический ацидоз различной степени. Наиболее глубокие нарушения характерны для новорожденных группы С.

В результате исследования выявлена высокая вариабельность показателя адренореактивности у новорожденных с различной степенью ацидоза (рис. 4). Самые низкие показатели адренореактивности эритроцитов определялись в группе А, в которой установлен метаболический ацидоз легкой степени. При нарастании ацидоза происходил рост β -АРМ, и максимальные изменения выявлены в группе С, в которой зарегистрирован декомпенсированный смешанный ацидоз тяжелой степени. Установлены статистически значимые различия между группами А и В ($p < 0,001$), А и С ($p < 0,001$), В и С ($p < 0,001$).

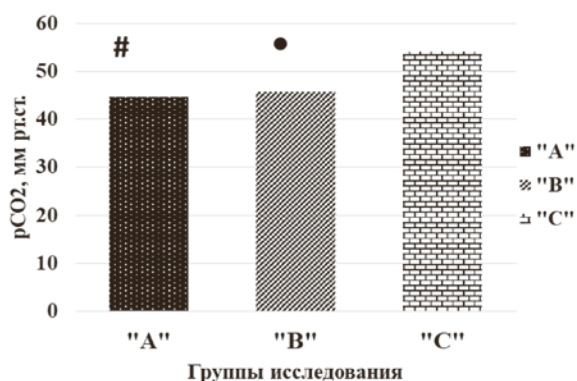


Рис. 3. Уровень pCO_2 в остаточной пуповинной крови новорожденных

$p < 0,05$ – статистически значимые отличия между группами А и С

• $p < 0,05$ – статистически значимые отличия между группами В и С

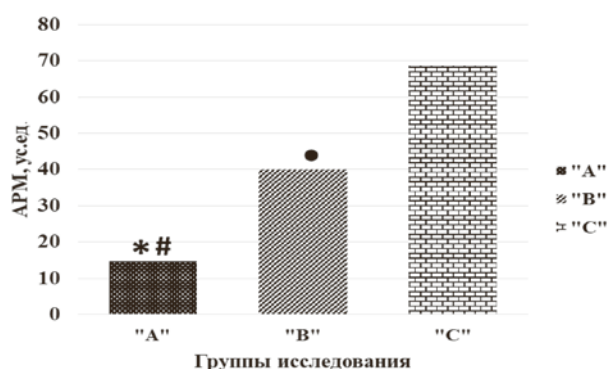


Рис. 4. Адренореактивность эритроцитов новорожденных при рождении

* $p < 0,05$ – статистически значимые отличия между группами А и В

$p < 0,05$ – статистически значимые отличия между группами А и С

• $p < 0,05$ – статистически значимые отличия между группами В и С

Проведенное исследование показало, что нарушение метаболических процессов в организме новорожденных сопровождалось активацией симпатoadреналовой системы в разной степени. При проведении корреляционного анализа выявлена обратная слабая связь между β -АРМ и pH ($r = -0,232$; $p = 0,001$) в группе В, в группе С между этими показателями отмечена обратная умеренная связь ($r = -0,39$; $p = 0,001$). Обратная умеренная корреляционная связь проявилась между β -АРМ и pCO_2 в группе В ($r = -0,403$; $p = 0,001$) и слабая в группе С ($r = -0,278$; $p = 0,001$), что свидетельствует о взаимосвязи этих показателей и влиянии друг на друга, чем меньше показатели pH, тем выше β -АРМ эритроцитов.

Повышенная устойчивость эритроцитов и функциональная активность мембраны наблюда-

лась у детей группы А. Высокая адренореактивность организма у новорожденных характеризовалась повышенной чувствительностью адренорецепторов клеточных мембран к увеличению уровня катехоламинов, целостность клеточных мембран эритроцитов при этом сохранялась. Субкомпенсированный ацидоз оказывал умеренное влияние на активность САС. Вариабельность показателя β -АРМ у детей группы А была в пределах 5–24 усл.ед., у 22 % детей резистентность эритроцитов под влиянием катехоламинов несколько снижалась, но сохранялась в пределах физиологической нормы [6].

В группе В отмечалось увеличение показателя адренореактивности, который по принципу биологической обратной связи характеризовал снижение системного показателя адренореактивности организма при умеренном увеличении содержания катехоламинов. Систематический выброс в кровь физиологически допустимых доз адреналина приводит к частичному снижению чувствительности адренорецепторов мембран эритроцитов к воздействию данного гормона. Это в свою очередь отражается на функциональных возможностях клеток, основной функцией которых является снабжение тканей кислородом.

В группе С у детей с глубокими нарушениями кислотно-основного состояния, обусловленными более выраженным дефицитом буферных оснований, повышением парциального давления углекислого газа, его накоплением и низкими показателями pH [2, 5], отмечались высокие цифры β -АРМ эритроцитов, что характеризует низкую адренореактивность организма.

Катехоламины являются гликопротеидами мембран эффекторных клеток, при взаимодействии с которыми они изменяют биохимические процессы в ней. Присутствующие на мембранах клеток крови α_2 - и β_2 -адренорецепторы быстро реагируют на изменение содержания катехоламинов. Целостность клеточной мембраны в местах контакта с β_2 -адренорецепторами при действии агониста нарушается. Известно, что в мембранах эритроцитов человека функционируют β -адренергические рецепторы, активирующие систему G-белка-аденилатциклазы и влияющие на гуанозинтрифосфат и на функциональное состояние мембран эритроцитов, синтез белков и гемоглобина. Изменение поверхности мембраны сопровождается интернализацией адренорецепторов с ее поверхности. В этих условиях, несмотря на уменьшение количества адренорецепторов при десенситизации, остающиеся адренорецепторы могут передавать сигнал агонистов на аденилатциклазу при условии защиты G-белка, которая может обеспечиваться, в частности, увеличением внутриклеточного Ca^{2+} или под действием ацетилхолина. Основное действие ка-

техоламинов, опосредуемое β -адренорецепторами, направлено на стимуляцию энергетической системы клеток в соответствии с их органной специфичностью и обусловлено регуляцией ионного обмена в клетке. При активации или блокаде β_2 -адренорецепторов такая связь может обеспечить мгновенную перестройку ионообменных механизмов. Увеличение активности САС, характерное для детей группы С, может сопровождаться увеличением концентрации катехоламинов, изменяя количество и функциональное состояние адренорецепторов. Ингибирование осмоллиза эритроцитов зависело от количества функционально активных β -адренорецепторов на поверхности клеток и указывало на их адренореактивность. Показатели β -АРМ Эр ОПК новорожденных группы С в 5 раз превышали показатели β -АРМ детей группы А. Высокая активность САС оказывала дестабилизирующее влияние на системный и клеточный уровни.

Выраженность физиологического эффекта катехоламинов определяется рядом факторов: освобождением их из синаптических нервных окончаний и мозгового вещества надпочечников, нейрональным и экстранейромальным обратным захватом катехоламинов, экстракцией, связыванием с тканевыми адренорецепторами, что в свою очередь зависит от плотности последних и степени их родства с катехоламинами плазмы. Функционирование САС зависит от внешних стрессорных воздействий и нарушения гомеостаза вследствие сочетания различных концентраций вырабатываемых катехоламинов, плотности и функциональной активности адренорецепторов.

Под влиянием сильной и длительной стимуляции катехоламинами меняется количество и функциональное состояние адренорецепторов. В нашем исследовании процесс десенситизации имел несколько стадий. Начальная стадия процесса с разобщением рецепторов с комплексами G-белок-аденилатциклаза без уменьшения количества адренорецепторов на поверхности мембраны отмечена у детей группы А с умеренной степенью выраженности ацидоза, что подтверждают низкие показатели адренореактивности эритроцитов. В условиях стресса у детей группы В и С начинали проявляться отрицательные последствия действия катехоламинов на системном и клеточном уровнях: защитная десенситизация адренорецепторов и ответный дополнительный выброс катехоламинов. Формирование такого порочного круга приводит к систематическому повышению активности САС, обратимому на первых этапах и устойчивому под действием этиопатогенетических факторов.

Нарастание метаболического ацидоза у детей группы В и С, ассоциировано со снижением адренореактивности, т. к. гипоксия клеток приводит к появлению ацидоза различной степени, нарушению гомеостаза, появлению трансформации поверхно-

сти мембран эритроцитов и изменению морфологических форм. Ряд исследований подтверждают наличие таких изменений у новорожденных, перенесших гипоксию [12].

В результате исследования нами выявлена слабая отрицательная связь между индивидуальными величинами β -АРМ и показателем pH. При этом в пределах более высоких показателей адренореактивности связь между уровнем β -АРМ и уровнем pH проявлялась слабо, усиливаясь по мере возрастания величин β -АРМ.

Новорожденные очень чувствительны к гипоксии и оксидативному стрессу, которые оказывают негативное влияние на организм в критическом состоянии, вызывая повреждение органов и систем. Симптоадреналовая система обеспечивает в организме важные метаболические и физиологические процессы, из которых наиболее значимы углеводный обмен, катаболизм белков, окислительные процессы, гормональная активность и многие другие.

В нашем исследовании метод оценки адренореактивности эритроцитов по величине β -адренорецепции мембран эритроцитов выявил изменения функционального состояния эритроцитов в ответ на воздействие адренореактивного вещества и в зависимости от выраженности ацидоза проявлял эффект снижения или увеличения чувствительности эритроцитов. Десенситизация мембраны эритроцитов к действию адреналина проявилась адаптивной ответной реакцией организма при гипоксии. САС, осуществляя адаптационно-трофическую функцию, является сложным многоэтапным механизмом, активность которого зависит от биосинтеза катехоламинов, количества, функционального состояния адренорецепторов, от состояния сигналинг-системы.

Заключение

При воздействии внутриутробной перинатальной гипоксии изменение функционального состояния эритроцитов происходит уже внутриутробно. Уровень показателей β -АРМ эритроцитов зависит от тяжести и длительности гипоксии. Выявленные изменения адренореактивности организма свидетельствуют о влиянии степени гипоксии на гомеостаз, концентрацию вырабатываемых катехоламинов, чувствительность эритроцитов и нормальное функциональное состояние адренорецепторов. Интранатальный период характеризуется нестабильностью адренореактивности организма и большой вариабельностью показателей β -АРМ эритроцитов.

Изменение активности САС и деструктурирующее влияние ее на клеточные структуры крови, связанное с гипоксией, являются адаптивной ответной реакцией организма. Метод оценки функционального состояния адренорецепторов является одним

из эффекторных звеньев этой системы и может найти применение не только в научных исследованиях, но и в практической медицине.

Список литературы / References

1. Зарубин А.А., Голуб И.Е., Федорова О.С., Мельников В.А., Богданова А.Д. Системная лечебная гипотермия в терапии тяжелой асфиксии у новорожденных // Анестезиология реаниматология. – 2016. – № 4 (61). – С. 269-272.

Zarubin A.A., Golub I.E., Fedorova O.S., Mel'nikov V.A., Bogdanova A.D. Sistemnaya lechebnaya gipotermiya v terapii tyazhelej asfiksii u novorozhdennyh // Anesteziologiya reanimatologiya. 2016. №4 (61). S. 269-272.

2. Кирьяков К.С., Хатагова Р.Б., Тризна Е.В., Зеленина З.А., Яковлев А.В., Петрова Н.А. Коррекция кислотно-основного состояния при гипоксически-ишемическом поражении головного мозга у новорожденных // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2018. – № 1(63). – С. 40-45.

Kir'yakov K.S., Hataгова R.B., Trizna E.V., Zelenina Z.A., Yakovlev A.V., Petrova N.A. Korrekciya kislotno-osnovnogo sostoyaniya pri gipoksicheski-ishemicheskom porazhenii golovnogo mozga u novorozhdennyh // Rossijskij vestnik perinatologii i pediatrii. 2018. №1(63) S.40-45.

3. Козочкин Д.А., Чибирева О.В., Лапшин М.С., Федоров С.А., Попков П.Н., Комелькова М.В., Цейликман О.Б. Модификация осмотической резистентности эритроцитов под действием глюкокортикоидов // Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. – 2019. – № 4 (1). – С. 24-28.

Kozochkin D.A., Chibireva O.V., Lapshin M.S., Fedorov S.A., Popkov P.N., Komel'kova M.V., Cejlikman O.B. Modifikaciya osmoticheskoy rezistentnosti eritrocitov pod dejstviem glyukortikosteroida // Vestnik soveta molodyh uchenykh i specialistov Chelyabinskoy oblasti. 2019. №4 (1). S.24-28.

4. Перепелица С.А., Сергунова В.А., Алексеева С.В., Гудкова О.Е. Морфология эритроцитов при изоиммунизации новорожденных по резусфактору и авосистеме // Общая реаниматология. – 2015. – № 2 (11). – С. 25-34.

Perepelica S.A., Sergunova V.A., Alekseeva S.V., Gudkova O.E. Morfologiya eritrocitov pri izoimmunizacii novorozhdennyh po rezusfaktoru i avosisteme // Obshchaya reanimatologiya. 2015. №2. (11) S. 25-34.

5. Приходько А.М., Романов А.Ю., Шуклина Д.А., Баев О.Р. Показатели кислотно-основного равновесия и газовый состав артериальной и венозной пуповинной крови в норме и при гипоксии плода // Акушерство и гинекология. – 2019. – № 2. – С. 93-97.

Prihod'ko A.M., Romanov A.YU., Shuklina D.A., Baev O.R. Pokazateli kislotno-osnovnogo ravnovesiya i gazovyy sostav arterial'noj i venoznoj pupovinnoy krovi v norme i pri gipoksii ploda // Akusherstvo i ginekologiya. 2019. №2. S. 93-97.

6. Стрюк Р.И., Длусская И.Г. Адренореактивность и сердечно-сосудистая система. – М., 2003. – 160 с.

Stryuk R.I., Dlusskaya I.G. Adrenoreaktivnost' i serdechno-sosudistaya sistema. M. 2003. 160s.

7. Халимова Ф.Т., Шукуров Ф.А., Арабова З.У. Особенности

адаптации организма пришлого населения агропромышленного региона России (обзор литературы) // Биология и интегративная медицина. – 2022. – № 3 (56). – С. 48-93.

Halimova F.T., SHukurov F.A., Arabova Z.U. Osobennosti adaptacii organizma prishlogo naseleniya agropromyshlennogo regiona Rossii (obzor literatury) // Biologiya i integrativnaya medicina. 2022. № 3 (56). S. 48-93.

8. Шукуров Ф.А., Халимова Ф.Т., Арабова З.У. Показатели гомеостаза при краткосрочной адаптации человека к условиям высокогорья и реадaptации // Биология и интегративная медицина. – 2020. – № 6 (46). – С. 5-22.

SHukurov F.A., Halimova F.T., Arabova Z.U. Pokazateli gomeostaza pri kratkosrochnoj adaptacii cheloveka k usloviyam vysokogor'ya i readaptacii // Biologiya i integrativnaya medicina. 2020. № 6 (46). S. 5-22.

9. Amon S., Meier-Abt F., Gillet L.C., Dimitrieva S. Sensitive quantitative proteomics of human hematopoietic stem and progenitor cells by data-independent acquisition mass spectrometry // Mol. Cell. Proteomics. 2019. T. 18. №7. P.1454-1521.

10. Dunsmore G., Koleva P., Ghobakhloo N., Sutton R., Ambrosio L., Meng X., Hotte N., Nguyen V., Madsen KL., Dieleman LA., Huang V., Elahi S. Lower abundance and impaired function of CD71+ erythroid cells in inflammatory bowel disease patients during pregnancy // J. Crohns Colitis. 2019.V. 13. №2. P. 230-274.

11. Hamilton L.D., Newman M.L., Delville C.L., Delville Y. Physiological stress response of young adults exposed to bullying during adolescence // Physiol. Behav. 2008. V. 95. №5. P. 617-624.

12. Racinet C., Peresse J.F., Richalet G., Corne C., Ouellet P. Neonatal eucapnic pH at birth: application in a cohort of 5392 neonates // Gynecol. Obstet. Fertil. 2016. V. 44. №9. P. 468-474.

13. Shankaran S. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy // Curr. Opin. Pediatr. 2015. V. 27. №2. P. 152-157.

14. Sweetman D., Armstrong K., Murphy JF., Molloy EJ. Cardiac biomarkers in neonatal hypoxic ischaemia // Acta Paediatr. 2012. V. 101. №4. P. 338-343.

Сведения об авторах:

Денисенко О.Д., биолог химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ «Наркологический диспансер Калининградской области».

Перепелица С.А., профессор кафедры хирургических дисциплин Медицинского института ФГАОУ ВО «БФУ им. Иммануила Канта», ведущий научный сотрудник НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР, д.м.н., профессор.

Литвинова Л.С., директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, профессор кафедры фундаментальной медицины Медицинского института ФГАОУ ВО «БФУ им. Иммануила Канта», д.м.н., профессор.

Автор для переписки

Литвинова Лариса Сергеевна, Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, профессор кафедры фундаментальной медицины Медицинского института ФГАОУ ВО «БФУ им. Иммануила Канта», e-mail: larisalitinova@yandex.ru.

СЫВОРОТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЕЙ СЕТЧАТКИ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА II ТИПА

¹ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владивосток

²ООО «Приморский центр микрохирургии глаза», Владивосток

Резюме. Целью настоящего исследования было определить сывороточный уровень IL-1 β , TNF- α IL-17A, INF- γ , IL-10 у пациентов с нейродегенерацией сетчатки на фоне сахарного диабета II типа. В исследование включены 80 пациентов с сахарным диабетом II типа, которые были разделены на 4 группы в зависимости от наличия сосудистых симптомов диабетической ретинопатии и нейродегенерации сетчатки. Уровень цитокинов определяли с помощью твердофазного ИФА. В группах пациентов с нейродегенерацией сетчатки выявлено достоверное ($p < 0,05$) повышение IL-1 β и снижение IL-10. Наличие сосудистых изменений на сетчатке не оказывало влияния на уровень исследуемых цитокинов. Выявленные изменения показывают роль системного дисбаланса между про- и противовоспалительными цитокинами в индукции нейродегенерации сетчатки при диабетической ретинопатии. Требуется дальнейшее исследование данной проблемы с целью поиска возможных иммунных маркеров нейродегенерации сетчатки у больных с сахарным диабетом II типа.

Ключевые слова: цитокины, сахарный диабет II типа, нейродегенерация сетчатки, диабетическая ретинопатия.

Образец цитирования: Маркелова Е.В., Ручкин М.П., Федяшев Г.Ф. Сывороточный уровень цитокинов у пациентов с нейродегенерацией сетчатки при диабетической ретинопатии на фоне сахарного диабета 2 типа // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 34-37.

E.V. Markelova¹, M.P. Ruchkin^{1,2}, G.F. Fedyashev^{1,2}

SERUM LEVELS OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH RETINAL NEURODEGENERATION IN DIAEBTIC RETINOPATHY ON THE BACKGROUND OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS

¹Pacific State Medical University, Vladivostok

²Primorsky Eye Microsurgery Center, Vladivostok

Adstract. The aim of the present study was to determine the serum level of IL-1 β , TNF- α IL-17A, INF- γ , IL-10 in patients with retinal neurodegeneration against the background of type 2 diabetes mellitus. The study included 80 patients with type 2 diabetes mellitus, which were divided into 4 groups depending on the presence of vascular symptoms of diabetic retinopathy and retinal neurodegeneration. The level of cytokines was determined using solid-phase ELISA. In groups of patients with retinal neurodegeneration, a significant ($p < 0.05$) increase in IL-1 β and a decrease in IL-10 were detected. The presence of vascular changes in the retina did not affect the level of cytokines studied. The identified changes show the role of systemic imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the induction of retinal neurodegeneration in diabetic retinopathy. Further study of this problem is required in order to search for possible immune markers of retinal neurodegeneration in patients with type 2 diabetes.

Ключевые слова: cytokines, type 2 diabetes, retinal neurodegeneration, diabetic retinopathy.

Актуальность

Различные исследования показывают важную роль системы цитокинов в развитии многих неинфекционных заболеваний [5, 6]. Функционирование нейронов и глии в нервной ткани зависит в том числе и от баланса между про- и противовоспалительными цитокинами [5]. Нарушение обменных процессов, возникающее при сахарном диабете, может влиять на этот баланс, приводить к дисфункции нервных клеток и запускать процессы нейродегенерации. Поражение сетчатки на фоне сахарного диабета может

привести к тяжелой потере зрения и слепоте. Диабетическая ретинопатия в наши дни рассматривается не только как патологический процесс, поражающий микрососуды сетчатки, но и как нейродегенеративное заболевание [1, 9]. При этом нейрональные и сосудистые изменения на начальном этапе могут протекать независимо друг от друга. Учитывая малую изученность, отсутствие общей концепции патогенеза нейродегенерации сетчатки при диабетической ретинопатии, а также большую роль цитокинов в развитии нейровоспаления и повреждении нейронов,

считаем актуальным изучение системного баланса про- и противовоспалительных цитокинов у пациентов с сахарным диабетом II типа и его влияния на процесс нейродегенерации сетчатки.

Материалы и методы

В исследование включены 80 пациентов с сахарным диабетом II типа в возрасте от 44 до 74 лет. Всем пациентам проведено офтальмологическое обследование согласно общепринятым клиническим рекомендациям по ведению пациентов с сахарным диабетом, а также оптическая когерентная томография (ОКТ) сетчатки при помощи прибора RTvue-100 (Optovue, США) для определения наличия нейродегенерации сетчатки. После обследования все пациенты были разделены на 4 следующие группы: 1 – без сосудистых изменений на глазном дне и без ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки (n=12); 2 – без сосудистых изменений на глазном дне и наличием ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки (n=28); 3 – с наличием признаков непролиферативной диабетической ретинопатии (НПДР) на глазном дне и без ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки (n=10); 4 – с наличием признаков НПДР на глазном дне и наличием ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки (n=30). Контрольную группу составили 30 здоровых добровольцев.

Уровень IL-1 β , TNF- α , IL-17A, INF- γ , IL-10 в сыворотке крови определяли с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа, согласно прилагаемым инструкциям. Учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Количественную оценку измеряемых параметров выражали в пг/мл. Обследование пациентов основных групп проводили при первичном обращении и через 6 месяцев. Лиц контрольной группы обследовали однократно.

После получения результатов обследования все исследуемые параметры были внесены в электронную таблицу, и была сформирована база данных. Статистический анализ проводился при помощи программы SPSS Statistics 23 (IBM, США). Показатели представлены в виде медиан (Me), нижнего и верхнего квартилей (Q25; Q75), так как распределение данных отличалось от нормального. Сравнение количественных величин в несвязанных выборках осуществлялось с использованием U-критерия Манна–Уитни. Корреляционный анализ провели с использованием критерия Спирмена. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Таблица 1

Уровни исследуемых показателей в сыворотке крови у обследуемого контингента

Показатель Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)	Группа 1 (n=12)	Группа 2 (n=28)	Группа 3 (n=10)	Группа 4 (n=30)	Контроль (n=30)
IL-1 β	1,42 (1,23-1,75)	3,46 (2,2-4,89)*#	1,67 (1,39-1,76)	3,12 (1,91-4,88)*#	1,61 (1,37-2,18)
IL-1 α	1,46 (1,21-1,75)	3,35 (2,31-4,83)*#	1,59 (1,33-1,72)	3,29 (1,98-4,81)*#	
TNF- α	3,84 (3,34-4,97)*	3,65 (3,21-5,48)*	3,69 (2,85-5,54)*	3,12 (1,91-4,88)*	2,48 (1,37-3,47)
TNF- γ	4,02 (3,3-5,12)*	3,85 (3,32-5,01)*	3,89 (3,33-5,22)*	3,29 (1,98-4,81)*	
INF- γ	15,03 (10,42-17,25)	13,72 (10,43-20,53)	13,51 (10,16-19,86)	13,45 (10,15-16,29)	14,0 (10,91-15,55)
INF- α	14,86 (10,39-16,54)	14,37 (10,35-15,78)	13,85 (10,24-19,04)	13,88 (10,48-15,92)	
IL- 17A пг/мл первично	5,42 (5,01-6,23)	5,39 (5,18-6,25)	6,01 (5,22-6,21)	5,37 (5,11-5,93)	5,32 (5,05-5,89)
IL-17A пг/мл через 6 месяцев	5,34 (4,97-5,9)	5,36 (5,12-6,01)	5,94 (5,01-6,15)	5,34 (5,11-5,95)	
IL-10 пг/мл первично	15,98 (12,55-19,36)	13,64 (10,34-17,87)*#	16,24 (12,23-20,65)	13,22 (11,09-17,68)*#	17,28 (13,68-22,95)
IL-10 пг/мл через 6 месяцев	15,25 (12,63-20,01)	13,46 (10,31-17,86)*#	15,98 (12,56-20,13)	13,48 (10,78-17,33)*#	

Примечание: *достоверная разница с контрольной группой ($p < 0,05$); # – достоверная разница между группами 1 и 2; 3 и 4 ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждения

Полученные результаты концентрации исследуемых цитокинов в сыворотке крови в обследуемых группах представлены в табл. 1.

Выявлен достоверно высокий уровень IL-1 β в группах пациентов с ОКТ-признаками нейродегенерации сетчатки (группа 2 и 4) в сравнении с контролем и группами без ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки (группа 1 и 3). В группе без сосудистых и нейродегенеративных изменений характерных для ДР (группа 1) и в группе только с сосудистыми признаками НПДР (группа 3) уровень IL-1 β не отличался от референсных величин.

Сывороточная концентрация TNF- α во всех группах была достоверно выше, чем в контроле, межгрупповая разница отсутствовала. Уровни INF- γ и IL-17A во всех группах на протяжении всего исследования не отличались от контроля.

Анализ сывороточного содержания IL-10 показал достоверное его снижение в группах 2 и 4 в сравнении с группами 1, 3 и контролем. У пациентов без ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки не выявлено достоверного изменения данного показателя относительно результатов, полученных в контрольной группе.

Выявленные закономерности в сывороточном содержании исследуемых параметров сохранялись и при повторном обследовании через 6 месяцев.

Обсуждение

Настоящее исследование определило наличие дисбаланса в системе цитокинов у пациентов с нейродегенерацией сетчатки на фоне сахарного диабета II типа. Уровни провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β были повышены, в то время как уровень преимущественно противовоспалительного цитокина IL-10 был понижен. Наличие начальных сосудистых признаков НПДР не оказало значимого влияния на уровни исследуемых параметров, возможно, на появление данных признаков влияют другие показатели, не включенные в исследование. Дисбаланс в системе цитокинов у больных СД 2 типа был выявлен во многих исследованиях, что может свидетельствовать о системной активации вялотекущего воспаления [6]. Гомеостаз сетчатки регулируется резидентными тканевыми макрофагами – микроглией, которая может находиться в виде двух фенотипов и переходить из одного фенотипа в другой в зависимости от поступающих стимулов [3, 4, 10]. Фенотип M2 наиболее распространен в физиологических условиях и отвечает за выработку нейропептидов и факторов роста, стимулирующих выживаемость и функционирование нейронов сетчатки. M1 фенотип является провоспалительным и отвечает за поддержа-

ние хронического нейровоспаления, результатом которого является потенцирование гибели нейронов. Возможно, системный провоспалительный фон у пациентов с сахарным диабетом II типа стимулирует переход микроглии в M1 фенотип и запускает нейровоспаление, однако, нельзя исключать стимуляцию микроглии через рецепторы к конечным продуктам гликозилирования (RAGE), которые в большом количестве образуются при хронической гипергликемии [8,9]. Более выраженный дисбаланс в системе цитокинов у пациентов с нейродегенерацией сетчатки в сравнении с пациентами, у которых она отсутствовала, может подтверждать роль нейровоспаления в развитии нейродегенерации. IL-1 и TNF α приводит к активации покоящейся микроглии [2;7]. В дальнейшем микроглия способствует дополнительному высвобождению IL-1 и TNF α из моноцитов, а также секретирует HMGB1 и хемоаттрактантный белок 1 хемокинов моноцитов, также называемый лигандом 2 мотива CC (MCP-1 / CCL2). MCP-1 / CCL2 связывается с рецептором хемокина типа 2 (CCR2) на клеточной поверхности моноцитов, способствуя миграции их из костного мозга в ЦНС [7]. Они, в свою очередь, продолжают секретировать провоспалительные цитокины за счет индукции транскрипции NF- κ B и активации микроглии в ЦНС, что дополнительно усиливает нейровоспаление [7;8]. Наличие отрицательной корреляции между IL-1 β и IL-10 показывает недостаток компенсаторной противовоспалительной реакции. Существуют исследования, показывающие роль IL-1 β в потенцировании гибели нейронов через эксайтотоксичность, ингибирование данного цитокина в экспериментальных моделях ДР приводило к смягчению цитокин-опосредованных эффектов на нейроны сетчатки [4].

Выводы

Выявленные закономерности изменения уровня исследуемых цитокинов у пациентов с сахарным диабетом 2 типа в зависимости от наличия нейродегенеративных изменений в сетчатке требует дальнейшего изучения. Так как нейродегенерация сетчатки при диабетической ретинопатии в настоящее время не имеет четких рекомендаций по диагностике, поиск диагностических маркеров, в том числе и иммунных, определяет необходимость дальнейшей разработки данной проблемы.

Список литературы / References

1. Ручкин М.П., Кувшинова Е.Р., Федяшев Г.А., Маркелова Е.В. Нейродегенерация сетчатки у пациентов с сахарным диабетом II типа // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2020. – № 3. – С. 62-64. [Ruchkin M.P., Kuvshinova E.R., Fedyashev

G.A., Markelova E.V. Neurodegeneration of retina in patients with type 2 diabetes mellitus. Pacific Medical Journal. 2020; 3: 62-64. In Russ.] doi: 10.34215/1609-1175-2020-3-62-64.

2. Cerebral mast cells participate in postoperative cognitive dysfunction by promoting astrocyte activation / X. Zhang, H. Yao, Q. Qian, N. Li [et al.] // Cellular Physiology and Biochemistry. 2016. No 40. P. 104–116.

3. Li X., Yu Z.W., Li H.Y., Yuan Y., Gao X.Y., Kuang H.Y. Retinal microglia polarization in diabetic retinopathy. Visual Neuroscience. 2021. Vol. 38. E006. URL: <https://www.cambridge.org/core/journals/visual-neuroscience/article/abs/retinal-microglia-polarization-in-diabetic-retinopathy/7ADD02890CEB6B09F3AB01E0397E7E16> (accepted: 08.01.2022) doi: 10.1017/S0952523821000031.

4. Mendiola A., Cardona A. The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases // Journal of neural transmission. 2018. Vol. 125. No. 5. P. 781-795.

5. Nichols M., St-Pierre A., Wendeln A. Inflammatory mechanisms in neurodegeneration // Journal of neurochemistry. 2019. Vol. 149. No. 5. P. 562-581. doi: 10.1111/jnc.14674

6. Pfeiler S., Winkels H., Kelm M. IL-1 family cytokines in cardiovascular disease // Cytokine. 2019. Vol. 122. P.154215. doi:10.1016/j.cyto.2017.11.009

7. Safavynia, S. A. The Role of Neuroinflammation in Postoperative Cognitive Dysfunction: Moving From Hypothesis to Treatment / S. A. Safavynia, P. A. Goldstein // Frontiers in Psychiatry. 2019. Vol.9 (752). – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30705643/> (дата обращения: 24.08.2021).

8. Saxena, S. Impact on the brain of the inflammatory response to surgery / S. Saxena, M. Maze // La Presse Médicale. 2018. No 47. e73–e81.

9. Soni D., Sagar P., Takkar B. Diabetic retinal neurodegeneration as form of diabetic retinopathy // International Ophthalmology. 2021. Vol. 41. No. 9. P. 3223-3248 doi: 10.1007/s10792-021-01864-4.

10. Wang S., Cepko C. Targeting microglia to treat neurodegenerative eye diseases // Frontiers in immunology. 2022. Vol. 13. P.853558.

11. Wu H., Wang M., Li X. The metaflammatory and immunometabolic role of macrophages and microglia in diabetic retinopathy // Human cell. 2021. Vol. 34. No 6. P. 1617-1628.

12. Zong, H., Ward M., Stitt A. AGEs, RAGE and diabetic retinopathy // Current diabetes reports. 2011. Vol. 11. No 4. P. 244-252.

Сведения об авторах:

Маркелова Елена Владимировна, д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии Тихоокеанского государственного медицинского университета (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2). ORCID:0000-0001-6632-9800; тел. +7 (423) 245-07-00; e-mail: markev2010@mail.ru.

Elena V. Markelova, MD, PhD, head of Department of normal and pathological physiology of Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002, Russia). ORCID: 0000-0001-6632-9800; p.:+7 (423) 245-07-00; e-mail: markev2010@mail.ru.

Ручкин Михаил Петрович, заочный аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии Тихоокеанского государственного медицинского университета (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), врач-офтальмолог ООО «Приморский центр микрохирургии глаза (690088, г. Владивосток, ул. Борисенко 100Е). ORCID: 0000-0002-8966-3120; тел.: +7 (423) 203-03-03; e-mail: michaelr-n@mail.ru.

Mikhail P. Ruchkin, MD, PhD-student Department of normal and pathological physiology of Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002, Russia), head of diagnostic department of Prime Center of Microsurgery of Eye (100e Borisenko str. Vladivostok 690088, Russia). ORCID: 0000-0002-8966-3120; p.: +7 (423) 203-03-03; e-mail: michaelr-n@mail.ru.

Федяшев Глеб Арнольдович, д-р мед. наук, профессор кафедры офтальмологии и оториноларингологии Тихоокеанского государственного медицинского университета (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), главный врач ООО «Приморский центр микрохирургии глаза (690088, г. Владивосток, ул. Борисенко 100Е); тел. +7 (423) 203-03-03; e-mail: fediashev@mail.ru.

Gleb A. Fedyashev, MD, PhD, Prof. of Department of ophthalmology and otorhinolaryngology of Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002, Russia), head physician of Prime Center of Microsurgery of Eye (100e Borisenko str. Vladivostok 690088, Russia). ORCID: p.: +7 (423) 203-03-03; e-mail: fediashev@mail.ru.

Автор для переписки

Маркелова Елена Владимировна, Тихоокеанский государственный медицинский университет, 690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2; e-mail: markev2010@mail.ru

И.В. Нестерова^{1,3}, Е.О. Халтурина², В.Н. Нелюбин⁴, С.В. Хайдуков⁵, Г.А. Чудилова³,
В.В. Малиновская⁶

НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ ВЛИЯНИЙ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА $\alpha 2B$ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO НА УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА NF-KB, РЕЦЕПТОРОВ IFN α | β R И IFN γ R (CD119) НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ГЕРПЕС-ВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

¹ФГАБОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки России, Москва, Россия

²ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

⁵ФНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Москва, Россия

⁶ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме:

Введение. Нейтрофильные гранулоциты (НГ) и система интерферонов (IFN) играют ведущую роль в противовирусной иммунной защите. У пациентов, страдающих атипичными хроническими активными герпес-вирусными инфекциями (АХА-ГВИ), часто наблюдается нейтропения и нарушение индуцированной продукции IFN α / β и IFN γ . Не исключено, что у этих пациентов имеются различные нарушения внутриклеточного сигналинга на всех этапах синтеза IFN α / β клетками иммунной системы, в т. ч. и НГ, что приводит к дефициту IFN α / β . Адекватный уровень экспрессии ядерного фактора NF-kB на последних этапах сигналинга позитивно влияет на синтез IFN α / β , а нарушения экспрессии NF-kB могут приводить к дефектам синтеза IFN α / β .

Цель исследования: уточнить особенности экспрессии ядерного фактора NF-kB, мембранных рецепторов IFN α | β R и IFN γ R (CD119) НГ пациентов с АХА-ГВИ с последующей оценкой эффектов влияния на них рекомбинантного IFN $\alpha 2b$ (recIFN $\alpha 2b$) в экспериментальной системе in vitro.

Материалы и методы. В основную группу исследования (ОГИ) включены 25 пациентов с АХА-ГВИ обоего пола в возрасте 23-64 лет. В комплексе исследования для детекции герпес-вирусных инфекций и уровней IFN α и IFN γ использовали метод серодиагностики (ИФА), для обнаружения генома вирусов – PCR-RT. В системе in vitro исследованы 407 образцов крови. Для оценки количества (%) НГ экспрессирующих NF-kB, IFN α | β R, IFN γ R и уровня их экспрессии до и после инкубации с recIFN $\alpha 2b$ использовали метод проточной цитофлюориметрии. Применены адекватные статистические методы.

Результаты: у пациентов, страдающих АХА-ГВИ, был выявлен дефицит индуцированной продукции IFN α и IFN γ на фоне снижения плотности экспрессии ядерного фактора NF-kB НГ, а также нарушения экспрессии мембранных рецепторов IFN α | β R, IFN γ R. RecIFN $\alpha 2b$ в системе in vitro оказал неоднозначное влияние на экспрессию NF-kB, IFN α | β R и IFN γ R НГ.

Заключение: дефицит индуцированной продукции IFN α и IFN γ у пациентов с АХА-ГВИ ассоциирован с вариативными изменениями экспрессии NF-kB, IFN α | β R и IFN γ R НГ. RecIFN $\alpha 2b$ в системе in vitro оказывает неоднозначное влияние на измененную экспрессию NF-kB, IFN α | β и IFN γ НГ, что, по-видимому, зависит от врожденного или приобретенного характера этих нарушений.

Ключевые слова: герпес-вирусные инфекции, система интерферона, ядерный фактор NF-kB, нейтрофильные гранулоциты.

Образец цитирования: Нестерова И.В., Халтурина Е.О., Нелюбин В.Н., Хайдуков С.В., Чудилова Г.А., Малиновская В.В. Неоднозначность влияний рекомбинантного интерферона $\alpha 2b$ в эксперименте in vitro на уровни экспрессии ядерного фактора NF-kB, рецепторов IFN α | β R и IFN γ R (CD119) нейтрофильных гранулоцитов пациентов с хроническими герпес-вирусными инфекциями // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 38-46.

Nesterova I.V.^{1,3}, Khalturina E.O.², Nelyubin V.N.⁴, Khaidukov S.V.⁵, Chudilova G.A.³

V.V. Malinovskaya⁶

AMBIGUITY EFFECTS OF RECOMBINANT INTERFERON $\alpha 2B$ IN AN IN VITRO EXPERIMENT ON THE EXPRESSION OF NUCLEAR FACTOR NF-KB, IFN α ' β R AND IFN γ R (CD119) RECEPTORS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF PATIENTS WITH CHRONIC HERPES VIRUS INFECTIONS

¹The Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia,

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

³Kuban state medical university, Krasnodar, Russia,

⁴Moscow State University of Medicine and Dentistry Moscow, Russia;

⁵Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry, Moscow, Russia

⁶National Research Centre for Epidemiology and Microbiology N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Neutrophil granulocytes (NGs) and the interferon's system (IFN) play a leading role in antiviral immune defense. At the same time, patients suffering from atypical chronic active herpes-viral infections (ACA-HVI) often have neutropenia and impaired induced IFN α/β and IFN γ production. It is possible that these patients have various disorders of intracellular signaling at all stages of IFN α/β synthesis by immune system cells, including NG, which leads to IFN α/β deficiency. An adequate level of nuclear factor NF-kB expression has positive effects on synthesis of IFN α/β in the last stages of signaling. The disturbances in the expression of NF-kB can lead to defects in the synthesis of IFN α/β .

The aim: to clarify the features of nuclear factor NF-kB, membrane receptors IFN α/β R and IFN γ R (CD119) expression on NG of patients with ACA-HVI, with the subsequent assessment of the recombinant IFN α 2b (recIFN α 2b) effects on them in the experimental system in vitro.

Materials and methods: 25 patients with ACA-HVI of both sexes aged 23-64 years were included in the main group of the study (MSG). In the complex of the study for the detection of herpes-viral infections: the method of serodiagnosis (ELISA), for the detection of the genome of viruses - PCR-RT. 407 blood samples were examined in the in vitro system. Flow cytofluorimetry was used to estimate the amount (%) of NG expressing NF-kB, IFN α/β R, IFN γ R, and their expression levels before and after incubation with recIFN α 2b. Adequate statistical methods were applied.

Results: In patients suffering from ACA-HVI, a deficiency of induced IFN α and IFN γ production was detected, due to a decrease in the expression density of nuclear factor NF-kB NG, as well as a violation of the expression of membrane receptors IFN α/β R, IFN γ R. RecIFN α 2b in the in vitro system had a mixed effect on the expression of NF-kB, IFN α/β R and IFN γ R NG.

Conclusion: The deficiency of induced IFN α and IFN γ production in patients with ACA-HVI is associated with variable changes in NF-kB, IFN α/β R and IFN γ R NG expression. RecIFN α 2b in the in vitro system has an ambiguous effect on altered expression of NF-kB, IFN α/β and IFN γ NG, which appears to depend on the innate or adaptive nature of these disorders. **Keywords:** herpesvirus infections, interferon system, nuclear factor NF-kB, neutrophilic granulocytes

Введение

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) и система интерферонов (IFN) играют ведущую роль в противовирусной иммунной защите. Активное развитие молекулярной иммунологии позволило расширить существующие представления о роли НГ, которые в настоящее время относят к ключевым регуляторным клеткам иммунной системы, способным регулировать работу врожденного и адаптивного иммунитета [1, 6]. Авторитетно доказана роль НГ в противовирусной иммунной защите, особенно на ранних стадиях контакта НГ с вирусами: фагоцитоз, формирование NETs, экзосом, реализация антителозависимой цитотоксичности, позитивная и негативная регуляция активности Т- и В-лимфоцитов, естественных киллерных клеток (ЕКК), экспрессия рецепторов и т. д. Эффекторная активность НГ зависит от уровня экспрессии различных рецепторов [7].

Многими авторами показано, что вирусы, в частности вирусы семейства Herpesviridae, способны негативно влиять на функции НГ, трансформировать их фенотип, активировать апоптоз, что приводит к нейтропении, депрессии функциональной активности НГ [1, 7].

После контакта с вирусами реализуется I этап синтеза IFN α/β , сопровождающийся экспрессией генов, ответственных за синтез IFN α плазматическими дендритными клетками. IFN α , связываясь с рецепторами IFN α/β R, запускает II этап синтеза

IFN α/β другими клетками иммунной системы (ИС). В сигнальном процессе, на всех этапах синтеза IFN α/β , участвует ядерный фактор NF-kB, уровень активации которого влияет на синтез IFN α/β . Эндогенный и экзогенный IFN α , в том числе и рекомбинантный IFN α 2b (recIFN α 2b), при связывании с рецепторами IFN α/β R и запускают II этап синтеза IFN α .

NF-kB/Rel-семейство транскрипционных факторов состоит из нескольких структурно родственных белков, образующих гомодимеры и гетеродимеры, и включает p50/p105, p52/p100, RelA (p65) и c-Rel/NF-kB. Члены этого семейства ответственны за регуляцию свыше 150 генов-мишеней, включая экспрессию генов провоспалительных цитокинов, иммунорецепторов и молекул клеточной адгезии. Вследствие чего NF-kB часто называют центральным медиатором иммунной системы человека. Действуя как димеры, эти факторы транскрипции связываются с ДНК в kB сайтах, тем самым регулируя экспрессию генов-мишеней. Показано, что в большинстве типов клеток, в т. ч. НГ, NF-kB может быть индуцирован в ядре при воздействии одного из индукторов: TNF α (фактора некроза опухоли), PMA (форболовых эфиров), LPS (липополисахаридов) и многих других. Участки связывания транскрипционного фактора NF-kB присутствуют в регуляторных областях большого количества различных генов. В основном это гены иммунного ответа и воспалительных реакций. NF-kB регулирует транскрипцию генов κ -цепи Ig,

интерлейкинов 2, 6 и 8 TCR (рецептора Т-клеток), ГКГС (главного комплекса гистосовместимости) I и II, факторов роста GM-CSF, G-CSF, цитокинов TNF α и TNF β , β -интерферона, C4 белка системы комплемента, онкогена c-шус [12, 13], вирусов HIV, SV-40, CMV, аденовирусов и других [8, 15]. NF- κ B принимает участие в регуляции таких процессов, как активация Т-лимфоцитов и терминальная дифференцировка В-лимфоцитов [13]. Классическим индуктором активации NF- κ B является фактор некроза опухоли (TNF α). Недавно было показано, что NF- κ B активирует транскрипцию генов TRAF1 и TRAF2, что приводит к подавлению активности каспазы-8 и блокировке апоптоза [14].

Ядерный фактор NF- κ B играет важную роль в реализации процессов острого и хронического воспаления и тем самым участвует в иммунопатогенезе многих иммунозависимых заболеваний. В связи с изложенным немаловажной проблемой является разработка новых экспериментальных и клинических, в том числе терапевтических, подходов направленных на восстановление его нормального функционирования.

Проблема лечения атипично протекающих активных хронических герпес-вирусных ко-инфекций (ВЭБ, ВЧГБ, ЦМВ, ВПГ1/2 тип) (АХА-ГВИ), ассоциированных с поствирусным синдромом хронической усталости, фибромиалгией, артралгией и различными когнитивными и мнестическими расстройствами, чрезвычайно актуальна и требует постоянного совершенствования подходов к ее решению. Показано, что у пациентов с АХА-ГВИ имеется интерферопатия: дефицит индуцированной в системе *in vitro* продукции IFN α [3, 10]. В то же время исследований, посвященных изучению экспрессии ядерного фактора NF- κ B в нейтрофильных гранулоцитах, играющих, с современной точки зрения, большую роль в противовирусной иммунной защите организма, до настоящего времени не проводилось. В связи с чем определенный интерес, с нашей точки зрения, представляет изучение особенностей индуцированной продукции IFN α и IFN γ , экспрессии ядерного фактора NF- κ B, экспрессии мембранных рецепторов IFN α | β R и IFN γ R НГ пациентов, страдающих АХА-ГВИ, и поиск различных иммуотропных субстанций в эксперименте *in vitro* с оценкой их одномоментного модулирующего влияния на восстановление нормальных уровней экспрессии ядерного фактора NF- κ B и плотности экспрессии мембранных IFN α | β R и IFN γ R НГ.

Цель исследования: уточнить особенности экспрессии ядерного фактора NF- κ B, мембранных рецепторов IFN α | β R и IFN γ R (CD119) НГ пациентов с АХА-ГВИ с последующей оценкой эффектов влияния на них рекомбинантного IFN α 2b (recIFN α 2b) в экспериментальной системе *in vitro*.

Материалы и методы

Под нашим наблюдением находились 25 пациентов обоего пола в возрасте от 23 до 64 лет (основная группа исследования – ОГИ), страдающих атипичными хроническими активными герпес-вирусными инфекциями (АХА-ГВИ), манифестирующими синдромом хронической усталости (СХУ), различными когнитивными и мнестическими расстройствами. Для этой группы пациентов характерен определенный симптомокомплекс, включающий в себя ряд симптомов, патогномоничных для нейроиммуновоспалительных процессов, сопровождающих течение АХА-ГВИ. Для оценки выраженности клинических симптомов СХУ использовалась разработанная нами 5-балльная шкала. Группу сравнения (ГС) составили 8 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту.

В комплекс исследования помимо традиционных методов (сбор анамнеза, методы физикального обследования, ОАК и пр.) для детекции герпес-вирусных инфекций использовались методы серодиагностики (классов IgM VCA EBV, IgG VCA EBV, IgG EBNA, IgG HHV6, IgM CMV, IgG CMV, IgM HSV1/2, IgG HSV1/2) с помощью ИФА тест-систем НПО «Диагностические системы» (Россия). Для обнаружения генома вирусов в биоматериалах (кровь, слюна, моча, соскоб с миндалин и задней стенки глотки) был использован метод PCR-Real time тест-системы «АмплиСенс» (Россия). В системе *in vitro* исследованы 32 образца крови 8 условно здоровых взрослых лиц и 375 образцов крови от 25 пациентов, страдающих АХА-ГВИ. Индуцированная продукция IFN α и IFN γ определялась иммуноферментным методом после воздействия на мононуклеары специфических индукторов: вируса Ньюкасла и ФГА соответственно. Методом проточной цитометрии (проточный цитофлуориметр FC 500 Beckman Coulter, США) с использованием набора Amnis® NF- κ B Translocation Kit (Luminex Corporation, USA), а также конъюгатов МкАТ anti-hIFN- α / β , CD119 (RD Systems, USA) были исследованы: экспрессия ядерного фактора NF- κ B (метод был модифицирован для проточной цитометрии), а также мембранных IFN α | β R, IFN γ R (CD119) НГ. Оценивалось количество (%) НГ периферической крови, экспрессирующих ядерный фактор NF- κ B, мембранные рецепторы IFN α | β R, IFN γ R (CD119) и интенсивность их экспрессии по MFI до и после инкубации с рекомбинантным IFN α 2b (5 ME recIFN α 2b в 100 мкл фосфатного буфера в течение 60 мин., при температуре 37 °C). Рекомбинантный IFN α 2b был любезно предоставлен для экспериментального исследования ФГУП «ГосНИИ особо чистых препаратов» ФМБА РФ.

Исследование было одобрено комиссией по вопросам этики. Согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA

Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) у всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании и на обработку персональных данных.

Для статистической обработки полученных данных использованы компьютерные программы Microsoft Excel. Результаты представляли в виде медианы (верхний и нижний квартиль) Me [Q1; Q3], определялись критерии Манна-Уитни и Вилкоксона. Различия полагали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе клинического материала было установлено, что все пациенты основной группы исследования (ОГИ) страдали микст АХА-ГВИ с доминированием ВЭБ. При этом лидирующими сочетаниями являлись: ВЭБ+ЦМВ+ВЧГ6 – 52 %, ВЭБ+ВПГ1 – 36 %; ВЭБ+ЦМВ – 12 % случаев. Выявлен ряд клинических особенностей, характерных для микст АХА-ГВИ, к которым относятся: длительное ощущение выраженной слабости, хронической усталости, плохая переносимость адекватной физической активности, кроме того, пациентов беспокоят потливость, непостоянные боли в горле, в мышцах и суставах (фибромиалгии и артралгии), головные боли, субфебрильная температура, лимфаденопатия, нарушение сна, снижение памяти, внимания, интеллекта, реже – психогенная депрес-

сия. Нередко имеют место вирус-ассоциированные рекуррентные ОРВИ, хронические бактериальные и грибковые инфекции, наблюдается выраженная коморбидность. Заболевания, ассоциированные с АХА-ГВИ, характеризуются упорно-рецидивирующим течением.

Все эти характерные для АХА-ГВИ симптомы были оценены с использованием разработанной нами ранее 5-балльной шкалы для оценки выраженности клинических симптомов / критериальных признаков у пациентов, страдающих атипичной хронической активной герпес-вирусной ко-инфекцией, ассоциированной с синдромом хронической усталости (СХУ) и когнитивными расстройствами [10]. При оценке учитывалось наличие или отсутствие симптомов. Их ранжирование в зависимости от тяжести проявления производилось в баллах от 0 до 5, где: 0 баллов – отсутствие симптомов; 1 балл – минимальные симптомы; 2 балла – средняя выраженность симптомов; 3 балла – тяжелая степень; 4 балла – очень тяжелая степень; 5 баллов – крайне тяжелая степень [25, 26] (таб.1).

Выраженность симптомов, оцененная по этой шкале, составляла Me [Q1; Q3] 53,5 [45,0;61,5] баллов.

Диагноз АХА-ГВИ был подтвержден методами серодиагностики (ИФА), молекулярно-генетическими методами (ПЦР). Кроме того, были установлены нарушения индуцированной продукции IFN α в 100,0 % и дефицит индуцированной продукции IFN γ в 76,0% случаев.

Таблица 1

Степень выраженности клинических симптомов / критериальных признаков у пациентов, страдающих АХА-ГВИ (в баллах)

Симптом	Балл Me [Q1; Q3]
• Хроническая усталость	4,5 [3,5;5,0]
• Непереносимость адекватной физической нагрузки	4,0 [3,5; 4,5]
• Длительный субфебрилитет	3,5 [2,5; 4,5]
• Боль и дискомфорт в горле	4,0 [3,5; 4,5]
• Повышенная потливость, зябкость, чувствительность к холоду	4,5 [4,0; 5,0]
• Головная боль, мигрень	4,5 [4,0; 5,0]
• Регионарная лимфаденопатия	4,0 [3,5; 4,5]
• Повышенная утомляемость, снижение продуктивности труда	4,5 [4,0;5,0]
• Неврологические расстройства (парестезия, синестезия, расстройства чувствительности, низкий тонус мышц и т. д.)	3,5 [2,5; 4,5]
• Снижение памяти, концентрации внимания	4,0 [3,5; 4,5]
• Цефалгии, артралгии, миалгии	4,5 [4,0; 5,0]
• Нарушения сна (бессонница или повышенная сонливость)	4,5 [4,0; 5,0]
• Панические атаки, нарушения настроения, эмоциональная лабильность, психогенная депрессия и т. д.	3,5 [2,5; 4,5]
• Сумма баллов	53,5 [45,0;61,5]

Сравнительная характеристика экспрессии ядерного фактора NF-kB, мембранных рецепторов IFN α / β R и IFN γ R на НГ условно здоровых лиц и пациентов, страдающих АХА – ГВИ

Количество НГ, экспрессирующих ядерный фактор NF- kB, рецепторы IFN α / β R и IFN γ R						
Группы исследования	IFN γ R Me (Q1; Q2)		IFN α / β R Me (Q1; Q2)		NF- kB Me (Q1; Q2)	
Группа сравнения n=6	%	MFI	%	MFI	%	MFI
	29,65 (14,3;42,7)	1,48 (1,1; 2,2)	4,55 (2,3; 7,2)	1,19 (1,15;1,22)	100,0	8,9 (8,7;10,1)
Основная группа исследования n=25	%	MFI	%	MFI	%	MFI
	39,5 (27,2;52,0)	1,48 (1,4; 1,8)	1,0* (0,6;1,9)	1,71 (1,61;1,91)	100,0	6,3* (4,8;7,5)

Примечание: *достоверность различия между группой сравнения и основной группой исследования, $p < 0,05$.

В эксперименте in vitro было установлено, что в 100,0 % НГ пациентов основной группы исследования (ОГИ) и группы сравнения (ГС) экспрессировали NF-kB. При этом основные различия были выявлены между ОГИ и ГС при тестировании MFI NF-kB НГ (табл. 2, рис. 1).

Анализ полученных данных показал, что у условно здоровых лиц ГС НГ экспрессируют ядерный фактор NF-kB в 100,0 % случаев с MFI 8,68 [6,84;8,95]. Кроме того, было показано, что в основной группе исследования (ОГИ) также, как и в группе сравнения (ГС), 100,0% НГ экспрессируют ядерный фактор NF-kB. Однако в ОГИ по сравнению с ГС выявлено значительное и достоверное снижение уровня плотности экспрессии NF-kB по показателю MFI до 6,34 [4,82;7,54] ($p < 0,05$).

Кроме того, установлено, что у условно здоровых лиц ГС 4,55 [2,3;7,2] % НГ экспрессируют мембранные рецепторы IFN α / β R с уровнем плотности экспрессии по MFI 1,19 [1,15;1,22], 29,65 [14,3;42,7] % НГ - IFN γ R (CD119) с уровнем плотности экспрессии

по MFI 1,48 [1,14;2,22]. В основной группе исследования (ОГИ) НГ экспрессируют рецепторы IFN α / β R в 1,0 [0,6;1,9] % с уровнем плотности экспрессии по MFI 1,71 [1,61;1,91], IFN γ R (CD119) – в 39,5 [27,18;52,03] % с уровнем плотности экспрессии по MFI 1,48 [1,35;1,72].

Показано, что под влиянием recIFN α 2b происходит разделение популяции НГ основной группы (ОГИ) экспрессирующих NF-kB на две группы: группа исследования 1 (ГИ1) и группа исследования 2 (ГИ2). Так, в ГИ1 отмечается низкая плотность экспрессии NF-kB НГ по MFI 6,2 [5,13; 6,83], не отличающаяся от уровня такового до воздействия recIFN α 2b - MFI - 6,34 [4,82;7,54] ($p > 0,01$). В противоположность ГИ1 в ГИ2 отмечается достоверное повышение плотности экспрессии NF-kB под влиянием recIFN α 2b: число молекул NF-kB НГ по MFI увеличилось с 6,34 [4,82;7,54] до 8,11 [7,92; 9,78] ($p < 0,05$). (Таб.3, Рис.2.)

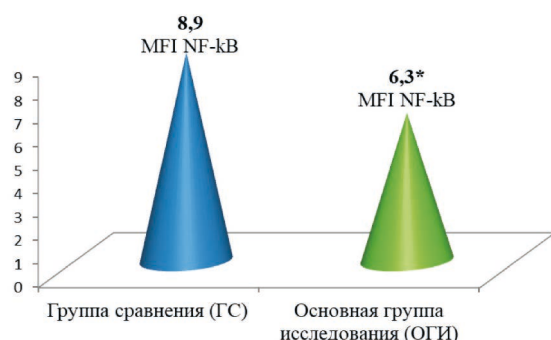


Рис. 1. Уровни экспрессии по MFI ядерного фактора NF-kB НГ у условно здоровых лиц (ГС) и пациентов, страдающих АХА-ГВИ (ОГИ).

*Достоверность различия между группой сравнения (ГС) и основной группой исследования (ОГИ) при $p < 0,05$

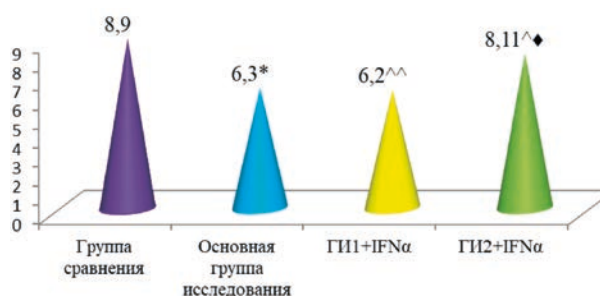


Рис. 2. Сравнение уровней экспрессии по MFI ядерного фактора NF kB НГ пациентов, страдающих АХА-ГВИ, до и после воздействия recIFN α 2b в экспериментальной системе in vitro.

* – достоверность различия между ГС и ОГИ; $p < 0.05$.

^^ – достоверность различия между ГС и ГИ1+IFN α 2; $p < 0.05$.

^ – достоверность различия между группами исследования ГИ1 и ГИ2 $p < 0.05$.

♦ – достоверность различия между ОГИ и ГИ2+IFN α 2b; $p < 0.05$.

Сравнительная характеристика экспрессии ядерного фактора NF- κ B, мембранных рецепторов IFN α | β R и CD119 (IFN γ R) НГ условно здоровых лиц и пациентов, страдающих АХА – ГВИ до и после воздействия recIFN α 2b в эксперименте in vitro

До воздействия recIFN α 2b в экспериментальной системе in vitro						
Группы исследования	IFN γ R Me (Q1; Q2)		IFN α β R Me (Q1; Q2)		NF- κ B Me (Q1; Q2)	
Группа сравнения (ГС) n=8	%НГ	MFI	%НГ	MFI	%НГ	MFI
	19,9 (14,3;27,6)	1,48 (1,1;2,2)	4,55 (2,3;7,2)	1,19 (1,15;1,22)	100,0	8,9 (8,7;10,1)
Основная группа исследования (ОГИ) n=25	39,5* (28,7;48,6)	1,48 (1,35;1,75)	1,0* (0,6;1,9)	1,71* (1,61;1,91)	100,0	6,3 (4,8;7,5)
После воздействия recIFN α 2b в экспериментальной системе in vitro						
Группы исследования	IFN γ R Me (Q1;Q2)		IFN α β R Me (Q1;Q2)		NF- κ B Me (Q1;Q2)	
	%НГ	MFI	%НГ	MFI	%НГ	MFI
Группа исследования 1 (ГИ1) n=13	54,35* (44,25;66,78)	1,63 (1,43;1,83)	3,0^ (1,21;4,13)	1,61 (1,47;1,95)	100,0	6,2 (5,13; 6,83)
Группа исследования 2 (ГИ2) n=12	61,95* (21,6; 67,85)	1,58 (1,46;1,82)	0,9^^ (0,7; 1,4)	1,77 (1,65; 1,81)	100,0	8,11* (7,92; 9,78)

Примечание: * – достоверность различий от контроля $p < 0.05$; ^ – достоверность различия между ОГИ и ГИ1 $p < 0.05$; ^^ – достоверность различия между группами исследования ГИ1 и ГИ2 $p < 0.05$.

Принимая во внимание разделение основной группы исследования (ОГИ) на 2 группы ГИ1 и ГИ2, с ориентацией на низкий или высокий уровни экспрессии NF- κ B по MFI после воздействия recIFN α 2b, оценка влияния recIFN α 2b на количество НГ, несущих мембранные IFN α | β R и IFN γ R, и на уровни плотности экспрессии этих рецепторов была проведена также в группах исследования: ГИ1 и ГИ2.

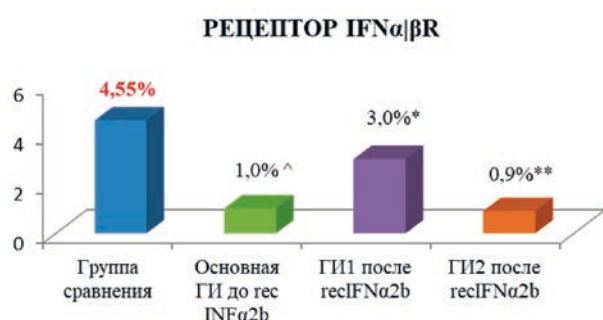


Рис. 3. Количество НГ, экспрессирующих мембранный рецептор IFN α | β R до и после воздействия recIFN α 2b у пациентов, страдающих АГА-ГВИ (в %).

^ – достоверность различия между ГС и ОГИ, $p < 0.05$

* – достоверность различий между ОГИ и ГИ1 после recIFN α 2b, $p < 0.05$.

** – достоверность различия между ГС и ГИ2 после recIFN α 2b, $p < 0.05$

В первой группе (ГИ1) (52 % случаев) под влиянием recIFN α 2b выявлено достоверное увеличение по сравнению с исходными значениями % НГ, экспрессирующих как IFN α | β R – до 3,0 [1,21;4,13] %, так и IFN γ R 54,35 [44,25;69,78] % ($p_{1,2} < 0,05$) (рис. 3, 4). Этот факт свидетельствует об увеличении уровня экспрессии рецепторов IFN α | β R и IFN γ R на мембранной поверхности НГ на 300 и 37,5 % соответственно (увеличение в 3 раза и 1.37 раза), при этом плотность экспрессии рецепторов по показателю MFI не менялась ($p_{1,2} > 0,05$). Во второй группе (ГИ2) (48% случаев) показано отсутствие динамики уровня НГ,



Рис. 4. Количество НГ, экспрессирующих мембранный рецептор IFN γ R (CD119) до и после воздействия recIFN α 2b у пациентов, страдающих АХА-ГВИ (в %).

* – статистически значимые различия по отношению к группе сравнения, $p < 0.05$

экспрессирующих под влиянием $reclFN\alpha 2b$, при этом плотность экспрессируемых $IFN\alpha|\beta R$ по MFI не менялись ($p_{1,2,3} > 0,05$). В тоже время под влиянием $reclFN\alpha 2b$ произошло увеличение % НГ, несущих мембранные рецепторы $IFN\gamma R$ с 39,5 [27,18;52,03] % до 61,95 [21,60;67,85] %, что составляет 56,8 %, при этом плотность экспрессии рецепторов по MFI 1,58 [1,46;1,82] не изменилась ($p > 0,05$).

Обсуждение

Принимая во внимание, что у пациентов, включенных в данное исследование (ОГИ), ВЭБ является доминирующим и присутствует во всех выявленных комбинациях герпес-вирусных ко-инфекций, необходимо учитывать особенности его негативного влияния на экспрессию ядерного фактора NF-kB и рецепторов $IFN\alpha|\beta R$, $IFN\gamma R$ на мембране НГ. По данным литературы, BGLF2 белок ВЭБ ингибируют два ключевых белка STAT1 и STAT2, которые участвуют в сигнальном II этапа синтеза $IFN I$ типа [4,5]. Кроме того, BGLF2 рекрутирует ферменты клетки-хозяина для удаления фосфатной группы из STAT1, тем самым инактивируя ее активность, и перенаправляет STAT2 на деградацию, что приводит к дефектной экспрессии интерферон стимулированных генов (ISG) и нарушению синтеза $IFN I$ типа, а следовательно, к снижению противовирусной и иммуномодулирующей активности $IFN I$ типа [2, 3, 4, 8, 11]. Эти данные подтверждают негативное повреждающее влияние ВЭБ, являющееся причиной возникновения вторичных дефектов экспрессии не только NF-kB, но и мембранных рецепторов $IFN\alpha|\beta R$, и не противоречат результатам, полученным нами при проведении настоящего исследования.

Необходимо отметить, что не исключена вероятность врожденных нарушений в системе интерферонов у пациентов с АХА-ГВИ, что обуславливает, во-первых, возникновение нетипично протекающих герпес-вирусных ко-инфекций и, во-вторых, подтверждается отсутствием адекватного ответа NF-kB на воздействие $reclFN\alpha 2b$ в системе *in vitro* в ГИ1.

По данным российских и зарубежных авторов, существуют также сведения о том, что хроническая ВЭБ инфекция может приводить к повышению экспрессии ядерного фактора NF-kB, что, в свою очередь, может провоцировать развитие аутоиммунных заболеваний и опухолевых процессов. Следует подчеркнуть, что у пациентов ОГИ мы не наблюдали аутоиммунных нарушений и опухолевых процессов, но при этом отмечали ведущий синдром хронической усталости, миалгии, артралгии и синдром малых когнитивных расстройств, которые являются клиническими критериями нейроиммуновоспалительных процессов.

В заключение хотелось бы отметить, что полученные в настоящем исследовании результаты позволяют уточнить иммунопатогенез атипичных хронических активных герпес-вирусных ко-инфекций, ассоциированных с доминированием ВЭБ инфекции. Эти данные свидетельствуют также о позитивном влиянии $reclFN\alpha 2b$ в эксперименте *in vitro* на статистически значимое восстановление уровня экспрессии ядерного фактора NF-kB, а также экспрессии мембранных рецепторов $IFN\alpha|\beta R$ НГ при, предположительно, вторичных дефектах системы интерферонов, сопровождающихся дефицитом $IFN I$ и $IFN II$ типа. Полученные результаты могут послужить основой для дальнейшей разработки стратегии и тактики применения иммуномодулирующих препаратов на основе безопасного как для детей, так и для взрослых, препарата интерферона $\alpha 2b$ в комплексе с антиоксидантами для локального и системного применения (гель Виферон®, суппозитории Виферон® Россия) при хронических герпес-вирусных инфекциях в клинической практике. В тоже время у пациентов, имеющих изначально низкий уровень экспрессии ядерного фактора NF-kB, НГ которых не ответили на воздействие $reclFN\alpha 2b$ в системе *in vitro*, по-видимому, имеются врожденные дефекты синтеза $IFN I$ типа, обусловленные неадекватно низким уровнем экспрессии ядерного фактора NF-kB. Для достижения позитивного клинического эффекта у таких пациентов с АХА-ГВИ будет необходимо применение заместительной интерферонотерапии длительными курсами, в высоких дозах. В то время как пациентам, у которых изначально низкий уровень экспрессии NF-kB, НГ достоверно повысился до уровня условно здоровых лиц, т. е. имеется позитивный ответ на воздействие $reclFN\alpha 2b$ в системе *in vitro*, будет полезным назначение интерферонотерапии в стандартных дозах.

Заключение

В результате проведенного исследования у пациентов, страдающих АХА-ГВИ, были выявлены дефекты противовирусной иммунной защиты: снижение плотности экспрессии одного из главных факторов внутриклеточного сигнального, отвечающего за продукцию $IFN I$ типа – ядерного фактора NF-kB, на фоне установленного дефицита нарушения индуцированной продукции $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, а также нарушения экспрессии мембранных рецепторов $IFN\alpha|\beta R$ и $IFN\gamma R$ НГ. Полученные данные позволили сформулировать определенные выводы:

1. У всех пациентов, страдающих АХА-ГВИ на фоне дефицита сывороточного $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, имеет место нарушение экспрессии ядерного фактора NF-kB, ассоциированное со снижением уровня экспрессии мембранных рецепторов $IFN\alpha|\beta R$ НГ и повышением уровня экспрессии рецепторов $IFN\gamma R$ НГ.

2. Рекомбинантный IFN α 2b в системе *in vitro* оказывает неоднозначные вариативные эффекты влияния на экспрессию ядерного фактора NF- κ B и мембранных рецепторов IFN α | β и IFN γ НГ пациентов, страдающих АХА-ГВИ:

- У 52.0 % пациентов АХА-ГВИ (ГИ1) под влиянием recIFN α 2b в системе *in vitro* уровень экспрессии NF- κ B достоверно не изменился. В тоже время наблюдалось достоверное увеличение уровня экспрессии мембранных рецепторов IFN α | β НГ по сравнению с ОГИ (до воздействия recIFN α 2b), однако уровень экспрессии, характерный для НГ условно здоровых лиц ГС, достигнут не был. При этом имелось достоверное увеличение экспрессии рецепторов IFN γ НГ по сравнению с ОГИ и ГС.
- У 48.0 % пациентов АХА-ГВИ (ГИ2) под влиянием recIFN α 2b в системе *in vitro* наблюдалось достоверное восстановление экспрессии ядерного фактора NF- κ B до уровня такового у условно здоровых лиц группы сравнения. Параллельно произошло достоверное увеличение уровня экспрессии мембранных рецепторов IFN γ НГ, при этом уровень экспрессии рецепторов IFN α | β НГ не изменился.

3. Предположительно, у пациентов ГИ1 нарушения экспрессии NF- κ B имеют врожденный характер, поскольку воздействие recIFN α 2b не повлияло на уровень экспрессии NF- κ B, в то время как у пациентов ГИ2 нарушения экспрессии NF- κ B, по-видимому, носят приобретенный, вторичный характер, о чем свидетельствует восстановление уровня экспрессии NF- κ B под влиянием recIFN α 2b в эксперименте *in vitro*.

4. Полученные в настоящем исследовании результаты позволяют обосновать необходимость проведения интерферонотерапии у пациентов с АХА-ГВИ и разработать в дальнейшем дифференцированные терапевтические стратегии проведения интерферонотерапии у данной категории пациентов с врожденными или приобретенными дефектами системы интерферонов.

Список литературы / References

1. Нестерова И.В. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе, С.В. Ковалева, А.А. Евлевский, Т.З.Л. Нгуен // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7 (№ 3). – С. 219-230. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.

2. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Халтурина Е.О., Малиновская В.В. Врожденные и

приобретенные интерферопатии, ассоциированные с нетипично протекающими вирусными инфекциями и с COVID-19 (монография) // СПб.: Диалог, 2022. – 600 с. ISBN:978-8469-0157-5

3. Татаурщикова Н.С., Летяева О.И., Федоскова Т.Г., Русанова А.С., Коваленко А.Л. Иммуномодулирующая терапия в лечении пациентов с реактивацией герпесвирусной инфекции на фоне COVID-19 // Эффективная фармакотерапия. – 2022. – Т. 18. № 12. – С. 64-67.

4. Charostad, J., Nakhaie, M., Dehghani, E. Faghihloo. The interplay between EBV and KSHV viral products and NF- κ B pathway in oncogenesis. // *Infect Agents Cancer* 15, 62 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13027-020-00317-4>.

5. de Oliveira DE, Ballon G, Cesarman E. NF- κ B signaling modulation by EBV and KSHV. // *Trends Microbiol.* 2010; 18(6):248–57. PubMed Article CAS PubMed Central Google Scholar].

6. Galli S.J. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils / S.J. Galli, N. Borregaard, T.A. Wynn // *Nat. Immunol.* – 2011. – V.12. – P. 1035–1044.

7. Geerdink R.J. Neutrophils in respiratory syncytial virus infection: A target for asthma prevention / R.J. Geerdink, J. Pillay, L. Meyaard, L. Bont // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2015. – V.136(4). – P. 838-847.

8. Gimble JM, Duh E, Ostrove JM, Gendelman HE, Max EE, Rabson AB.

9. Activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 is associated with induction of a nuclear factor that binds to the NF-kappa B/core enhancer sequence.// *J Virol.* 1988 Nov;62(11):4104-12. doi: 10.1128/JVI.62.11.4104-4112.1988. PMID: 2845125

10. Jiang J, Zhao M, Chang C, Wu H, Lu Q. Type I Interferons in the Pathogenesis and Treatment of Autoimmune Diseases. // *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020 Oct; 59(2):248-272. doi: 10.1007/s12016-020-08798-2. PMID: 32557263 Review.

11. Nesterova I.V., Khalturina E. O., Malinovskaya V. V., Nguenduen L. Recombinant IFN α 2b in Complex with Immunotropic Drugs Restored Antiviral Functions of Subset IFN α /IFN γ +TLR4+NG Neutrophilic Granulocyte and Demonstrated Good Clinical Efficacy in Patients with Active Chronic Herpes-viral Infections and Chronic Fatigue Syndrome // *Allergy and Asthma, Covid-19 and Corp, Immunophysiology and Immunorehabilitation: Innovative Technologies. Filodiritto International Proceeding* P.69-79 (2021).

12. Patel A, Hanson J, McLean TI, Olgiate J, Hilton M, Miller WE, Bachenheimer SL. Herpes simplex type 1 induction of persistent NF-kappa B nuclear translocation increases the efficiency of virus

replication. // *Virology*. 1998 Aug 1; 247(2):212-22. doi: 10.1006/viro.1998.9243. PMID: 9705914

13. Paludan SR, Ellermann-Eriksen S, Kruys V, Mogensen SC. Expression of TNF-alpha by herpes simplex virus-infected macrophages is regulated by a dual mechanism: transcriptional regulation by NF-kappa B and activating transcription factor 2/Jun and translational regulation through the AU-rich region of the 3' untranslated region. // *J Immunol*. 2001 Aug 15; 167(4):2202-8. doi: 10.4049/jimmunol.167.4.2202. PMID: 11490006.

14. Poma P. NF-kB and Disease. // *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 2; 21(23):9181. doi: 10.3390/ijms21239181. PMID: 33276434; PMCID: PMC7730361.

15. Sun Q, Matta H, Chaudhary PM. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein protects against growth factor withdrawal-induced apoptosis via NF-kappa B activation. // *Blood*. 2003 Mar 1; 101(5):1956-61. doi: 10.1182/blood-2002-07-2072. Epub 2002 Oct 24. PMID: 12406869

16. Vlach J, Pitha PM. Herpes simplex virus type 1-mediated induction of human immunodeficiency virus type 1 provirus correlates with binding of nuclear proteins to the NF-kappa B enhancer and leader sequence. // *J Virol*. 1992 Jun; 66(6):3616-23. doi: 10.1128/JVI.66.6.3616-3623.1992. PMID: 1316471

17. Wei H, Prabhu Lakshmi, Hartley Antja-Voy, Martin Matthew, Sun Emily, Jiang Guanglong, Liu Yunlong and Tao Lu. Methylation of NF-kB and its Role in Gene Regulation. // *Gene Expr Regulation Mamm Cells*. 2018:291.

Сведения об авторах:

Нестерова И.В., д-р мед. наук, проф., гл. науч. сотр. отд. клинической и экспериментальной иммунологии и

молекулярной биологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар; проф. каф. аллергологии и иммунологии ФНМО Мединститута ФГАОУ ВО РUDН Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация; e-mail: inesterova1@yandex.ru.

Халтурина Е.О., к.м.н., доцент, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. А.А. Воробьева ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия.

Нелюбин В.Н., д.м.н., профессор Научно-исследовательского медико-стоматологического института Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия.

Хайдуков С.В., д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории углеводов ФНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия.

Чудилова Галина Анатольевна, д-р биол. наук, доцент, зав. отд. клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, доц. каф. клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация; e-mail: chudilova2015@yandex.ru.

Малиновская В.В., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории онтогенеза и коррекции системы интерферона ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия.

Автор для переписки

Нестерова Ирина Вадимовна, ФГАОУ ВО РUDН Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация, e-mail: inesterova1@yandex.ru.

Я.В. Полонская, Е.В. Каштанова, Е.М. Стахнёва, В.С. Шрамко, Е.В. Садовский,
С.Р. Ледовских, А.Д. Худякова, Ю.И. Рагино

ВЛИЯНИЕ АБДОМИНАЛЬНОГО ОЖИРЕНИЯ НА УРОВНИ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ У МОЛОДЫХ ЛЮДЕЙ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН), Новосибирск, Россия

Резюме. Цель: исследовать про- и противовоспалительные маркеры крови у молодых людей с артериальной гипертензией (АГ) на фоне абдоминального ожирения (АО).

Материалы и методы: в исследование включили 530 человек, из них 267 человек с АГ, из которых 169 были с АО. В группе контроля (без АГ) было 263 человека, сопоставимых по полу и возрасту, с АО – 106 человек. У всех в крови методом мультиплексного анализа определяли содержание ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-8, MCP-1 (моноцитарный хемоаттрактантный протеин), PAI-1 (ингибитор активатора плазминогена-1), ИЛ-10, ИЛ-17а, ИЛ-17е, ИЛ-17f. Статистическая обработка проводилась в программе SPSS 13.0.

Результаты: уровень ИЛ-17а был выше у пациентов с гипертензией в 1,64 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Уровень ИЛ-6 у пациентов с гипертензией был выше ($p < 0,0001$) на 52,91 % по сравнению с группой без гипертензии. Разницы между контролем и группой с АГ по остальным биомаркерам выявлено не было. Влияния АО на уровень изучаемых маркеров в контрольной группе выявлено не было. В группе с АГ значимо более высокий уровень PAI-1 ($p < 0,05$) был в подгруппе с АО. Для подгрупп с АО разница между пациентами без АГ и с АГ проявилась в снижении уровня ИЛ-17е и повышении уровня ИЛ-6 у пациентов с АГ ($p < 0,05$). Для остальных показателей статистически значимой разницы не выявлено. Относительный шанс наличия ранней АГ был связан с наличием АО и повышением уровня ИЛ-6.

Заключение: из изученных нами маркеров воспаления повышенный уровень ИЛ-6 и ИЛ-17а могут служить в качестве потенциальных биомаркеров, указывающих на высокую вероятность развития ранней АГ у людей до 45 лет.

Ключевые слова: абдоминальное ожирение, маркеры воспаления, ранняя артериальная гипертензия.

Образец цитирования: Полонская Я.В., Каштанова Е.В., Стахнёва Е.М., Шрамко В.С., Садовский Е.В., Ледовских С.Р., Худякова А.Д., Рагино Ю.И. Влияние абдоминального ожирения на уровни маркеров воспаления у молодых людей с артериальной гипертензией // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 47-53.

Ya.V. Polonskaya, E.V. Kashtanova, E.M. Stakhneva, V.S. Shramko, E.V. Sadovski,
S.R. Ledovskikh, A.D. Khudyakova, Yu.I. Ragino

THE EFFECT OF ABDOMINAL OBESITY ON THE LEVEL OF INFLAMMATORY MARKERS IN YOUNG PEOPLE WITH HYPERTENSION

Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (IIPM – Branch of IC&G SB RAS) 630089, Novosibirsk, B. Bogatkova str., 175/1

Objective: to investigate pro- and anti-inflammatory blood markers in young people with arterial hypertension (AH) against the background of abdominal obesity (AO).

Materials and methods: the study included 530 people, including 267 people with hypertension, of which 169 were with AO. In the control group (without AH) there were 263 people comparable in gender and age, with AO - 106 people. The content of TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1 (monocytic chemoattractant protein), PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), IL-10, IL-17a, IL-17e, IL-17f were determined in all blood by multiplex analysis. Statistical processing was carried out in the SPSS 13.0 program.

Results: The level of IL-17a was 1.64 times higher in patients with hypertension ($p < 0.05$) compared to the control. The level of IL-6 in patients with hypertension was higher ($p < 0.0001$) by 52.91% compared to the group without hypertension. There was no difference between the control and the group with hypertension for the remaining biomarkers. The influence of AO on the level of the studied markers in the control group was not revealed. In the group with AH, a significantly

higher level of PAI-1 ($p < 0.05$) was in the subgroup with AO. For subgroups with AO, the difference between patients without AH and with AH was manifested in a decrease in IL-17e and an increase in IL-6 in patients with AH ($p < 0.05$). No statistically significant difference was found for the remaining indicators. The relative chance of early hypertension was associated with the presence of AO and an increase in the level of IL-6.

Conclusion: From the markers of inflammation studied by us, an increased level of IL-6 and IL-17a can serve as potential biomarkers indicating a high probability of developing early hypertension in people under 45 years of age.

Keywords: abdominal obesity, markers of inflammation, early arterial hypertension.

Введение

Артериальная гипертензия (АГ) – это один из главных факторов сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Даже редкие эпизоды повышения артериального давления приводят к сердечно-сосудистым осложнениям независимо от возраста [1, 2, 3]. По данным ЭССЕ-РФ, распространенность АГ среди взрослого населения России достигает 44,2 % [4]. Важным фактором, который коррелирует с повышением артериального давления, является ожирение, прежде всего, абдоминальное. Распространенность АО в России достигает 55 %, высок процент молодых людей с АО [5; 6; 7]. Сочетание АО с артериальной гипертензией может способствовать прогрессированию ССЗ, прежде всего, за счет воспалительных реакций. Патологические процессы, лежащие в основе влияния ожирения на развитие артериальной гипертензии в возрасте до 45 лет, не достаточно изучены. Учитывая влияние ожирения на здоровье человека в целом и то, что ранняя диагностика позволяет вовремя провести профилактику и эффективное лечение столь распространенного заболевания, целью нашей работы было исследовать цитокиновый профиль крови у молодых людей с ранней АГ, в том числе на фоне АО, для выявления потенциальных биомаркеров, которые позволяют диагностировать возможность развития АГ в молодом возрасте.

Материалы и методы

Исследование провели на выборке из популяционного скрининга молодых жителей (возраст 25-44 года) города Новосибирска, которое проводилось в НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН. Из 1512 человек, которые участвовали в скрининге, были отобраны 530 человек, заполнивших анкеты и информационное согласие на участие в исследовании, которые прошли антропометрические и инструментальные исследования и у которых был забран биологический материал. В основную группу (267 человек) вошли все пациенты с впервые выявленной артериальной гипертензией. Диагноз ставился при среднем систолическом давлении больше 140 мм рт. ст. и/или диастолическом больше 90 мм рт. ст., согласно клиническим рекомендациям «Артериальная гипертензия у взрослых», утвержденным Минздравом

России в 2020 году [8]. В основную группу вошли 183 мужчины и 84 женщины, средний возраст которых составил $39,18 \pm 5,36$ года, систолическое давление в среднем составило $142,16 \pm 14,19$ мм рт. ст., диастолическое давление – $95,83 \pm 7,65$ мм рт. ст. Среди пациентов основной группы было 169 человек с абдоминальным ожирением, которое регистрировали при окружности талии более 80 см у женщин и более 94 см у мужчин. В контрольную группу случайным образом были отобраны 263 человека, 183 мужчины и 80 женщин, сопоставимых с основной группой по возрасту ($38,93 \pm 5,48$ лет) и полу, с уровнем систолического давления меньше 140 мм рт. ст. и диастолического меньше 90 мм рт.ст., средний уровень давления у лиц контрольной группы составил: систолическое – $118,48 \pm 9,87$ мм рт. ст.; диастолическое – $77,7 \pm 7,53$ мм рт. ст.

Забор крови для биохимического исследования проводился утром натощак из локтевой вены не ранее, чем через 12 часов после последнего приема пищи. Определение фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкина-6 (ИЛ-6), ИЛ-8, моноцитарного хемоатрактантного протеина-1 (MCP-1), ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), ИЛ-10, ИЛ-17a, ИЛ-17e, ИЛ-17f проводили методом мультиплексного анализа с использованием набора HCYTMAG-60K-PX41 (EMD Millipore Corporation, Германия) на проточном цитометре Luminex 20 MAGPIX. Для статистической обработки результатов использовалась программа SPSS 13.0. Проверка на нормальность распределения осуществлялась методом Колмогорова-Смирнова. Анамнестические данные в тексте представлены в виде среднего $\pm$ стандартного отклонения. Количественные признаки представлены в виде медианы (Me), 25 и 75 перцентилей (Q25 %; Q75 %). Группы сравнивались по критерию Манну-Уитни. Коэффициент Спирмена использован при корреляционном анализе. Для выявления ассоциативных связей артериальной гипертензии с изучаемыми показателями был проведен многофакторный логистический регрессионный анализ. Статистическую значимость принимали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Концентрации ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-8, MCP-1, PAI-1, ИЛ-10, ИЛ-17a, ИЛ-17e, ИЛ-17f в сыворотке крови ос-

новой и контрольной групп представлены в табл. 1. При сравнении изучаемых показателей в исследуемых группах были получены статистически значимые различия для ИЛ-6 и ИЛ-17а.

Уровень провоспалительного цитокина ИЛ-6 у пациентов с АГ был выше ($p < 0,0001$) на 52,91 % по сравнению с группой без гипертензии. Концентрация ИЛ-10, являющегося одним из основных ингибиторов синтеза противовоспалительных цитокинов, между группами не отличалась. Коэффициент цитокинового отношения ИЛ-6/ИЛ-10, отражающий дисфункцию иммунной защиты и выраженность воспалительного процесса на доклинических стадиях развития заболевания у пациентов с гипертензией, был выше в 1,7 раза, что согласуется с данными Сурановой Г.Ж. и др. [9]

Важная роль в прогрессировании гипертензии принадлежит ИЛ-17, который имеет несколько изоформ. Мы изучали наиболее распространенные ИЛ-17а, ИЛ-17е и ИЛ-17ф. Уровень ИЛ-17а, который уменьшает NO-зависимую вазодилатацию, участвует в ремоделировании сосудов и способствует повышению артериального давления, был выше у пациентов с гипертензией в 1,64 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Наши данные согласуются с результатами других авторов [10, 11]. Концентрации ИЛ-17е и ИЛ-17ф между группами не отличались.

Несмотря на то, что ряд авторов указывали на увеличение концентрации ИЛ-8 у пациентов с гипертензией [12], в нашем исследовании разницы между контролем и группой с АГ по данному показателю выявлено не было, что может быть связано с более молодой выборкой пациентов в нашем исследовании. Литературные данные по разнице концентраций ФНО- α у пациентов с гипертензией и без гипертензии противоречивы [12; 13]. В нашем исследовании уровни ФНО- α между группами не отличались.

Далее мы рассмотрели уровни изучаемых биомолекул в зависимости от наличия абдоминального ожирения (табл. 2). Влияния АО на уровень изучаемых маркеров в контрольной группе выявлено не было. В группе с АГ значимо более высокий уровень PAI-1 ($p < 0,05$) был в подгруппе с АО. Ингибитор активатора плазминогена-1 способствует прикреплению липоцитов к межклеточным структурам, он снижает активность антигемостатических механизмов сосудистой стенки и плазмы. Это сочетается с продукцией адипоцитами фибриногена и других протромботических регуляторов и может способствовать АГ. По данным Boe A.E. et al., фармакологическое ингибирование PAI-1 защищает от развития гипертензии, гипертрофии сердца и периаортального фиброза у мышей с ингибированием синтазы оксида азота [14]. В нашем случае PAI-1 оказался самым высоким у пациентов с наличием АГ и АО, что указывает на значимость этого показателя в развитии АГ и согласуется с данными Boe A.E. et al.

Для подгрупп с АО разница между пациентами без АГ и с АГ проявилась в снижении уровня ИЛ-17е и повышении уровня ИЛ-6 у пациентов с АГ ($p < 0,05$). Для остальных показателей статистически значимой разницы не выявлено.

При проведении корреляционного анализа для оценки связи изучаемых биомаркеров с параметрами, характеризующими артериальную гипертензию, была выявлена связь показателей систолического давления с ФНО- α ($r = 0,08$; $p = 0,16$), ИЛ-6 ($r = 0,28$; $p = 0,0001$), MCP-1 ($r = 0,134$; $p = 0,0001$), PAI-1 ($r = 0,241$; $p = 0,0001$) и с окружностью талии ($r = 0,485$; $p = 0,0001$); показателей диастолического давления с ФНО- α ($r = 0,091$; $p = 0,006$), ИЛ-6 ($r = 0,312$; $p = 0,0001$), MCP-1 ($r = 0,138$; $p = 0,0001$), ($r = 0,227$; $p = 0,0001$) и с окружностью талии ($r = 0,488$; $p = 0,0001$); выявлена слабая связь индекса массы тела с ИЛ-6 ($r = 0,18$; $p = 0,0001$), ФНО- α ($r = 0,132$; $p = 0,0001$) и PAI-1 ($r = 0,186$; $p = 0,0001$).

Таблица 1

Уровень исследуемых маркеров у молодых людей без и с артериальной гипертензией

Показатели	Без гипертензии	С гипертензией	p
	Q50 % [Q25 %; Q75 %]	Q50 % [Q25 %; Q75 %]	
ФНО- α , пкг/мл	21,66 [6,52; 27,6]	18,68 [5,04; 26,38]	0,082
ИЛ-6, пкг/мл	9,79 [4,34; 16,38]	14,97 [7,41; 21,51]	<0,0001
ИЛ-8, пкг/мл	7,77 [5,66; 12,62]	8,62 [5,51; 12,62]	0,928
MCP-1, пкг/мл	506,81 [276,28; 687,67]	495,64 [222,34; 707,19]	0,659
PAI-1, мкг/мл	1,85 [0,04; 2,32]	1,99 [0,03; 2,38]	0,247
ИЛ-10, пкг/мл	1,14 [0,76; 2,01]	1,01 [0,52; 1,89]	0,27
ИЛ-17а, пкг/мл	1,56 [1,21; 1,75]	2,56 [1,85; 3,01]	0,022
ИЛ-17е, пкг/мл	190,21 [186,23; 415,24]	193,41 [124,06; 277,2]	0,186
ИЛ-17ф, пкг/мл	6,62 [3,55; 12,79]	6,72 [2,19; 10,58]	0,82

**Уровень адипокинов у молодых людей без и с артериальной гипертензией
в зависимости от наличия или отсутствия абдоминального ожирения**

Показатели	Наличие АО	Без гипертензии		С гипертензией		P3
		Q50 % [Q25 %; Q75 %]	P1	Q50 % [Q25 %; Q75 %]	P2	
ФНО-α, пкг/мл	без АО	21,27 [6,21; 26,69]	0,537	17,72 [4,0; 25,23]	0,087	0,032
	с АО	23,21 [6,56; 28,55]		19,51 [5,87; 27,05]		0,413
ИЛ-6, пкг/мл	без АО	8,5 [4,87; 13,38]	0,08	13,38 [10,26; 20,24]	0,282	0,000
	с АО	11,14 [3,95; 19,52]		15,49 [6,06; 23,08]		0,025
ИЛ-8, пкг/мл	без АО	9,06 [5,51; 13,32]	0,663	8,62 [4,87; 12,8]	0,764	0,751
	с АО	7,53 [6,39; 10,67]		8,47 [5,94; 12,23]		0,693
MCP-1, пкг/мл	без АО	494,7 [294; 690,27]	0,962	475,23 [208,24; 683,42]	0,365	0,33
	с АО	511,35 [251,22; 687,67]		516,61 [232,42; 723,87]		0,984
PAI-1, пкг/мл	без АО	1,81 [0,04; 2,18]	0,433	1,78 [0,029; 2,32]	0,041	0,76
	с АО	1,91 [0,03; 2,37]		2,1 [0,037; 2,42]		0,228
ИЛ-10 пкг/мл	без АО	1,18 [0,76; 1,87]	0,463	0,77 [0,49; 3,26]	0,849	0,396
	с АО	1,14 [0,82; 4,94]		1,01 [0,52; 1,89]		0,415
ИЛ-17а, пкг/мл	без АО	2,05 [1,11; 6,4]	0,151	2,78 [2,1; 4,18]	0,077	0,304
	с АО	1,56 [1,21; 1,57]		1,75 [0,97; 2,79]		0,213
ИЛ-17е, пкг/мл	без АО	193,21 [148,11; 445,63]	0,602	291,15 [152,19; 448,14]	0,154	0,865
	с АО	277,2 [193,21; 360,17]		165,35 [124,06; 193,21]		0,026
ИЛ-17f, пкг/мл	без АО	10,15 [4,94; 15,04]	0,057	12,36 [5,76; 19,12]	0,089	0,61
	с АО	3,57 [2,54; 6,31]		3,59 [2,15; 10,13]		0,693

Примечание: p1-уровень значимости между подгруппами с АО и без АО в группе без артериальной гипертензии; p2 - уровень значимости между подгруппами с АО и без АО в группе с артериальной гипертензией; p3 - уровень значимости между группами с и без артериальной гипертензией; PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена-1; MCP-1 – моноцитарно-хемоаттрактантный протеин.

Для оценки вероятности наличия артериальной гипертензии в молодом возрасте был проведен многофакторный логистический регрессионный анализ, где в качестве зависимой переменной было взято наличие/отсутствие ранней артериальной гипертензии, в качестве независимых – изучаемые биомолекулы и окружность талии как непрерывная величина. Относительный шанс наличия ранней АГ был ассоциирован с ИЛ-6 и окружностью талии. Шанс наличия артериальной гипертензии в молодом возрасте при повышении ИЛ-6 на 1 пкг/мл возрастает на 6 %. Уве-

личение окружности талии на 1 см повышает вероятность развития АГ у людей младше 45 лет на 5 %.

Закключение: таким образом, из изученных нами маркеров воспаления повышенные уровни ИЛ-6 и ИЛ-17а могут служить в качестве потенциальных биомаркеров, указывающих на высокую вероятность развития ранней АГ у людей до 45 лет. В целом исследования в этой области помогут создать аналитические модели, позволяющие путем определения ряда биомолекул выявлять среди трудоспособного населения пациентов с риском

развития АГ в молодом возрасте для дальнейшего проведения профилактических мероприятий, таких как коррекция модифицируемых факторов риска.

Информация о финансировании: работа выполнена в рамках государственного задания «Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их диагностике, профилактике и лечению», Рег. № 122031700094-5 и в рамках гранта РНФ №. 21-15-00022. В работе использовались материалы биобанка.

Информация о конфликте интересов: авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Ограничения: в данной статье представлено одномоментное исследование, для уточнения риска развития АГ в соответствии с изучаемыми биомаркерами требуется дальнейшее проспективное наблюдение за обследованными.

Список литературы / References

1. Кисляк О.А. Лечение артериальной гипертензии у пациентов с высоким сердечно-сосудистым риском в свете современных рекомендаций и результатов наблюдательных исследований // Кардиология. – 2015. – 55 (5). – с. 95-99.

Kislyak O.A. [Treatment of hypertension in patients with high cardiovascular risk in light of current guidelines and the results of observational studies] //Kardiology, 2015, 55 (5), c.95-99. Russian.

2. Benjamin E.J., Blaha M.J., Chiuve S.E., Cushman M., Das S.R., Deo R., de Ferranti S.D., Floyd J., Fornage M., Gillespie C., Isasi C.R., Jiménez M.C., Jordan L.C., Judd S.E., Lackland D., Lichtman J.H., Lisabeth L., Liu S., Longenecker C.T., Mackey R.H., Matsushita K., Mozaffarian D., Mussolino M.E., Nasir K., Neumar R.W., Palaniappan L., Pandey D.K., Thiagarajan R.R., Reeves M.J., Ritchey M., Rodriguez C.J., Roth G.A., Rosamond W.D., Sasson C., Towfighi A., Tsao C.W., Turner M.B., Virani S.S., Voeks J.H., Willey J.Z., Wilkins J.T., Wu J.H., Alger H.M., Wong S.S., Muntner P. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association// Circulation. 2017, 135(10): e146-e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485.

3. O'Neill S, O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev*. 2015 Jan;16(1):1-12. doi: 10.1111/obr.12229. Epub 2014 Nov 18. PMID: 25407540.

4. Баланова Ю.А., Шальнова С.А., Имаева А.Э., Капустина А.В., Муромцева Г.А., Евстифеева С.Е., Тарасов В.И., Редько А.Н., Викторова И.А., Прищепа Н.Н., Якушин С.С., Бойцов С.А., Драпкина О.М., Константинов В.В., Покровская М.С., Ефимова И.А., Сивакова О.В., Алексеенко С.Н., Губарев С.В., Ливзан М.А., Журавлева И.А., Рожкова М.Ю., Везикова Н.Н., Скопец И.С., Фи-

липпов Е.В., Добрынина Н.В., Никулина Н.Н., Переверзева К.Г., Мосейчук К.А. Распространенность артериальной гипертензии, охват лечением и его эффективность в Российской Федерации (данные наблюдательного исследования ЭССЕ-РФ-2) // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2019;14(5):450-466. doi:10.20996/1819-6446-2019-15-4-450-466.

Balanova YuA, Shalnova SA, Imaeva AE, et al. [Prevalence of arterial hypertension, treatment and its effectiveness in Russian Federation (The data of observational study ESSE-RF 2)]// The Rational Pharmacotherapy in Cardiology. 2019;14(5):450-466. doi:10.20996/1819-6446-2019-15-4-450-466Russian.

5. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension // Eur Heart J. 2018 Sep 1;39(33):3021-3104. doi: 10.1093/eurheartj/ehy339.

6. Жернакова Ю.В., Железнова Е.А., Чазова И.Е., Ощепкова Е.В., Долгушева Ю.А., Яровая Е.Б., Блинова Н.В., Орловский А.А., Коносова И.Д., Шальнова С.А., Ротарь О.П., Конради А.О., Шляхто Е.В., Бойцов С.А., Баланова Ю.А., Евстифеева С.Е., Капустина А.В., Константинов В.В., Муромцева Г.А., Оганов Р.Г., Мамедов М.Н. О. Распространенность абдоминального ожирения в субъектах Российской Федерации и его связь с социально-экономическим статусом, результаты эпидемиологического исследования ЭССЕ-РФ // Терапевтический архив. 2018;90(10):14-22. doi:10.26442/terarkh2018901014-22.

Zhernakova YuV, Zheleznova EA, Chazova IE, Oshchepkova E.V., Yu.A. Dolgusheva1, Yarovaya E.B., Blinova N.V., Orlovsky A.A., Konosova I.D., Shalnova S.A., Rotar' O.P., Konradi A.O., Shlyakhto E.V., Boytsov S.A. [The prevalence of abdominal obesity in the constituent entities of the Russian Federation and its relationship with socio-economic status, results of an epidemiological study ESSE-RF]// Therapeutic archive. 2018;90(10):14-22. In Russian.

7. Воевода М.И., Ковалькова Н.А., Рагино Ю.И., Травникова Н.Ю., Денисова Д.В. Распространенность компонентов метаболического синдрома у лиц молодого возраста // Атеросклероз. 2015;11(4):56-61.

Voevoda M.I., Kovalkova N.A., Ragino Yu.I., Travnikova N.Yu., Denisova D.V. [Prevalence of metabolic syndrome components in young adults] //Atherosclerosis. 2015;11(4):56-61. In Russian.

8. Кобалава Ж.Д., Конради А.О., Недогода С.В., Шляхто Е.В., Арутюнов Г.П., Баранова Е.И., Барбараш О.Л., Бойцов С.А., Вавилова Т.В., Виллевалде С.В., Галявич А.С., Глезер М.Г., Гринева Е.Н., Гринштейн Ю.И., Драпкина О.М., Жернакова Ю.В., Звартау Н.Э., Кисляк О.А., Козиолова Н.А., Космачева Е.Д., Котовская Ю.В., Либис Р.А., Лопатин Ю.М., Небиеридзе Д.В., Недошвин А.О., Остроумова О.Д., Ощепкова Е.В., Ратова Л.Г., Скибицкий В.В., Ткачева О.Н., Чазова И.Е., Чесникова А.И., Чумакова Г.А., Шальнова С.А., Шестакова М.В., Якушин С.С., Янишевский С.Н. Артериальная гипертензия у взрослых. Клинические рекомендации

Kobalava Z.D., Konradi A.O., Nedogoda S.V., Shlyakhto E.V., Arutyunov G.P., Baranova E.I., Barbarash O.L., Boitsov S.A., Vavilova T.V., Villevalde S.V., Galyavich A.S., Glezer M.G., Grineva E.N., Grinstein Yu.I., Drapkina O.M., Zhernakova Yu.V., Zvartau N.E., Kislyak O.A., Koziolova N.A., Kosmacheva E.D., Kotovskaya Yu.V., Libis R.A., Lopatin Yu.M., Nebiridze D.V., Nedoshivin A.O., Ostroumova O.D., Oschepkova E.V., Ratova L.G., Skibitsky V.V., Tkacheva O.N., Chazova I.E., Chesnikova A.I., Chumakova G.A., Shalnova S.A., Shestakova M.V., Yakushin S.S., Yanishevsky S.N. [Arterial hypertension in adults. Clinical guidelines 2020]// Russian Journal of Cardiology. 2020;25(3):3786. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2020-3-3786> In Russian

9. Суранова Г.Ж., Майназарова Э.С., Тухватшин Р.Р. Анализ уровней цитокинов у больных атеросклерозом периферических сосудов в условиях техногенного загрязнения // Русский медицинский журнал. – 2018;11(1):27-30.

Suranova G.Zh., Maynazarova E.S., Tuhvatshin R.R. [Analysis of cytokine levels in patients with atherosclerosis of peripheral vessels under conditions of technological pollution]// RMJ. 2018. № 11(1). P. 27–30. In Russian

10. Yao W., Sun Y., Wang X., Niu K. Elevated Serum Level of Interleukin 17 in a Population With Prehypertension.// J Clin Hypertens (Greenwich). 2015 Oct;17(10):770-4. doi: 10.1111/jch.12612.

11. I Q., Cheng G., Ma N., Huang Y., Lin Y., Zhou Q., Que B., Dong J., Zhou Y., Nie S. Circulating Th1, Th2, and Th17 Levels in Hypertensive Patients.//Dis Markers. 2017;2017:7146290. doi: 10.1155/2017/7146290.

12. Мишланов В.Ю., Владимирский В.Е., Сыромятникова Л.И., Половинкина Т.А., Мишланова С.Л. Сывороточные маркеры воспаления и липидвысвобождающая способность лейкоцитов у больных артериальной гипертензией и стенокардией напряжения // Клиническая медицина. – 2013. – Том. 91, № 11. – с. 34-38.

Mishlanov V.Yu., Vladimirsky V.E., Syromyatnikova L.I., Polovinkina T.A., Mishlanova S.L. [Serum markers of inflammation and lipid-releasing ability of leukocytes in patients with arterial hypertension and angina of effort] 2013., v. 91, №. 11, pp. 34-38. In Russian

13. Чукаева И.И., Ганковская Л.В., Орлова Н.В., Хавка Н.Н., Горяйнова С.В., Хорева М.В., Спирыкина Я.Г. Изучение цитокинового профиля у мужчин с артериальной гипертензией // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018;63 (7): 439-444. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-439-444>

Chukaeva I.I., Gankovskaya L.V., Orlova N.V., Havka N.N., Goryaynova S.V., Khoreva M.V., Spiryakina Ya.G. [Study of cytokine profile in men with hypertension].2018; 63 (7): 439-444 DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-7-439-444> In Russian

14. Boe A, Eren M, Murphy S, Kamide C, Ichimura A, Terry D et al. Plasminogen activator inhibitor-1 antagonist TM5441 attenuates Nω-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension and vascular senescence. Circulation. 2013; 128(21): 2318-24. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003192.

Сведения об авторах:

Полонская Яна Владимировна, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН), старший научный сотрудник лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: yana-polonskaya@yandex.ru; 630089 г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1; тел. 8(383)2679755.

Каштанова Елена Владимировна, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН), заведующая лабораторией клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний.

Стахнёва Екатерина Михайловна, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН), старший научный сотрудник лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний.

Шрамко Виктория Сергеевна, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН), научный сотрудник лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний.

Садовский Евгений Викторович, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН), младший научный сотрудник лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний.

Ледовских София Радиковна, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН), ординатор.

Худякова Алёна Дмитриевна, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН), заведующая лабораторией генетических и средовых детерминант жизненного цикла человека.

Рагино Юлия Игоревна, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научно-

го учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН), руководитель НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН, д.м.н., член-корр. РАН.

Автор для переписки

Полонская Яна Владимировна, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1; тел. 8 (383)2679755; e-mail: yana-polonskaya@yandex.ru.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ, ВЫЗВАННОМ ЛЕГКОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения России, 690002, Владивосток, пр. Острякова, 2

Резюме. Изучение иммунной реакции организма при легкой черепно-мозговой травме (лЧМТ) является актуальным этапом формирования научного представления о данном типе повреждения головного мозга. Цель исследования: изучить параметры системного иммунного ответа при экспериментальном моделировании лЧМТ. Оценен клеточный состав и фенотип субпопуляций иммунных клеток, и определено содержание про- и противовоспалительных цитокинов в ликворе и сыворотке крови травмированных крыс. Установлено высокое содержание лейкоцитов и интерлейкина 6 (ИЛ 6) в крови через 2 часа после травмы. Количество цитотоксических Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов повышалось при снижении числа нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и Т-хелперов через сутки после лЧМТ. В указанные сроки наблюдалось повышение содержания цитокинов ФНО α и ИЛ 6 в ликворе и сыворотке крови, а показатели противовоспалительного ИЛ 10 увеличивались через 7-14 суток после лЧМТ. На 14-е сутки после травмы уровень палочкоядерных нейтрофилов оставался низким, тогда как количество CD45, CD3, CD20 и CD8 позитивных лимфоцитов продолжал повышаться, что свидетельствует о прогрессировании воспалительной реакции. Таким образом, после нанесения лЧМТ разворачивается воспалительная реакция, сопровождаемая проявлением активности иммунных компонентов. В периферическом кровотоке и спинномозговой жидкости регистрируются цитокины, увеличивается количество В-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, сотрясение головного мозга, иммунитет, цитокины, интерлейкины, лимфоциты.

Образец цитирования: Радькова И.В., Плеховой Н.Г., Зиновьева С.В., Шуматова В.Б. Иммунный ответ при нейровоспалении, вызванном легкой черепно-мозговой травмой (экспериментальное исследование) // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 54-60.

IMMUNE RESPONSE IN NEUROINFLAMMATORY CAUSED BY MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY (EXPERIMENTAL STUDY)

Pacific State Medical University, 690002, Vladivostok, Ostryakov Ave. 2

Summary. The study of the organism immune response in mild traumatic brain injury (mTBI) is an important stage in the formation of a scientific understanding of this type of brain damage. The purpose of the study: to research the systemic immune response parameters in the experimental modeling of mTBI. The cellular composition and phenotype of immune cell subpopulations were assessed, and the content of pro- and anti-inflammatory cytokines in the mTBI and blood serum of injured rats was determined. A high content of leukocytes and interleukin 6 (IL 6) in the blood was found 2 hours after the injury. The number of cytotoxic T-lymphocytes and B-lymphocytes increased with a decrease of the neutrophils, monocytes, eosinophils and T helpers number one day after mTBI. During the indicated periods of observation, an increase in the content of cytokines TNF α and IL 6 in the cerebrospinal fluid and blood serum was observed, and the indicators of anti-inflammatory IL 10 increased 7-14 days after mTBI. On the 14th day after injury, the level of stab neutrophils remained low, while the number of CD45, CD3, CD20, and CD8 positive lymphocytes continued to increase, which indicates the progression of the inflammatory response. Thus, after the application of mTBI, an inflammatory reaction develops, accompanied by the manifestation of the activity of immune components. Cytokines are registered in the peripheral circulation and cerebrospinal fluid, the number of B-lymphocytes and cytotoxic T-lymphocytes increases.

Key words: traumatic brain injury, concussion, immunity, cytokines, interleukins, lymphocytes.

Сотрясение при легкой черепно-мозговой травме (лЧМТ) запускает каскад биомолекулярных изменений в головном мозге, инициирующих реакцию иммунных клеток [1, 8, 13]. На экспериментальных моделях показано, что нейровоспаление в головном мозге при лЧМТ включает активацию иммунных (особенно микроглии) и неиммунных клеток и продукцию ими различных медиаторов, включая цитокины [6, 12]. Инфильтрация цитотоксическими Т-лимфоцитами и нейтрофилами очага повреждения головного мозга отмечается до 24 часов, а повышение содержания макрофагов микроглии через 7 дней после травмы. В крови экспериментальных животных в острый период (2-3-и сут. после травмы) снижается уровень CD3 позитивных Т-лимфоцитов и Т-хелперов, в то время как показатели цитотоксических (CD8+) и В-лимфоцитов повышаются [2]. Адаптивный иммунитет включает каскадную активацию и экспансию Т- и/или В-лимфоцитов, нацеленных на специфические антигены, в том числе белки нервной ткани, формируя память о предыдущем воздействии антигена, позволяющую целенаправленно, интенсивно и быстро реагировать на будущие стимулирующие вызовы [12, 15, 16]. Показана периферическая активация Т-клеток, а именно повышение количества цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов через 3 дня после интрацеребральной инъекции белков нервной ткани и наличие аутореактивных Т-клеток при травмах центральной нервной системы [9].

При повреждении головного мозга происходит выделение клетками патоген-ассоциированных молекул (DAMPs), связывание которых с Toll-подобными рецепторами приводит к активации микроглии и ее резидентных макрофагов. В нервной ткани отмечается синтез этими клетками интерлейкинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6) и фактора некроза опухоли ФНО α , а астроцитами – ИЛ 1 β [4]. Однако воспаление не ограничивается изменениями клеток нервной ткани, и установлено, что в сыворотке крови травмированных мышей отмеченное повышение содержания ИЛ 6 коррелирует со степенью тяжести ЧМТ [5]. Помимо немедленного иммунного ответа, через несколько дней после травмы повышается количество маркирующих воспаление белков, таких как хемокины (Ccl2 и Ccl7), белки острой фазы (липокалин-2) и тканевой ингибитор металлопротеиназы 1, причем ненормированные показатели некоторых из них сохраняются до месяца [3]. Провоспалительный цитокин, интерлейкин-1 β (ИЛ 1 β), участвует в сохранении иммунных реакций при различных заболеваниях центральной нервной системы, начиная от рассеянного склероза, нейродегенеративных заболеваний, черепно-мозговой травмы и диабетической ретинопатии [11]. Тогда как наиболее распространенными цитокинами, связанными

с неблагоприятными психологическими исходами, пост-травматическим стрессовым расстройством и/или депрессией у пациентов после лЧМТ были названы цитокины ИЛ 6, ИЛ 10 и ФНО α , а также С-реактивный белок [10]. Таким образом, для понимания взаимосвязи между воспалением и развитием патологических изменений нервной ткани после нанесения лЧМТ необходимы исследования состояния иммунного компонента для уточнения степени участия защитных факторов. Исходя из вышеизложенного, целью исследования являлось изучение параметров системного иммунного ответа при экспериментальном моделировании легкой ЧМТ.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на половозрелых крысах-самцах Wistar (200-250 г) в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и рекомендациями Директивы Европейского сообщества (86/609 Г.С), дизайн исследования одобрен междисциплинарным этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (№ 3 от 20.09.2017 г.). Для воспроизведения лЧМТ и травмы средней степени тяжести использовали модифицированную нами модель падающего груза, адаптированную для взрослых крыс [3]. Данный способ позволяет воссоздать закрытую травму головного мозга различной степени, возникающую под действием комбинированных сил ударного, трансляционного ускорения и его замедления в результате вращения головы с минимальным контактным воздействием с ударным компонентом. Для общего наркоза крыс применяли золетил (0,003 мг/г, Virbac, Франция), ксиланит (0,008 мг/г, ЗАО «НИТА-ФАРМ», Россия), раствор атропина сульфата (0,1 % – 0.01 мл на 100 г).

Изучали лейкоцитарный профиль и субпопуляции лимфоцитов крови животных в острый период травмы (2 ч., 1-е, 2-е, 3-и, 7-е и 14-е сут. после нанесения лЧМТ). Клинический анализ крови включал определение абсолютного количества лейкоцитов с вычислением лейкоцитарной формулы. Оценку системного иммунитета проводили с выявлением различных субпопуляций лимфоцитов и цитокинов. Мононуклеарные клетки крови животных окрашивали в соответствии со стандартными протоколами и инструкциями производителя коктейлем для выявления различных популяций, включающем специфические для крыс моноклональные антитела PE Mouse Anti-Rat CD3, PE Mouse Anti-Rat CD4, FITC Mouse Anti-Rat CD8b, FITC Mouse Anti-Rat CD11b/c, и PE-Cy™7 Mouse Anti-Rat CD45 (BD Biosciences, США). Субпопуляции клеток определяли методом мультицветной проточной цитометрии, используя автоматический анализатор проточный цитофлуориметр MACSQuant TM Analyzer 10 (Miltenyi Biotec GmbH,

Германия), оснащенный тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Данные анализировали, набирая не менее 30000 лейкоцитов в образце. Популяция CD45-PE-CyTM7 меченых лимфоцитов гейтировалась с использованием флуоресцентного канала 720 нм и параметра бокового светорассеяния (SSC). Соответственно, двухпараметровые дот-плоты были созданы для оценки процентного содержания CD3-PE, CD4-PE, CD8-FITC и CD11b-FITC. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ MACS QuantifyTM Software v.2.5 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) и KaluzaTM v.1.2 (Beckman Coulter, США).

С помощью метода иммуноферментного твердофазного анализа с применением двух типов моноклональных антител определяли в спинномозговой жидкости и сыворотке крови животных концентрацию цитокинов ФНО α , интерлейкинов 6 и 10. Использовали специфичные для крыс наборы Rat IL-1 beta/IL-1F2, Rat IL-6, Rat IL-10 и Rat TNF-alpha DuoSet ELISA (R&Dsystems, Англия), которые содержали основные компоненты, необходимые для проведения сэндвич-метода. Оптическую плотность раствора в каждой лунке измеряли с помощью спектрофотометра Multiskan Sky Microplate (Termo Fisher, США) при длине волны 450 нм с коррекцией значений 540 нм или 570 нм.

Статистический анализ результатов проводили с помощью Statistica 6.0 (StatSoft, США). В случае нормального распределения значения представлены

как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm m$), а данные по группам проанализированы с помощью t-критерия Стьюдента (ненаправленного) и Ньюмана-Кейлса для множественных сравнений. Для корреляции признаков использовали линейный регрессионный анализ с вычислением критерия Пирсона. Различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Отмечено повышение содержания общей популяции лейкоцитов крови через 2 часа после нанесения травмы, которое в остальные сроки наблюдения снижалось до значения для здоровых животных ($6,5 \pm 0,21 \times 10^9$ кл/Л, табл. 1). Также через 2 ч. после лЧМТ достоверно повышались показатели количества нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов, что свидетельствовало об активации иммунной системы в ответ на полученную травму. Через 24 ч. эти показатели достоверно снижались, и пик истощения иммунного ответа был зарегистрирован к концу первой недели после ЧМТ (7-е сут.), однако количество эозинофилов было незначительно выше, чем в контрольной группе. К концу 2-й недели показатели достигли контрольных цифр, однако количество незрелых форм нейтрофилов снизилось до 0. Выявлена прямая корреляция между уровнем нейтрофилов и моноцитов, коэффициент Спирмена составил 0,76, связь по шкале Чеддока высокая.

Таблица 1

Показатели содержания популяций клеток в крови крыс

Индикаторы	Контроль (n=10)	Крысы после лЧМТ				
		2 ч. (n=5)	1-е сут. (n=5)	2-е сут. (n=5)	7-е сут. (n=5)	14-е сут. (n=5)
Лейкоциты, $\times 10^9$ /Л	$6,5 \pm 0,21$	$12,7 \pm 0,21$	$6,5 \pm 0,21$	$6,5 \pm 0,21$	$6,5 \pm 0,21$	$6,5 \pm 0,21$
Нейтрофилы, %	$39,1 \pm 0,96$	$59,2 \pm 1,02$	$28,3 \pm 2,5$	$18,7 \pm 1,7$	$34,5 \pm 2,5$	$36,4 \pm 3,3$
Палочкоядерные, %	$1,9 \pm 0,07$	$1,8 \pm 0,09$	$0,9 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,007$	$0,9 \pm 0,03$	0
Сегментоядерные, %	$37,2 \pm 2,93$	$57,2 \pm 4,2$	$27,6 \pm 2,5$	$17,5 \pm 1,2$	$33,6 \pm 3,1$	$36,4 \pm 3,1$
Эозинофилы, %	$2,37 \pm 0,258$	$3,9 \pm 0,21$	$1,8 \pm 0,7$	$1,68 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,21$	$2,3 \pm 0,5$
Моноциты, %	$2,8 \pm 0,33$	$3,2 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,04$	$2,6 \pm 0,5$
CD45+, %	$75,2 \pm 5,8$	$73,1 \pm 4,8$	$68,1 \pm 1,2$	$78,1 \pm 6,8$	$77,8 \pm 6,1$	$81,2 \pm 6,4$
CD3+, %	$44,3 \pm 1,9$	$41,1 \pm 3,7$	$39 \pm 1,2$	$58 \pm 4,2^*$	$62 \pm 4,9^*$	$68 \pm 7,2^*$
CD3+CD4+, %	$29,5 \pm 2,1$	$28,7 \pm 2,7$	$27,9 \pm 2,4$	$25,4 \pm 1,8$	$18,3 \pm 1,7^*$	$16,7 \pm 1,9^*$
CD3+CD8+, %	$18,5 \pm 0,9$	$22,5 \pm 1,6$	$19,6 \pm 1,2$	$19,8 \pm 1,9$	$39,7 \pm 2,9^*$	$41,3 \pm 1,9^*$
CD20+, %	$12,6 \pm 1,8$	$11,8 \pm 1,5$	$14,7 \pm 1,2$	$16,2 \pm 1,4$	$26,5 \pm 1,7$	$32,5 \pm 1,6$
CD16+, %	$8,3 \pm 0,8$	$19,3 \pm 1,8^*$	$21,2 \pm 1,8^*$	$18,2 \pm 1,3^*$	$10,1 \pm 1,1$	$12,1 \pm 1,4$
CD14+ %	$6,7 \pm 0,7$	$4,9 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,6$

Примечание: * значения достоверны по сравнению с показателями интактных животных, $p < 0,05$.

В крови травмированных крыс определено незначительное увеличение количества CD45+ клеток по сравнению со здоровыми животными (табл. 1). Определено, что количество Т-клеток (CD3+) уменьшилось через 1 сут. после травмы, затем увеличилось к концу 2-й недели. Содержание Т-хелперов (CD4+) снижалось до $16,7 \pm 1,9$ % (14 сут.), в то время как число цитотоксических Т-клеток (CD8+), напротив, повышалось с $22,5 \pm 1,6$ % (2 ч.) до $41,3 \pm 1,9$ % (14 сут.) соответственно. Корреляционный анализ с вычислением коэффициента Спирмена (ρ) показал, что повышение количества нейтрофилов достоверно сопровождается экспрессией на клетках антигена CD 14 ($\rho=0,814$), что указывает на превалирование зрелой формы этих клеток (рис. 1). Увеличение же количества незрелых форм нейтрофилов достоверно сопровождалось повышением в кровотоке уровня CD3+CD4+ лимфоцитов ($\rho=0,9$), которое коррелировало с повышением количества моноцитов ($\rho=0,671$). Корреляционный анализ свидетельствует о том, что именно моноциты и незрелые формы нейтрофилов имели наибольшую сопряженность с показателями содержания CD3+CD4+ Т-хелперов в кровотоке. Тогда как количество CD3+, CD45+, цитотоксических CD3+CD8+ Т-клеток и CD20+ В-лимфоцитов достоверно снижалось на фоне повышения количества незрелых форм нейтрофилов. Также отмечалось достоверное повышение количества макрофагов на фоне снижения содержания CD3+,

CD45+, CD20+ лимфоцитов ($p<0.05$, табл. 1). Таким образом, стимуляция иммунитета и приход незрелых форм клеток при активации моноцитов оказывает влияние на содержание различных популяций лимфоцитов. Важно отметить, что на 14-й день травмы уровни экспрессии лимфоцитами антигенов CD45+, CD3+, CD3+CD8+, CD20+ имели тенденцию к нарастанию, тогда как общий клеточный профиль приближался к контрольным значениям.

Известно, что резидентные макрофаги М1 типа выделяют провоспалительные цитокины – ФНО α и ИЛ 6, которые могут инициировать приток к очагу повреждения Т- и В-лимфоцитов из периферического кровотока. По данным разных исследований, функция ИЛ 6 может меняться в зависимости от посттравматического периода и оказывает регуляторное влияние путем ингибирования синтеза ФНО α . Противовоспалительный интерлейкин 10, который вырабатывают преимущественно макрофаги М2 типа, активирует нейропротективные функции микроглии. Нами установлено, что через 2 ч после лЧМТ показатели провоспалительного ИЛ 6 в сыворотке повышались и оставались на этом уровне до конца 1-х сут. (табл. 2, $45,6 \pm 2,03$ пг/мл), тогда как на второй день отмечалось его снижение ($21,28 \pm 1,2$ пг/мл). Максимальный уровень отмечен на 7-е сут. ($69,38 \pm 2,5$ пг/мл) при последующем снижении к 14 сут. наблюдения. Количество ИЛ 10 в сыворотке крови через 2 ч. после травмы повышалось до $7,82 \pm 0,49$

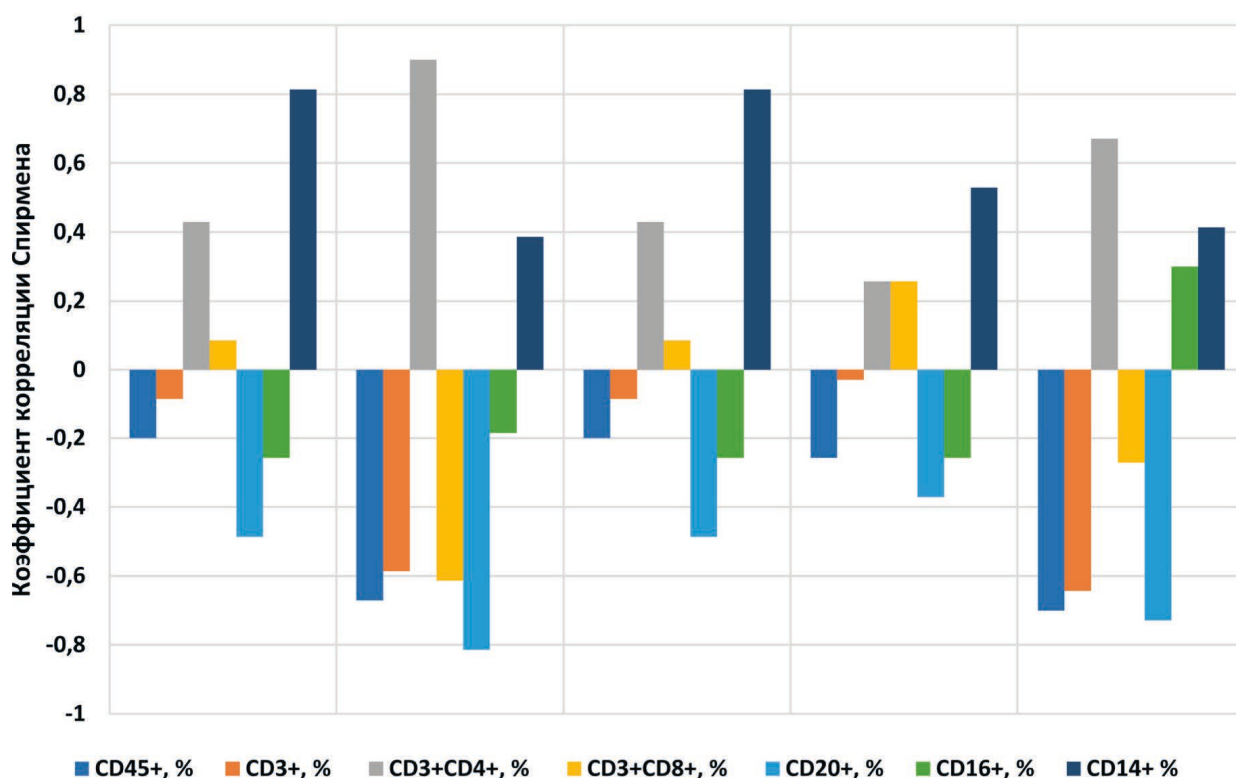


Рис. 1. Корреляция между показателями рецепторов, экспрессируемых на иммунных клетках, и количеством лейкоцитов в крови травмированных животных

Показатели уровня интерлейкинов в ликворе и сыворотке крови животных

	ФНО α в ликворе, пг/мл	ФНО α в сыворотке крови, пг/мл	ИЛ 10 в сыворотке крови, пг/мл	ИЛ 6 в сыворотке крови, пг/мл
Здоровые животные	21$\pm$0,76	14,7$\pm$0,49	0	0
Легкая черепно-мозговая травма				
2 часа	8,7 $\pm$ 0,27	17,87 $\pm$ 0,52	7,82 $\pm$ 0,49	34,27 $\pm$ 1,83
1 сутки	139 $\pm$ 5,12	41,8 $\pm$ 1,99	5,74 $\pm$ 0,36	45,6 $\pm$ 2,03
2 суток	105,26 $\pm$ 3,45	20,47 $\pm$ 1,1	18,12 $\pm$ 1,14	21,28 $\pm$ 1,2
7 суток	66,3 $\pm$ 3,06	16,28 $\pm$ 0,44	26,06 $\pm$ 1,58	69,38 $\pm$ 2,5
14 суток	72,3 $\pm$ 2,22	109,29 $\pm$ 0,96	0	38,78 $\pm$ 1,1
Черепно-мозговая травма средней степени тяжести				
2 часа	9,89 $\pm$ 0,44	7,28 $\pm$ 0,16	0	54,35 $\pm$ 1,46
1 сутки	62,35 $\pm$ 2,38	40,4 $\pm$ 1,99	0	25,31 $\pm$ 1,25
7 суток	48,4 $\pm$ 1,5	12,26 $\pm$ 0,38	5,83 $\pm$ 0,36	47,67 $\pm$ 2,07

Примечание: значения достоверны по сравнению с показателями интактных животных, $p < 0.05$.

пг/мл при дальнейшем нарастании до 26,06 $\pm$ 1,58 пг/мл к концу первой недели, причем на 14-е сут. этот цитокин не зарегистрирован. Таким образом, отмечается картина проградияльного увеличения и последующего истощения продукции клетками ИЛ 10 у травмированных крыс.

Уровень ФНО α в ликворе резко повышался в первый день после нанесения лЧМТ (табл. 2, 139 $\pm$ 5,12 пг/мл), затем снижался до 66,3 $\pm$ 3,06 пг/мл (7 сут.), оставаясь достоверно выше показателей здоровых животных ($p < 0.05$). В сыворотке крови ФНО α через 1 сут. травмы также резко повышался, но оставался ниже уровня в ликворе (41,8 $\pm$ 1,99 пг/мл). Затем следовало снижение до 16,28 $\pm$ 0,44 пг/мл на 7-е сут. и резкое повышение до 109,3 $\pm$ 0,96 пг/мл на 14 сут. Выявлена сильная корреляция между показателями ФНО α в ликворе и сыворотке крови ($r = 0.657$). Не обнаружено связи между уровнем ФНО α в сыворотке и уровнем ИЛ 10 ($r = -0.214$), и ИЛ 6 в сыворотке крови ($r = 0.314$) и между уровнем ИЛ 6 и ИЛ 10 ($r = 0.414$). Однако между уровнем ФНО α и ИЛ 6 в сыворотке в сочетании со значениями для здоровых животных через 2 ч. и 1 и 2 сут., связь показателей по шкале Чеддока была довольно высока ($r = 0,8$). На 7-е и 14-е сут. связь между этими параметрами была отрицательной, что указывало на ингибирующее влияние ИЛ 6 на уровень провоспалительного ФНО α , так как на 14-е сут. на фоне уменьшения показателей ИЛ 6 содержание ФНО α значительно увеличивалось. Данные изменения можно трактовать как вторичную воспалительную реакцию. Что касается уровня ФНО α в ликворе, то его корреляционной зависимости с уровнем ИЛ 6 в сыворотке не выявлено ($r = 0,4$). Также стоит отметить, что при снижении показателей противовоспа-

лительного цитокина ИЛ 10 на 14-е сутки повышается уровень ФНО α как в сыворотке, так и в ликворе.

При ЧМТ средней степени тяжести через 2 ч. уровень ИЛ 6 в сыворотке крови животных был значительно выше, чем при лЧМТ (табл. 2, $p < 0.05$), снижаясь к окончанию первых суток. Затем показатели этого цитокина повышались, оставаясь значимо ниже таковых при нанесении лЧМТ ($p < 0,05$). Содержание ФНО α в сыворотке крови при ЧМТ средней степени тяжести имело аналогичную динамику показателей, как при лЧМТ, а количество этого цитокина в ликворе было значимо ниже ($p < 0.05$). Степень корреляции между показателями ФНО α в ликворе и сыворотке крови при ЧМТ средней степени была выше, чем при лЧМТ ($r = 0,8$), также обнаружена высокая обратная связь между уровнем ФНО α и ИЛ 6 ($r = 0,8$), причем тенденция изменений и связи этих параметров при лЧМТ легкой и травме средней тяжести не отличалась. Не установлена связь между уровнем ФНО α и ИЛ 10, а также содержанием ИЛ 6 и ИЛ 10. Обнаружена слабая обратная связь между содержанием ФНО α в ликворе и ИЛ 6 в сыворотке ($r = 0,4$), что указывает на снижение ФНО α на фоне повышающегося уровня ИЛ 6. Таким образом, при моделировании лЧМТ и травмы средней степени изменение показателей цитокинов было аналогичным. Уровень ФНО α в ликворе при всех видах травмы был максимальным через сутки и проградияльно снижался ко 2-й неделе, что указывало на его появление в спинномозговой жидкости, связанное с ударным воздействием на головной мозг.

В настоящее время существует широкий спектр экспериментальных моделей лЧМТ, которые различаются по типу анатомии нанесенных повреждений

головного мозга. Нейтрофилы и Т-клетки инфильтрируют в очаг повреждения головного мозга при значительном повышении их содержания уже через 1 сут. после ЧМТ, но их роль в патогенезе нейровоспаления находится на стадии интенсивного изучения [7]. Показана сопряженность изменения показателей содержания различных цитокинов, в том числе ФНО α и ИЛ 6, при некоторых типах когнитивной дисфункции мышей при моделировании закрытой ЧМТ с повреждением аксонов на фоне отсутствия структурных повреждений головного мозга, гематоэнцефалического барьера или отека [8, 10]. Причем снижение количества активных клеток микроглии и нейтрофилов коррелирует с улучшением когнитивной функции крыс. Тем не менее остаются серьезные разногласия по поводу роли нейтрофилов и Т-клеток в развитии нейровоспаления, поскольку, в отличие от очаговых повреждений, эти клетки отсутствуют в случае традиционного моделирования неосложненной (неочаговой) лЧМТ [7]. Также аутореактивные Т-клетки могут оказывать защитное и в первую очередь противовоспалительное действие после повреждения [15].

Результаты нашего исследования доказывают наличие нейроиммунных патологических процессов, которые коррелируют с изменениями клеточных компонентов в кровотоке при экспериментальной ЧМТ. Первичный ответ на травму через сутки выражался в увеличении лейкоцитов, в том числе цитотоксических Т-лимфоцитов, тогда как количество остальных субпопуляций клеток уменьшалось. Этот процесс сопровождался зарегистрированным повышением в ликворе и периферическом кровотоке содержания провоспалительных цитокинов ФНО α и ИЛ 6. В совокупности эти данные указывают на инициацию нейровоспалительной реакции при нанесении лЧМТ, которая продолжает нарастать через 2 сут., когда у травмированных животных отмечается значимое снижение количества нейтрофилов, особенно незрелых форм, моноцитов и эозинофилов. На фоне изменения содержания клеток уровень ФНО α в ликворе и периферическом кровотоке начинает снижаться, тогда как содержание противовоспалительного, напротив, ИЛ 10 увеличивается. Через 7 и 14 сут. в кровотоке повышается количество цитотоксических CD3+CD8+ Т-лимфоцитов и ИЛ 6 и 10. При этом появляется тенденция к повторному увеличению ФНО α в ликворе и сыворотке, уровень которого возрастает к 14 сут. значительно, тогда как содержание ИЛ 6 и ИЛ 10 падает. Таким образом, к концу 2-й недели после ЧМТ воспалительная реакция не снижается, а появляются признаки ее повторного разветвления.

Финансирование работы. Работа выполнена при финансовой поддержке по программе внутривузовских грантов ФГБОУ ВО «Тихоокеанский госу-

дарственный медицинский университет» Минздрава России.

Список литературы / References

1. Колесникова А.А., Флейшман М.Ю., Якушева Н.Ю., Слободенюк Е.В., Толстенок И.В. Уровень окислительного стресса в ткани мозга крыс после черепномозговой травмы при введении синтетических регуляторных пептидов // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2020. – Т. 3. – С. 65-67.
Kolesnikova A.A., Fleishman M.Yu., Yakusheva N.Yu., Slobodenyuk E.V., Tolstenok I.V. [The level of oxidative stress in rat brain tissue after a brain trauma injury with introduction of synthetic regulatory peptides] // Pacific Medical Journal. 2020. Vol. 3. P. 65-67. (Russian)
2. Мамытова Э.М., Майназарова Э.С., Жусупова А.Т. Особенности иммунных нарушений в остром периоде черепно-мозговой травмы // Вестник КPCY. – 2014. – Т. 14, № 4. – С. 120–123.
Mamytova E.M., Mainazarova E.S., Zhusupova A.T. Features of immune disorders in the acute period of traumatic brain injury // Vestnik KRSU. 2014. T.14. No. 4. P.120–123.
3. Плехова Н.Г., Зиновьев С.В., Дюйзен И.В., Барышев А.Н., Шуматов В.Б. Поведенческая реакция животных и морфологическая структура неокортекса при экспериментальной черепно-мозговой травме лёгкой степени // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2020. – Т. 170, № 11. – С. 640-645.
Plekhoa N.G., Zinoviev S.V., Duizen I.V., Baryshev A.N., Shumatov V.B. Behavioral response of animals and morphological structure of the neocortex in mild experimental traumatic brain injury // Bull. Experim. Biol. Med. 2020. Vol.170. No.11. P. 640-645
4. Almeida-Suhett C.P., Li Z., Marini A.M., Braga M.F., Eiden L.E. Temporal course of changes in gene expression suggests a cytokine-related mechanism for long-term hippocampal alteration after controlled cortical impact // J. of neurotrauma, 2014. Vol. 31(7). P. 683–690.
5. Chen Y., Wang Y., Xu J., Hou T., Zhu J., Jiang Y., Sun L., Huang C., Sun L., Liu S. Multiplex assessment of serum chemokines CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL10, and CXCL13 following traumatic brain injury // Inflammation. 2022. <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01729-7>
6. Clausen F., Lorant T., Lewén A., Hillered L. T lymphocyte trafficking: a novel target for neuroprotection in traumatic brain injury // J. Neurotrauma. 2007. Vol. 24(8) P. 1295-307.
7. Ekmark-Lewén S., Flygt J., Kiwanuka O., Meyerson B.J., Lewén A., Hillered L., Marklund N. Traumatic axonal injury in the mouse is accompanied by a dynamic inflammatory response, astroglial reactivity and complex behavioral changes // J. of neuroinflammation, 2013. Vol. 10. P. 44-48.
8. Howell D.R. Southard J. The molecular pathophysiology of concussion // Clin. Sports Med. 2021. Vol. 40. P. 39–51.
9. Kokiko-Cochran O.N., Godbout J.P. The inflammatory continuum of traumatic brain injury and Alzheimer's disease // Front. Immunol. 2018. Vol. 9. P. 672-679.
10. Malik S., Alnaji O., Malik M., Gambale T., Rathbone M.P. Correlation between mild traumatic brain injury-induced

inflammatory cytokines and emotional symptom traits: a systematic review // Brain sciences. 2022. Vol. 12(1). P. 102-110.

11. Mendiola A.S., Cardona A.E. (). The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases // J. neural transmission (Vienna, Austria). 2018. Vol. 125(5). P. 781–795.

12. Postolache T.T., Wadhawan A., Can A., Lowry C.A., Woodbury M., Makkar H., Hoisington A.J., Scott A.J., Potocki E., Benros M.E., Stiller J.W. Inflammation in traumatic brain injury // J. Alzheimers Dis. 2020. Vol. 74(1). P. 1-28.

13. Rathbone A., Tharmaradinam S., Jiang S., Rathbone M.P., Kumbhare D. A review of the neuro- and systemic inflammatory responses in post concussion symptoms: Introduction of the "post-inflammatory brain syndrome" // PIBS. Brain Behav. Immun. 2015. Vol. 46. P. 1–16.

14. Redell J.B., Moore A.N., Grill R.J., Johnson D., Zhao J., Liu Y., Dash P.K. Analysis of functional pathways altered after mild traumatic brain injury // J. neurotrauma, 2013. Vol. 30(9). P. 752–764.

15. Schenkel J.M., Masopust D. Tissue-resident memory T cells // Immunity. 2014. Vol. 41(6). P. 886-897.

16. Weisel F., Shlomchik M. Memory B cells of mice and humans // Annu. Rev. Immunol. 2017. Vol. 35. P. 255-284.

Сведения об авторах:

Радьков Иван Валерьевич, аспирант Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Плехова Наталья Геннадьевна, д-р биол. наук, заведующая Центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Зиновьев Сергей Викторович, канд. мед. наук, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Шуматов Валентин Борисович, д-р мед. наук, профессор, ректор ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Автор для переписки

Плехова Наталья Геннадьевна, 690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2; e-mail: pl_nat@hotmail.com.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕТОКСИКАЦИИ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ ИММУНОРЕАБИЛИТАЦИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера»

Резюме

Цель. Оценить эффективность детоксикации с использованием энтеросорбентов для коррекции системного воспалительного ответа при иммунореабилитации онкологических больных.

Материалы и методы. Обследовано 87 пациентов с метастатическими формами солидных опухолей различных локализаций. Пациенты были разделены на 2 группы: исследуемая группа (41 больной, который к стандартной терапии получал детоксикационную терапию с использованием энтеросорбентов) и группа сравнения (46 больных, получавших только стандартную терапию). Эффективность терапии данными препаратами оценивали через один месяц путем оценки клинико-иммунологических параметров. Оценку состояния клеточного иммунитета осуществляли методом проточной цитометрии.

Результаты. У всех обследованных пациентов до начала терапии были выявлены нарушения функции иммунной системы в виде недостаточности клеточно-эффекторного звена иммунитета. Состояние клеточного звена иммунитета характеризовалось увеличением количества переходной и неклассических субпопуляций моноцитов, повышением содержания Т-, В- и NKT-клеток, но при снижении NK-клеток. Также у больных наблюдалось повышение отношения между количеством Т-хелперов (CD3+CD4+) и числом цитотоксических Т-клеток (CD3+CD8+). При этом у всех больных были выявлены признаки хронического системного воспаления. После проведения детоксикационной терапии в рамках иммунореабилитационных мероприятий у обследованных наблюдалось восстановление клеточных субпопуляций до уровня контрольных значений. В группе сравнения после проведенной терапии отсутствовали выраженные изменения в количестве клеток в крови, что свидетельствовало об отсутствии полного купирования системного воспалительного ответа.

Заключение. У онкологических пациентов определяется хронический токсикоз с развитием системной воспалительной реакции, на фоне которого выявляются нарушения функции иммунной системы. Применение энтеросорбентов в комплексной иммунореабилитационной терапии обосновано и подтверждается купированием астеновегетативных и диспепсических синдромов, нормализации показателей иммунной системы, что позволяет рекомендовать детоксикационную терапию при проведении иммунореабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: онкологические больные, иммунореабилитация, детоксикационная терапия, иммунная система, энтеросорбенты.

Образец цитирования: Савченко А.А., Каспаров Э.В., Борисов С.А., Мастерова А.А., Борисов А.Г. Эффективность детоксикации для коррекции системного воспалительного ответа при иммунореабилитации онкологических больных // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 61-68.

A.A. Savchenko, E.V. Kasparov, S.A. Borisov, A.A. Masterova, A.G. Borisov

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF DETOXIFICATION IN THE IMMUNOREHABILITATION OF CANCER PATIENTS

FGBNU Federal Research Center «Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», a separate subdivision of the «Research Institute of Medical Problems of the North».

Abstract

Purpose. Evaluation of the effectiveness of detoxification using enterosorbents in the immunorehabilitation of cancer patients.

Materials and methods. 87 patients with metastatic forms of solid tumors of various localizations with metastatic lesions were examined. The patients were divided into 2 groups: study group (41 patients who received detoxification therapy in addition to standard therapy) and comparison group (46 patients who received only standard therapy). The effectiveness of therapy with these drugs was evaluated after one month by assessing clinical and immunological parameters. The assessment of the state of cellular immunity was carried out by flow cytometry.

Results. Disturbances in the function of the immune system in the form of insufficiency of the cellular effector link of immunity were detected in all examined patients before the start of therapy. The state of the cellular link of immunity was

characterized by an increase in the number of transitional and non-classical subsets of monocytes, an increase in the content of T-, B- and NKT-cells, but with a decrease in NK-cells. An increase in the ratio between the number of T-helpers (CD3+CD4+) and the number of cytotoxic T-cells (CD3+CD8+) was observed in the examined patients. Restoration of cell subsets to the level of control values was found in the examined patients after detoxification therapy as part of immunorehabilitation measures. Significant changes in the number of cells in the blood were absent in the comparison group after the therapy which indicated the absence of a complete relief of the systemic inflammatory response.

Conclusion. Chronic toxicosis with the development of a systemic inflammatory reaction on the background of the immune system dysfunctions were found in cancer patients. The use of enterosorbents in complex immunorehabilitation therapy is substantiated and confirmed by the relief of asthenovegetative and dyspeptic syndromes, normalization of the immune system which makes it possible to recommend detoxification therapy during immunorehabilitation measures.

Keywords: cancer patients, immunorehabilitation, detoxification therapy, immune systems, enterosorbents.

Введение

Онкологические заболевания остаются серьезной социально-медицинской проблемой, что связано с ростом количества больных и смертностью от рака [1-3]. В последнее время основное внимание уделяется разработке новых методов лечения онкологических больных и ранней диагностике заболеваний. Однако необходимо отметить, что в результате хирургического вмешательства, химио- и лучевой терапии, а также собственно роста самой опухоли у больных развиваются функциональные, физические и психические нарушения, которые могут привести к снижению активности и качества жизни, формирования критических заболеваний на фоне хронического системного воспаления [4-6]. Для решения этой проблемы сформированы программы реабилитации онкологических больных. Основное внимание в них уделяется выявлению и лечению дефицита функциональных, физических, психологических и/или когнитивных нарушений [4]. Реабилитационные мероприятия иммунной системы не предусмотрены, хотя не вызывает сомнения, что в процессе лечения онкологических больных необходим контроль и коррекция иммунных нарушений. Это обусловлено тем, что течение онкологических заболеваний и их исход сопряжен с нарушениями функционирования иммунной системы и, прежде всего, с хроническим системным воспалением [7-9]. В связи с этим целесообразно проведение иммунореабилитационных мероприятий у больных с онкологической патологией на любом этапе развития опухолевого процесса. Иммунореабилитация – комплекс медицинских мероприятий, направленных на максимально возможное восстановление или компенсацию нарушенных или полностью утраченных в результате болезни нормальных физиологических функций иммунной системы [10, 11].

В отличие от традиционных классических реабилитационных мероприятий в основе восстановления иммунной системы, особенно на первых этапах после разрешения заболевания, лежит медикаментозная терапия. Учитывая, что одной из ведущих причин в формировании иммунных нарушений является хронический токсикоз, который возникает

за счет распада опухоли, стойкого системного воспаления, метаболического перепрограммирования как в микроокружении опухоли, так и на системном уровне, детоксикационная терапия обязательна при иммунореабилитации. Детоксикационная терапия показала свою клиническую эффективность при различных заболеваниях [12, 13]. Однако большинство исследований проведены в острый период заболевания с использованием инвазивных методов лечения, гораздо реже использовались энтеральные методы детоксикации, несмотря на то, что большая роль в формировании эндотоксикоза принадлежит измененной микрофлоре кишечника и/или токсическим продуктам метаболизма, находящимся в кишечнике [14-16]. Учитывая все это, представляет интерес разработка новых эффективных методов энтеросорбции при иммунореабилитации онкологических больных. В качестве таких препаратов предпочтение следует отдать отечественным лекарственным средствам: азоксимеру бромида (полиоксидоний) и коллоидному диоксиду кремния (полисорб МП). Азоксимера бромид обладает способностью адсорбировать токсины с последующей активацией макрофагов, которые обеспечивают утилизацию этих комплексов и имеющихся в межклеточном пространстве аларминов (DAMP). Кроме того, азоксимера бромид повышал активность NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов – основных клеток, обеспечивающих киллинг опухолевых клеток. Кремния диоксид коллоидный – неселективный полифункциональный энтеросорбент на основе высокодисперсного кремнезема, который обладает выраженными сорбционными и детоксикационными свойствами. В желудочно-кишечном тракте препарат связывает и выводит из организма эндогенные и экзогенные токсические вещества различной природы. Эта комбинация хорошо себя зарекомендовала при иммунореабилитации инфекционных больных [17, 18].

Целью исследования явилась оценка эффективности детоксикации с использованием энтеросорбентов для коррекции системного воспалительного ответа при иммунореабилитации онкологических больных.

Материалы и методы

Проведены обсервационные ретроспективные клинические исследования прошедших лечение в КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер имени А.И. Крыжановского» и в дальнейшем находящихся под наблюдением в клинике НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН. В исследование включено 87 пациентов (52 женщины и 35 мужчин, возраст от 50 до 70 лет) с метастатическими формами солидных опухолей различных локализаций с метастатическими поражениями (табл. 1). В качестве контрольной группы обследовано 78 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

В соответствии с дизайном исследования обследованные пациенты были разделены на 2 группы: исследуемая группа – 41 больной, который к стандартной терапии получал детоксикационную терапию с использованием внутривенных инфузий тканевого детоксиканта полиоксидония по 6 мг три дня подряд, затем через день, всего 10 инъекций и энтеросорбента Полисорб МП в дозе 1-2 столовые ложки с горкой на 1 прием 3 раза/сут.; группа сравнения – 46 больных, получавших только стандартную терапию. Эффективность терапии данными препаратами оценивали через один месяц путем оценки клинко-иммунологических параметров.

Клиническая оценка функции иммунной системы проведена согласно ранее разработанным

рекомендациям [19]. Оценку состояния клеточного иммунитета осуществляли методом проточной цитометрии цельной периферической крови с использованием панелей для исследования фенотипа клеток иммунной системы: CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5/HLA-DR-PC7, CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, CD62L-FITC/CD127-PE/CD3-ECD/CD25-PC5/CD4-PC7 и CD14-PE/CD45-ECD/HLA-DR-PC5/CD16-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [20]. Подготовку образцов периферической крови для анализа осуществляли по стандартной методике [21]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, USA). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, USA) на базе Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН. В каждой пробе анализировали не менее 50000 клеток.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Таблица 1

Характеристика пациентов, находившихся под наблюдением (абс./%)

Признаки	Контроль	Исследуемая группа	Группа сравнения
Число исследуемых	78	41	46
Мужчины	32/ 41,03	32	34
Женщины	46/ 58,97	68	66
Возраст	62 (53 – 71)	61 (50-70)	62 (52 – 72)
Коморбидность			
Болезни сердца	34/ 43,59	20/ 48,78	21/ 45,46
Сахарный диабет	18/ 23,08	9/ 21,95	9/ 19,57
Заболевание легких	20/ 25,64	16/ 39,02	15/ 32,61
Заболевание ЖКТ	14/ 17,95	12/ 29,27	11/ 23,91
Болезни печени	4/ 5,13	2/ 4,88	2/ 4,35
Болезни почек	2/ 2,56	1/ 2,44	1/ 2,17
Первичная локализация рака			
Колоректальный рак		14/ 34,15	12/ 26,09
Рак молочной железы		11/ 26,83	15/ 32,61
Рак легкого		7/ 17,07	10/ 21,74
Рак почки		4/ 9,76	5/ 10,87
Рак простаты		5/ 12,2	4/ 8,7

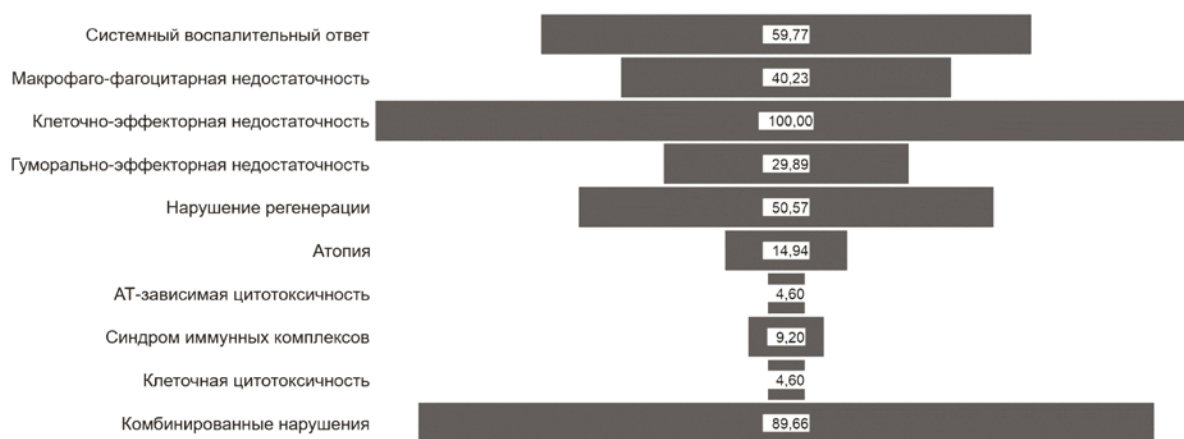


Рис. 1. Клинические проявления иммунных нарушений обследуемых больных

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей (C25-C75). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Достоверность различий показателей иммунной системы до и после лечения (зависимые выборки) определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты и обсуждение

Анализ клинико-anamnestических данных показал, что у всех обследованных пациентов были выявлены нарушения функции иммунной системы. Учитывая основное заболевание, исходно у всех пациентов диагностирована недостаточность клеточно-эффекторного звена иммунитета. Однако это не единственный синдром иммунных нарушений, чаще всего это комбинированное нарушение с проявлениями системного воспалительного ответа и

нарушениями процессов регенерации (рис. 1). Необходимо отметить, что все эти проявления иммунных нарушений протекают на фоне хронического токсикоза, который проявлялся различными клиническими симптомами. Практически у всех пациентов были слабость и утомляемость (100 %). На боли жаловались 70 из 87 человек (80,5 %), когнитивные дисфункции и нарушения сна были выявлены у половины пациентов, у каждого третьего из пациентов был неустойчивый стул, тахикардия, вздутие живота, одышка (рис. 2).

У онкологических больных наблюдаются и выраженные изменения в составе клеток иммунной системы (табл. 2). Несмотря на то, что общее количество лейкоцитов и гранулоцитов при сравнении у больных и лиц контрольной группы практически не отличались, другие показатели клеточного состава имели значительные различия. Число моноцитов у больных было повышено при снижении числа лимфоцитов. При более детальном исследовании популяции моноцитов обнаружено увеличение относительного количества переходной ($CD14^{hi}CD16^{+}$)

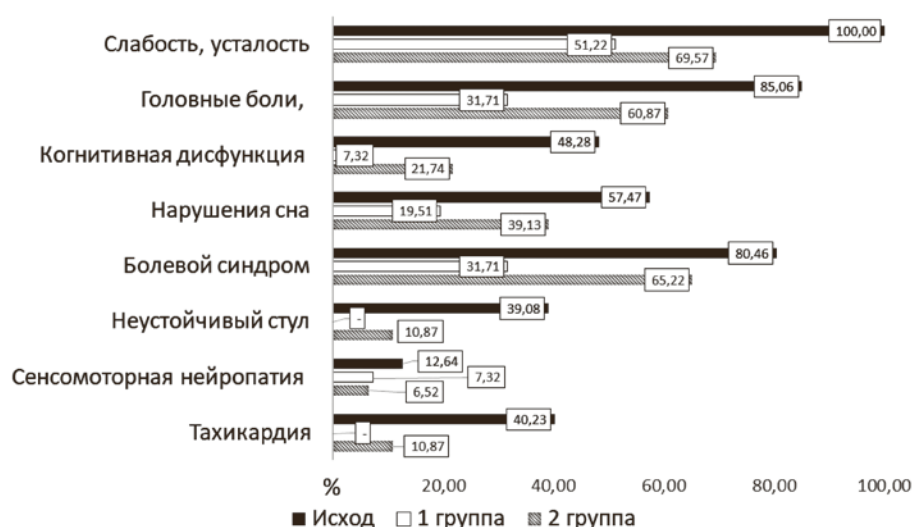


Рис. 2. Изменения клинических показателей, характеризующих хронический токсикоз

Иммунологические показатели исследуемых пациентов

Показатель	Контроль (n=78)	Больные (n=87)	p
Лейкоциты, 10 ⁶ /л	5,60 (4,50 - 7,08)	5,50 (4,78 - 7,76)	
Нейтрофилы, %	55,1 (47,0 - 63,0)	58,0 (49,0 - 65,1)	
Нейтрофилы, 10 ⁶ /л	3,11 (2,51 - 3,90)	3,18 (2,35 - 4,56)	
Базофилы, %	0,4 (0,0 - 1,0)	1,5 (0,0 - 2,0)	
Эозинофилы, %	2,0 (1,0 - 3,0)	3,5 (1,0 - 5,0)	
Моноциты, %	7,0 (5,0 - 9,0)	11,0 (6,0 - 15,0)	
Моноциты, 10 ⁶ /л	0,41 (0,27 - 0,54)	0,53 (0,31 - 0,78)	<0,001
CD14 ^{hi} CD16 ⁻	89,2 (73,2 - 96,1)	85,4 (79,2 - 89,9)	
CD14 ^{hi} CD16 ⁺ , %	2,8 (0,8 - 4,8)	4,8 (1,7 - 6,1)	0,016
CD14 ^{dim} CD16 ⁺ , %	8,6 (3,7 - 10,5)	14,4 (8,4 - 18,3)	<0,001
HLA-DR ⁺ Моноциты, %	95,8 (92,5 - 99,1)	88,6 (81,4 - 92,2)	<0,001
Лимфоциты, %	37,0 (29,0 - 42,0)	30,0 (21,0 - 38,0)	<0,001
Лимфоциты, 10 ⁶ /л	2,02 (1,51 - 2,55)	1,75 (0,65 - 2,34)	0,003
CD3 ⁺ -клетки, %	68,1 (60,3 - 74,0)	74,9 (70,1 - 79,4)	0,032
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -клетки, %	42,9 (34,9 - 48,0)	48,8 (40,5 - 52,2)	<0,001
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -клетки, %	26,4 (21,0 - 32,0)	24,7 (17,4 - 31,7)	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,62 (1,50 - 1,66)	2,12 (1,78 - 2,63)	<0,001
CD19 ⁺ -клетки, %	10,7 (5,8 - 13,1)	12,7 (9,6 - 16,1)	
CD16/56 ⁺ -клетки, %	19,7 (10,8 - 23,1)	13,0 (8,3 - 16,3)	0,048
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ -клетки, %	2,9 (1,5 - 5,2)	6,5 (5,0 - 9,9)	<0,001

фракции и неклассической (CD14^{dim}CD16⁺) субпопуляции. Изменение числа классических моноцитов (CD14^{hi}CD16⁻) было недостоверно.

Снижение числа лимфоцитов происходило, прежде всего, за счет популяции NK-клеток, за счет чего произошло увеличение относительного числа Т- и В-лимфоцитов. При этом необходимо обратить внимание на повышение отношения между количеством Т-хелперов (CD3+CD4⁺) и числом цитотоксических Т-клеток (CD3+CD8⁺), а также увеличением относительного числа NKT-лимфоцитов. В первом случае это свидетельствует о сниженном эффекторном потенциале Т-лимфоцитов, во втором случае – о компенсаторной реакции иммунитета у онкологических больных.

После проведения иммунореабилитационных мероприятий у обследованных наблюдались значительные изменения в составе клеток иммунной системы. Если число нейтрофилов не изменилось, то количество базофилов, эозинофилов и моноцитов претерпело значительные изменения. Особенно это касалось исследуемой группы, у которой проводились дополнительно детоксикационные мероприятия (рис. 3, А). Параметры этой группы приблизились к показателям группы контроля. Число

базофилов и эозинофилов в группе сравнения хотя и нормализовались, но число переходных и неклассических моноцитов все еще оставалось высоким, что свидетельствовало об отсутствии полного купирования системного воспалительного ответа.

Изменения также зарегистрированы и при изучении популяционного состава лимфоцитов. У пациентов, которые в период иммунореабилитации получали детоксикационную терапию, общее количество лимфоцитов, содержание CD3+CD4⁺ и CD3+CD8⁺-клеток, В-лимфоцитов и NK-клеток практически сравнивались с контрольными показателями (рис. 3, Б). В группе сравнения такие изменения практически не фиксировались.

Течение онкологического заболевания в любом случае протекает с процессами, связанными с распадом опухоли и выходом в межклеточное пространство аларминов. Эти молекулярные структуры, выступая сигналами тревоги, активируют иммунную систему и могут формировать патологические воспалительные реакции [22]. При избытке продуктов распада не всегда выделительная система организма адекватно справляется со своей задачей, что может послужить дополнительным источником токсинов, которые, прежде всего, концентрируются в

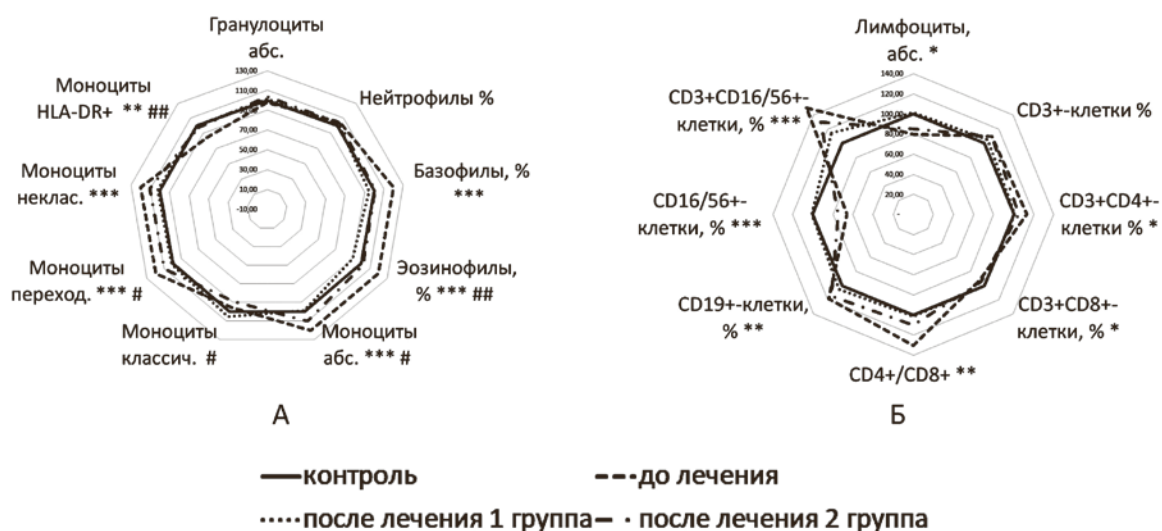


Рис. 3. Динамика параметров иммунной системы при проведении детоксикационных мероприятий

Примечание: сравнение исследуемой группы с исходом * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$; сравнение группы сравнения с исходом # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$

кишечники. Такой хронический токсикоз сопряжен с клиническими проявлениями иммунных нарушений, что и выявлено нами при клинической оценке состояния иммунной системы у онкологических больных. В основном это комбинированные нарушения с признаками системного воспалительного ответа.

Клинические проявления иммунных нарушений у онкологических больных подтверждаются и лабораторными показателями, на что указывают многочисленные исследования как в РФ, так и за рубежом [9, 23]. Подобные изменения зарегистрированы и нами. Все это послужило основанием для проведения сравнительных клинических исследований по оценке эффективности детоксикационной терапии больных, проходящих иммунореабилитацию. Проведенные исследования показали хороший клинический и иммунологический эффект применения детоксикации при иммунореабилитации онкологических больных. Отмечается более быстрое купирование не только диспепсических, но и астеновегетативных симптомов и боли у обследуемых пациентов. Помимо этого иммунологические показатели (включая параметры врожденного и адаптивного иммунитета) после проведения такой терапии нормализуются до контрольных значений.

Заключение

Таким образом, по результатам проведенного исследования у онкологических пациентов определяется хронический токсикоз с развитием системной воспалительной реакции, на фоне которого выявляются нарушения функции иммунной системы, проявляющиеся клинической симптоматикой и лабораторными показателями. Применение энте-

росорбентов в комплексной иммунореабилитационной терапии обосновано и подтверждается купированием астеновегетативных и диспепсических синдромов, нормализацией показателей иммунной системы, что позволяет рекомендовать детоксикационную терапию при проведении иммунореабилитационных мероприятий.

Список литературы / References

1. Мерабишвили В.М. Аналитические показатели. Годичная летальность больных злокачественными новообразованиями на каждом году наблюдения. Вопросы онкологии. 2021; 67(1):44-50. <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2021-67-1-44-50>
2. Merabishvili V.M. Analytical indicators of observation. The year-by-year lethality of patients at each year. Problems in Oncology. 2021; 67(1):44-50. (In Russ.) <https://doi.org/10.37469/0507-3758-2021-67-1-44-50>
3. Фаттахов Т.А., Миронова А.А., Пьянкова А.И., Шахзадова А.О. Смертность от новообразований в России в 1965–2019: основные структурные изменения и тенденции// Сибирский онкологический журнал. – 2021; 20(4): 5-20. doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-4-5-20
4. Fattakhov T.A., Mironova A.A., Pyankova A.I., Shahzadova A.O. Cancer mortality in Russia for the period of 1965–2019: main structural changes and trends. Siberian journal of oncology. 2021; 20(4):5-20. (In Russ.) <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2021-20-4-5-20>
5. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. Int. J. Cancer. 2021; 149(4):778-789. doi: 10.1002/ijc.33588
6. Fukushima T., Tsuji T., Watanabe N. et al. The current status of inpatient cancer rehabilitation provided by designated cancer hospitals in Japan. Japanese Journal of Clinical Oncology. 2021; 51(7):1094-1099. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyab070>

5. Neo J., Fettes L., Gao W. et al. Disability in activities of daily living among adults with cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2017; 61:94-106. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.10.006
6. Omran S., Mcmillan S. Symptom Severity, Anxiety, Depression, Self- Efficacy and Quality of Life in Patients with Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2018; 19(2):365-374. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.2.365
7. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А. и др. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечно-клеточным раком // Медицинская иммунология. – 2015; 17(2):141-150. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-2-141-150>
- Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A. et al. Monocytes subpopulations and chemiluminescent activity in patients with renal cell carcinoma. *Medical Immunology (Russia).* 2015; 17(2):141-150. (In Russ.) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-2-141-150>
8. Савченко А.А., Модестов А.А., Мошев А.В. и др. Цитометрический анализ NK- и NKT-клеток у больных почечно-клеточным раком // Российский иммунологический журнал. – 2014; 8(17/4):1012-1018.
- Savchenko A.A., Modestov A.A., Moshev A.V. et al. Cytometric analysis of NK and NKT cells in patients with renal cell carcinoma. *Russian Journal of Immunology.* 2014; 8(17/4):1012-1018. (In Russ.)
9. Rajaratnam H., Mokhtar N.F., Asma-Abdullah N., Fuad W.E.M. Discovering the Triad between Nav1.5, Breast Cancer, and the Immune System: A Fundamental Review and Future Perspectives. *Biomolecules.* 2022 Feb 15;12(2):310. doi: 10.3390/biom12020310
10. Петров Р.В., Сепиашвили Р.И. Проблемы реабилитации иммунной системы // Аллергология и иммунология. – 2015; 16(1):40-42.
- Petrov R.V., Sepiashvili R.I. Problems of rehabilitation of the immune system. *Allergology and Immunology.* 2015; 16(1):40-42. (In Russ.)
11. По О.Б., Конопля А.А., Медведева И.Н. Сравнительная эффективность различных схем иммунореабилитации при бесплодии трубноперитонеального генеза // Медицинская иммунология. – 2021; 23(4):927-932. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-CEO-1990>
- Po O.B., Konoplya A.A., Medvedeva I.N. Comparative effectiveness of various schemes of immunorehabilitation in infertility of tuboperitoneal genesis. *Medical Immunology (Russia).* 2021; 23(4):927-932. (In Russ.) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-CEO-1990>
12. Bottiroli S., Galli F., Viana M. et al. Negative Short-Term Outcome of Detoxification Therapy in Chronic Migraine With Medication Overuse Headache: Role for Early Life Traumatic Experiences and Recent Stressful Events. *Front Neurol.* 2019; 10:173. doi: 10.3389/fneur.2019.00173
13. La Manna G., Donati G. Coupled Plasma Filtration Adsorption: A Multipurpose Extracorporeal Detoxification Therapy. *Blood Purif.* 2018; 46(3):228-238. doi: 10.1159/000490234
14. Giloteaux L., Goodrich J.K., Walters W.A. et al. Reduced diversity and altered composition of the gut microbiome in individuals with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Microbiome.* 2016; 4:30. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0171-4>
15. Newberry F., Hsieh S.Y., Wileman T., Carding S.R. Does the microbiome and virome contribute to myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome? *Clin. Sci.* 2018; 132:523-542. <https://doi.org/10.1042/cs20171330>
16. Proal A.D., VanElzakker M.B. Long COVID or Post-acute Sequelae of COVID-19 (PASC): An Over-view of Biological Factors That May Contribute to Persistent Symptoms. *Front. Microbiol.* 2021; 12:698169. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698169>
17. Тихонова Е.П., Савченко А.А., Кузьмина Т.Ю. и др. Применение энтеросорбентов в иммунореабилитации больных, переболевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19 // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2021; 10(4):29-37. doi: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-4-29-37>
- Tikhonova E.P., Savchenko A.A., Kuzmina T.Yu. et al. The use of enterosorbents in the immunorehabilitation of patients who have had a new coronavirus infection COVID-19. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye* [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]. 2021; 10(4):29-37. (In Russ.) doi: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-4-29-37>
18. Цуканов В.В., Васютин А.В., Тонких Ю.Л. и др. Возможности применения энтеросорбента в комбинированной терапии больных описторхозом с кожным синдромом // Медицинский совет. – 2020; (5):70-76. doi: 10.21518/2079-701X-2020-5-70-76.
- Tsukanov V.V., Vasyutin A.V., Tonkikh J.L. et al. Possibilities of application of enterosorbent in combined therapy of opisthorchosis patients with skin syndrome. *Meditinskiy sovet = Medical Council.* 2020; (5):70-76. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2020-5-70-76>
19. Борисов А.Г. Клиническая характеристика нарушения функции иммунной системы // Медицинская иммунология. – 2013; 15(1):45-50. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2013-1-45-50>
- Borisov A.G. Clinical characterization of functional disorders affecting immune system. *Medical Immunology (Russia).* 2013; 15(1):45-50. (In Russ.) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2013-1-45-50>
20. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. – 2015; 17(1): 19-26. <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>
- Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Medical Immunology (Russia).* 2015; 17(1):19-26. (In Russ.) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>
21. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В. и др. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с при-

менением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология. – 2012; 14(3):255-268. <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268>

Khaydukov S., Baidun L., Zurochka A. et al. Standardized technology «Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytofluorometer-analyzers» (project). Medical Immunology (Russia). 2012; 14(3):255-268. (In Russ.) <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268>

22. Ashrafizadeh M., Farhood B., Elejo Musa A. et al. Damage-associated molecular patterns in tumor radiotherapy. Int. Immunopharmacol. 2020; 86:106761. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106761

23. Новик А.В., Проценко С.А., Балдуева И.А. Использование оценки состояния адаптивной иммунной системы у больных со злокачественными солидными опухолями в качестве предиктивных или прогностических факторов: систематический обзор // Эффективная фармакотерапия. – 2020; 16(33):58-78. doi: 10.33978/2307-3586-2020-16-33-58-75

Novik A.V., Protsenko S.A., Baldueva I.A. Using the assessment of the state of the adaptive immune system in patients with malignant solid tumors as predictive or prognostic factors: a systematic review. Effective Pharmacotherapy. 2020; 16(33):58-78. doi: 10.33978/2307-3586-2020-16-33-58-75

Сведения об авторах:

Савченко А.А., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской

академии наук», обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера.

Каспаров Э.В., д.м.н., профессор, директор НИИ медицинских проблем Севера, обособленное подразделение ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук».

Борисов С.А., младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера».

Мастерова А.А., младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера.

Борисов А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера.

Автор для переписки

Борисов Александр Геннадьевич, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3г, тел: +79293552939; e-mail: 2410454@mail.ru.

ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ СО СРЕДНЕТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ COVID-19 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СТЕПЕНЯХ ПОРАЖЕНИЯ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ

¹Городская больница № 1 им. Н.А. Семашко, Ростов-на-Дону, Россия

²Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

Цель: изучить изменения врожденного и адаптивного иммунитета у пациентов со среднетяжелым вариантом течения COVID-19 при различной степени поражения легочной ткани. Были обследованы 40 пациентов со среднетяжелой формой инфекции COVID-19 и различной степенью поражения легочной ткани (до 25 % и до 50 %) и 30 пациентов из группы контроля (здоровые доноры) с применением методов: компьютерная томография легких, оценка общего анализа крови, биохимических показателей, иммунологические исследования, статистический. Отличия у всех пациентов с группой контроля заключались в уменьшении абсолютного содержания лимфоцитов, в значимом росте относительного содержания натуральных киллеров и цитокиновом дисбалансе. Наиболее существенные различия были зарегистрированы в содержании ИЛ-6 в зависимости от степени поражения легочной ткани. Меньшая площадь поражения легких отражает более легкое течение заболевания, что не исключает необходимости диспансерного наблюдения и реабилитации после выписки.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, COVID-19, компьютерная томография.

Образец цитирования: Скрипкина Н.А., Сизякина Л.П., Антонова Е.А., Сизякин Д.В., Закурская В.Я. Особенности врожденного и адаптивного иммунитета у пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 при различных степенях поражения легочной ткани // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 69-74.

N.A. Skripkina¹, L.P. Sizyakina², E.A. Antonova¹, D.B. Sizyakin¹, V.Ya. Zakurskaya²

FEATURES OF INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY IN PATIENTS WITH MODERATE COURSE OF COVID-19 WITH VARIOUS DEGREES OF LUNG TISSUE DAMAGE

¹Semashko City Hospital No.1, Rostov-on-Don, Russia

²Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

Objective: to study changes in innate and adaptive immunity in patients with a moderate course of COVID-19 with varying degrees of lung tissue damage. 40 patients with a moderate form of COVID-19 and varying degrees of damage to the lung tissue (up to 25% and up to 50%) and 30 patients from the control group (healthy donors) were examined using methods: computed tomography of the lungs, evaluation of a complete blood count, biochemical parameters, immunological studies, statistical. Differences in all patients with the control group consisted in a decrease in the absolute content of lymphocytes, in a significant increase in the relative content of natural killers and cytokine imbalance. The most significant differences were registered in the content of IL-6, depending on the degree of damage to the lung tissue. A smaller area of lung damage reflects a milder course of the disease, which does not exclude the need for dispensary observation and rehabilitation after discharge.

Keywords: coronavirus infection, COVID-19, computed tomography.

Новая коронавирусная инфекция, вызываемая вирусом SARS-CoV-2, обозначенная Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) 11 февраля 2020 года как COVID-19, остается значимой угрозой жизни и здоровью человека. Несмотря на значительные усилия общемировой системы здравоохранения, вопросы диагностики, лечения и профилактики данного заболевания по-прежнему изучены не в полной мере и являются актуальными. COVID-19 проявляется вариативно от полностью бессим-

птомных до тяжелых форм заболевания вплоть до летального исхода. Наиболее распространенными проявлениями являются лихорадка, кашель и одышка, кроме того, общие симптомы включают утомляемость, миалгию, тошноту, рвоту, диарею, головную боль, слабость, ринорею, аносмию и агевзию [1]. Патогенез развития пневмонии при коронавирусной инфекции предполагает активацию альвеолярных макрофагов с последующим выбросом провоспалительных цитокинов, включающих в себя ИЛ-6, ИЛ-8,

фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- α), группу хемоаттрактантов, стимулирующих перемещение моноцитов и гранулоцитов из периферической крови в очаг воспаления [10]. Цитокины ответственны за развитие местных защитных реакций в тканях с участием различных типов клеток крови, эндотелия, эпителия и соединительной ткани и регулируют все последовательные этапы развития воспаления и адекватность иммунного ответа на внедрение патогена [9, 6]. Однако их гиперпродукция приводит к развитию системной воспалительной реакции, нарушению функции органа, и дальнейшее нарастание концентрации может служить причиной развития такого критического состояния, как «цитокиновый шторм» [7]. Согласно ряду исследований, нарушение регуляции активации Т-лимфоцитов можно рассматривать как основной патогенетический механизм при «цитокиновом шторме», где ИЛ-6 и ИФН- γ являются ключевыми цитокинами [4]. Каскад иммунопатологических реакций приводит к различным поражениям внутренних органов, среди которых значимое место занимает пневмония. В зависимости от выявленной степени поражения легочной ткани по данным КТ врачами принимается решение о дальнейшей тактике лечения больного. Результаты КТ, наблюдаемые у пациентов с COVID-19 пневмонией, представляют собой очаги по типу матового стекла или пятнистых уплотнений вследствие проникновения вируса в пневмоциты и развития интерстициального воспаления [13]. Хотя COVID-19 является в первую очередь респираторным заболеванием с поражением паренхимы легких, известно, что тяжелые формы связаны с провоспалительным цитокиновым штормом, ведущим к системному воспалению и сепсису с последующим поражением других органов. При таком сценарии комплексный подход с компьютерной томографией (КТ) может дать ценную информацию о диагностике, последующем наблюдении и прогнозе пациентов с COVID-19. Таким образом, интересным представляется проследить взаимосвязь общеклинических, биохимических и иммунологических изменений в крови пациентов со среднетяжелыми формами COVID-19 при различных степенях поражения легочной ткани.

Материалы и методы

В данное исследование были включены 40 пациентов, госпитализированных в моноинфекционный госпиталь центральной городской больницы им. Семашко с диагнозом «Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (подтвержденная), среднетяжелая форма». Средний возраст обследуемых составил 53,5 года [43; 68]. Доля мужчин и женщин в группе составила 26 и 16 человек соответственно.

Клиническое исследование носило проспективный когортный характер и было выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г., WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (2013), с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава России от 19.06.2016 № 266. Группу контроля составили 30 здоровых доноров, сопоставимых по возрасту и половому распределению. Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследователями проводился анализ истории болезни с выявлением основных жалоб пациента и характера протекания болезни. Степень поражения легочной ткани оценивалась с помощью метода компьютерной томографии (КТ) при поступлении. В зависимости от выявленной степени поражения легочной ткани обследуемые были разделены на две группы: с площадью поражения до 25 % - КТ1 (18 человек) и с площадью поражения от 25 % до 50 % - КТ2 (22 человека). Критерием исключения являлись случаи с площадью поражения свыше 50 %. Всем испытуемым проводился общеклинический анализ крови (ОАК), включавший оценку содержания эритроцитов, уровень гемоглобина, тромбоцит, а также общее количество лейкоцитов с лейкоцитарной формулой. Среди биохимических показателей определяли содержание С-реактивного белка (СРБ), АлТ, АсТ, альбумина, мочевины, креатинина, глюкозы, ЛДГ, ферритина, общего белка, амилазы и билирубина. Экспрессию видовых маркеров на поверхности лимфоцитов определяли методами проточной цитофлуориметрии. Для Т-клеток оценивали количество кластеров дифференцировки: CD3+, CD4+, CD8+, для В-клеток – CD19+ и для клеток натуральных киллеров – CD16+. Количественное содержание сывороточных IgA, IgM, IgG, гамма-интерферона, цитокинов (IL-6, IL-10), а также специфических антител к вирусу SARS-CoV-2 классов IgM и IgG проводилось с помощью иммуноферментного анализа.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США). Описательную статистику количественных признаков представляли в виде центральной тенденции медианы и межквартильного размаха (25 и 75 перцентили), представлено в тексте как Me [LQ; UQ]. Сравнение медиан в группах осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Вилкоксона. Различия признавались статистически значимыми на уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В отделение пациенты поступали в среднем на 6-7-е сутки с момента начала заболевания. При оценке изменений общеклинического анализа крови в обеих группах было отмечено статистически значимое снижение содержания тромбоци-

тов, сдвиги в лейкоцитарной формуле (лимфопения, моноцитопения) в сравнении со здоровыми донорами (табл. 1). Однако в группе КТ2 изменения в лейкоцитарной формуле были более выраженные и сопровождалась достоверно большим значением нейтрофилов, чем в группе контро-

Таблица 1

Сравнительная характеристика ОАК у пациентов со среднетяжелой формой COVID-19 и группы контроля

Показатель	Пациенты с поражением легких КТ 1	Пациенты с поражением легких КТ 2	Группа контроля
	1	2	3
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,35 [4,88;6,83]	6,2 [4,85;7,35]	7,41 [5,3;8,6]
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	4,9 [4,6;4,93]	4,65 [4,3;4,9]	4,8 [4,4;5,1]
Hb, г/л	145,5 [140; 153]	143 [136,5;152,2]	143,2 [121; 158]
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	161,5 ¹ [148;173]	184 ² [157,5;226]	238 [150;359]
Гранулоциты, %	76,85 [65;79,6]	80,4 ² [69,1;83,85]	68,5 [58;78]
Лимфоциты, %	21,3 ¹ [18,9;32,9]	17,9 ² [14,8;29]	28,2 [22;38]
Моноциты, %	1,55 ¹ [1,38;2,3]	1,6 ² [0,9;1,95]	5,1 [3,8;8,3]

Примечание: 1 – статистическая значимость различий показателей между группами 1 и 3 ($p < 0,05$); 2 – статистическая значимость различий показателей между группами 2 и 3 ($p < 0,05$), рассчитанная с учетом U-критерия Вилкоксона; в таблице средние значения представлены в виде: Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

Таблица 2

Сравнительная характеристика биохимических показателей крови у пациентов со среднетяжелой формой COVID-19 и группы контроля

Показатель	Пациенты с поражением легких КТ 1	Пациенты с поражением легких КТ 2	Группа контроля
	1	2	3
Альбумин, г/л	43,3 ¹ [42,43; 45,1]	44,15 ² [41,55;45,9]	34 [31,2;35,6]
АЛТ, Ед/л	38,3 [32,5; 60,33]	31 [22,4; 39,18]	32,3 [19,85;56,8]
АСТ, Ед/л	45,6 ¹ [32; 58,75]	33,15 [18,8;50,85]	27,9 [21,83;51,1]
Мочевина, ммоль/л	5,69 [4,97; 6,32]	4,5 [3,54;5,4]	6,15 [3,8;8,13]
Креатинин, мкмоль/л	91 ³ [74,75;105,5]	75 ² [72,25;80]	90 [76;98]
Глюкоза, ммоль/л	6,8 ¹ [6,2; 7,68]	6,6 ² [5,73;7,28]	5,7 [5,05;6,73]
СРБ, мг/мл	32,05 ^{1,3} [13,7; 39,6]	47,95 ² [21,9;81,2]	2,8 [1,2; 4,7]
Общий белок, г/л	74,75 [72,2; 77,4]	70,95 [68;76,9]	70,25 [67,5;74,9]
Амилаза, Ед/л	87,5 ^{1,3} [65,5;101,25]	53 [45;66,5]	59 [42,5;66]
Билирубин, мкмоль/л	4,85 ^{1,3} [4,38;5,28]	8,6 [5,9;9,36]	8,1 [5,2;13,5]
ЛДГ, Ед/л	518 ^{1,3} [472; 616]	644 ² [516; 730]	84 [14; 218]
Ферритин, мкг/л	169 ^{1,3} [91; 415]	354 ² [251; 652]	98 [21; 211]

Примечание: 1 – статистическая значимость различий показателей между группами 1 и 3 ($p < 0,05$); 2 – статистическая значимость различий показателей между группами 2 и 3 ($p < 0,05$); 3 – статистическая значимость различий показателей между группами 1 и 2 ($p < 0,05$), рассчитанная с учетом U-критерия Вилкоксона; в таблице средние значения представлены в виде: Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

ля. При сравнительной оценке результатов общеклинического анализа крови у пациентов со среднетяжелой формой COVID-19, несмотря на различную степень поражения легочной ткани, статистически значимых изменений между двумя группами не наблюдалось на протяжении всего периода госпитализации. Исключение составляют показатели тромбокрита, которые были несколько ниже в группе с КТ1 ($p<0,05$).

При оценке биохимических показателей (табл. 2) значимые различия с группой контроля характеризуются повышением содержания альбумина, глюкозы и таких предикторов тяжелого течения, как СРБ, ферритина и ЛДГ. При этом в группе КТ1 статистически выше также были показатели АСТ и амилазы. При сравнении показателей между группами КТ1 и КТ2 было отмечено, что значения кре-

атинина и амилазы в группе КТ1 достоверно выше ($p<0,05$). Маркеры воспаления и предикторы тяжести течения COVID-19, такие как ЛДГ, СРБ и ферритин, у пациентов с большей площадью поражения легочной ткани продемонстрировали статистически более высокие значения этих показателей ($p<0,05$).

При оценке динамики иммунологических показателей в исследуемых группах было отмечено, что в сравнении со здоровыми донорами относительное содержание основных субпопуляций Т-лимфоцитов не различается (табл. 3). При оценке абсолютных значений выявлена статистически значимая разница, которая объясняется лимфопенией у пациентов с COVID-19. Кроме того, отмечен рост содержания клеток натуральных киллеров в относительном расчете при сравнении с группой контроля.

Таблица 3

Сравнительная характеристика иммунологических показателей крови у пациентов со среднетяжелой формой COVID-19 и группы контроля

Показатель	Пациенты с поражением легких КТ 1	Пациенты с поражением легких КТ 2	Группа контроля
	1	2	3
CD3+, %	64,0 [62,75;67,75]	65,5 [57,75;74,5]	71 [61;74]
CD3+, $\times 10^9/\text{л}$	0,93 ¹ [0,77;1,26]	0,72 ² [0,57;0,98]	1,6 [0,9;1,8]
CD3+CD4+, %	39,5 [30,5;42,5]	40,5 [35;52,75]	42 [36;44]
CD3+CD4+, $\times 10^9/\text{л}$	0,53 ¹ [0,33;0,8]	0,45 ² [0,33;0,63]	0,8 [0,6;1]
CD3+CD8+, %	25 [21;31,5]	24 [20;26]	25 [22;31]
CD3+CD8+, $\times 10^9/\text{л}$	0,39 ¹ [0,25;0,45]	0,25 ² [0,17;0,36]	0,46 [0,3;0,7]
CD16+, %	16 ¹ [12,25;22,25]	17,5 ² [10,5;25,25]	12 [8;15,4]
CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	0,28 [0,12;0,51]	0,2 [0,11;0,28]	0,22 [0,19;0,34]
CD19+, %	13,5 [8,75;21]	11,5 [8,25;17,5]	15 [9;17,9]
CD19+, $\times 10^9/\text{л}$	0,16 ¹ [0,13;0,33]	0,12 ² [0,09;0,18]	0,28 [0,12;0,31]
IgA, г/л	2,19 [1,73;2,53]	2,58 [1,99;3,36]	2 [1,4; 2,5]
IgM, г/л	0,82 [0,69;1,08]	1,06 [0,84;1,17]	1,1 [0,89;1,4]
IgG, г/л	9,72 ^{1,3} [8,96;10,83]	11,2 [8,73;12,1]	11 [9,5;12,5]
ЦИК, у.е.	68,5 ¹ [66,25;73,5]	82,5 ² [72;100]	35,2 [18; 64]
Интерферон гамма, пг/мл	12,5 ¹ [11,39;14,84]	12,2 ² [11,5;15,76]	8,5 [4,2; 15,4]
ИЛ-6, пг/мл	12,36 ^{1,3} [5,43;18,65]	28,83 ² [18,9;45,4]	4,5 [2,1; 6,2]
ИЛ-10, пг/мл	15,37 ¹ [11,3; 20,6]	15,95 ² [7,3; 21,3]	4,7 [2,2; 6,7]

Примечание: 1 – статистическая значимость различий показателей между группами 1 и 3 ($p<0,05$); 2 – статистическая значимость различий показателей между группами 2 и 3 ($p<0,05$); 3 – статистическая значимость различий показателей между группами 1 и 2 ($p<0,05$), рассчитанная с учетом U-критерия Вилкоксона; в таблице средние значения представлены в виде: Медиана [Нижний квартиль; Верхний квартиль].

При сравнительной оценке показателей иммунного статуса между группами КТ1 и КТ2 значимых различий в клеточном звене иммунитета выявлено не было, уровень общего IgG был достоверно выше в пациентов из группы КТ-2. Характеризуя различия в интерфероновом статусе пациентов из двух групп, следует отметить, что исходный уровень ИЛ-6 ожидаемо ниже в группе КТ-1.

Динамика специфического гуморального ответа у пациентов с более тяжелым течением характеризовалась более быстрой выработкой специфических антител как IgM, так и IgG. Так, пациенты с меньшей площадью поражения легких при поступлении демонстрировали уровни IgM КР=0,1* [0;0,2] и IgG КР=0,3* [0;75], в то время как у пациентов с КТ-2 эти показатели составляли КР=2,82 [0,2;8] и КР=1,67 [0;7,54] соответственно.

Согласно действующим «Временным методическим рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции» (версия 16 от 18.08.2022), КТ-исследование имеет большое значение не только для диагностики COVID-19, но и для мониторинга прогрессирования заболевания и оценки терапевтической эффективности. Однако в классификации COVID-19 по степени тяжести учитывается лишь факт присутствия изменений в легких, площадь поражения не учитывается при прогнозе течения заболевания, который определяется патогенетическими изменениями, происходящими в иммунной системе.

В полученных нами результатах отмечались более глубокая лимфопения и статистически значимый более высокий уровень маркеров воспаления – ЛДГ и ферритина – в группе с большей площадью поражения легких (КТ2), что подтверждает ранее опубликованные данные [2, 3]. Отличия у всех пациентов с группой контроля заключались в абсолютном содержании лимфоцитов и значимом росте относительного содержания клеток натуральных киллеров. Кроме того, скорость специфического гуморального иммунного ответа у пациентов с КТ-2 также была выше, что подтверждалось появлением положительных титров специфических антител IgM и IgG классов уже к моменту поступления в стационар. Выявлен также цитокиновый дисбаланс, проявляющийся повышением уровня всех трех патогенетически значимых цитокинов. Известно, что активированные Т-клетки стимулируют макрофаги и NK-клетки через IFN-γ, способствуя удалению вируса [12]. Большой уровень Т-лимфоцитов, IFN-γ у пациентов с COVID-19, вероятно, отражают адекватный иммунный ответ на вирусную инфекцию. ИЛ-10 представляет собой цитокин, который ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов (например, IFNγ, TNFα, IL-1β и IL-6) в различных типах кле-

ток. Его рост, вероятно, отражает компенсаторные механизмы на фоне роста содержания как ИЛ-6, так и IFNγ. Многие авторы обнаружили увеличение содержания ИЛ-10 у пациентов с COVID-19 и связали его уровни с тяжестью и прогрессированием заболевания [5, 8, 11]. Значимые различия между группами (КТ-1 и КТ-2) при оценке иммунологических показателей заключались только в содержании ИЛ-6, который был больше в группе пациентов с КТ-2, в то время как содержание IFN-γ и ИЛ-10 статистически не различалось, оставаясь существенно повышенным относительно группы контроля. Подобные изменения отражают большую тяжесть инфекционно-воспалительного процесса при большей площади поражения легочной ткани. Можно предположить, что меньшая площадь поражения легких отражает более легкое течение заболевания, что не исключает необходимости дальнейшего диспансерного наблюдения и реабилитации после момента выписки.

Список литературы / References

1. Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Чернобровкина Т.Я., Янковская Я.Д., Бурова С.В. Новая коронавирусная инфекция (Covid-19): клинико-эпидемиологические аспекты // Архив внутренней медицины. – 2020. – № 10 (2 (52)). – С. 87-93.
Nikiforov V.V., Suranova T.G., Chernobrovkina T.Ya., Yankovskaya Y.D., Burova S.V. New coronavirus infection (Covid-19): clinical and epidemiological aspects // Archives of Internal Medicine. 2020. Vol.10 (2 (52)). P. 87-93.
2. Сизякина Л.П., Закурская В.Я., Скрипкина Н.А., Антонова Е.А. Уровень ферритина как предиктор тяжелого течения COVID-19 // Иммунология. – 2021. – Т. 42 (5). – С. 518–525.
Siziakina L.P., Zakurskaya V.Ya., Skripkina N.A., Antonova E.A. Ferritin level as a predictor of severe COVID-19 // Immunology. 2021; Vol. 42 (5). P. 518–525.
3. Сизякина Л.П., Закурская В.Я., Скрипкина Н.А., Антонова Е.А., Сизякин Д.В. Клинико-иммунологическая характеристика среднетяжелых форм COVID-19 при различных уровнях маркера тканевой деструкции – лактатдегидрогеназы // Медицинский вестник Юга России. – 2021. – Т.12(4). – С. 108-115.
Siziakina L.P., Zakurskaya V.Ya., Skripkina N.A., Antonova E.A., Siziakin D.V. Clinical and immunological characteristics of moderate forms of COVID-19 at different levels of tissue destruction marker - lactate dehydrogenase // Medical Bulletin of the South of Russia. 2021; Vol.12(4), P.108-115.
4. Fara A., Mitrev Z., Rosalia R.A., Assas B.M. Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines// Open Biology. 2020. Vol. 10(9) P 200160.
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// Emerging microbes & infections. 2020. Vol. 9(1), P. 1123–1130.

6. Hernández-Ruiz M., Zlotnik A. Mucosal Chemokines// Journal of interferon & cytokine research. 2017. Vol. 37(2), P. 62–70.

7. Hu B., Huang S., Yin L. The cytokine storm and COVID-19// J Med Virol. 2021. Vol. 93(1), P. 250–256.

8. Luo X. H., Zhu Y., Mao J., Du R. C. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19// Scandinavian journal of immunology. 2021. Vol. 93(3), e12989.

9. Machado-Carvalho L., Roca-Ferrer J, Picado C. IL-4/IFN- γ inflammatory cytokine profile induces a deficient regulation of the IL-1 β /IL-1RI/EP2/COX-2 pathway in nasal mucosa // Respiratory medicine. 2019. Vol. 150, P.136–140.

10. Ochani, R., Asad, A., Yasmin, F., Shaikh S., Khalid H., Batra S., Sohail M. R., Mahmood S. F., Ochani R., Hussham Arshad M., Kumar A., Surani S. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management// Le infezioni in medicina. 2021. Vol. 29(1), P. 20–36.

11. Patterson B. K., Guevara-Coto J., Yogendra R., Francisco E. B., Long E., Pise A., Rodrigues H., Parikh P., Mora, J., Mora-Rodríguez R. A. Immune-Based Prediction of COVID-19 Severity and Chronicity Decoded Using Machine Learning //Frontiers in immunology. 2021. Vol. 12.

12. Vallejo A., Vizcarra P., Quereda C., Moreno A., Casado J.L.; CoVEX study group. IFN- γ cell response and IFN- γ release concordance after in vitro SARS-CoV-2 stimulation// European journal of clinical investigation. 2021, Vol. 51(12), P.13636.

13. Zheng Y., Wang L., Ben S. Meta-analysis of chest CT features of patients with COVID-19 pneumonia // Journal of medical virology/ 2021/ Vol. 93,1, P. 241–249.

Сведения об авторах:

Скрипкина Надежда Анатольевна, врач-инфекционист моноинфекционного госпиталя № 1 МБУЗ «ГБ 1 им. Н.А. Семашко», г. Ростов-на-Дону, Россия. ORCID: 0000-0003-0165-6805

Сизякина Людмила Петровна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «РостГМУ» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия.

Антонова Елена Алексеевна, начальник отдела качества лабораторных исследований МБУЗ «ГБ 1 им. Н.А. Семашко», г. Ростов-на-Дону, Россия.

Сизякин Дмитрий Владимирович, д.м.н., профессор, профессор кафедры урологии ФГБОУ ВО «РостГМУ» МЗ РФ, главный врач МБУЗ «ГБ 1 им. Н.А. Семашко», г. Ростов-на-Дону, Россия.

Закурская Вита Яковлевна, ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «РостГМУ» МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия.

Автор для переписки

Сизякина Людмила Петровна, ФГБОУ ВО «РостГМУ» МЗ РФ, 344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: msiziakina@mail.ru.

А.И. Смолягин¹, А.С. Симбирцев², И.В. Михайлова¹, Е.В. Ермолина¹, А.А. Исенгулова¹,
Л.А. Пушкарева¹, Н.А. Кузьмичева¹, Ю.В. Филиппова¹, И.Н. Чайникова¹, И.В. Мирошниченко¹

ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПОТОМСТВА, РОДИВШЕГОСЯ ОТ ПАССИВНО КУРИВШИХ КРЫС, ПОЛУЧАВШИХ ТЕТРАПЕПТИД КК1

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Оренбург;

²ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург

Резюме. Представлены результаты физиологических и иммунологических исследований крысят, родившихся от самок, которые во время беременности подвергались пассивному курению и воздействию тетрапептида КК1. С 1-х по 21-е постнатальные сутки исследовано соматическое и сенсомоторное развитие потомства с помощью набора тестов, разработанных в Институте нормальной физиологии им. П.К. Анохина. Уровень цитокинов ИФН γ и ИЛ-6, продуцируемых спленocyтами крысят, исследовали в культуральной жидкости методом ИФА. У крысят, родившихся от пассивно куривших самок, по сравнению с животными, родившимися от некуривших крыс, установлено снижение массы крысят, а также отставание своевременности соматического и сенсомоторного развития. Введение пептида КК1 некурившим самкам повышает ИССР и ИССМР.

Полученные результаты свидетельствовали в пользу развития индуцированного варианта вторичного иммунодефицита у крысят, родившихся от пассивно куривших крыс во время беременности. Введение пептида КК1 некурившим крысам существенно не изменяло иммунологические параметры крысят. Напротив, введение пептида КК1 курившим беременным крысам сопровождалось изменениями количества клеток в лимфоидных органах и продукции цитокинов спленocyтами у родившихся крысят.

Ключевые слова: пассивное курение, крысы, физиологические и иммунологические показатели, тетрапептиды.

Образец цитирования: Смолягин А.И., Симбирцев А.С., Михайлова И.В., Ермолина Е.В., Исенгулова А.А., Пушкарева Л.А., Кузьмичева Н.А., Филиппова Ю.В., Чайникова И.Н., Мирошниченко И.В. Оценка физиологических и иммунологических показателей у потомства, родившегося от пассивно куривших крыс, получавших тетрапептид КК1 // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 75-79.

A.I. Smolyagin¹, A.S. Simbirtsev², I.V. Mikhailova¹, E.V. Ermolina¹, A.A. Isengulova¹,
L.A. Pushkareva¹, N.A. Kuzmicheva¹, Y.V. Filippova¹, I.V. Miroshnichenko¹

EVALUATION OF PHYSIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN THE OFFSPRING BORN FROM PASSIVELY SMOKING RATS TREATED WITH NEUROPEPTIDES

¹Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia;

²State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St.Petersburg

Summary. The results of physiological and immunological studies of rat pups born from females who were exposed to passive smoking and exposure to tetrapeptide KK1 during pregnancy are presented. From the 1st to the 21st postnatal days, the somatic and sensorimotor development of offspring was studied using a set of tests developed at the P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology. The level of cytokines IFN γ and IL-6 produced by rat splenocytes was studied in culture fluid by the ELISA method. In baby rats born from passively smoking females, compared with animals born from non-smoking rats, a decrease in the weight of baby rats was found, as well as a delay in the timeliness of somatic and sensorimotor development. The introduction of the peptide KK 1 non-smoking females increases the index of timeliness of somatic and sensorimotor development.

The results obtained show an induced variant of secondary immunodeficiency in baby rats born from passively smoking rats during pregnancy. Administration of the KK1 peptide to non-smoking rats did not change the immunological parameters of the baby rats. On the contrary, the production of peptide KK1 by pregnant rats who smoked was accompanied by changes in the number of cells in lymphoid organs and the production of cytokines by splenocytes in the born rats

Key words: passive Smoking, rats, physiological and immunological parameters, tetrapeptides.

Известно, что попадание табачного дыма в организм беременных животных при пассивном курении способствует интоксикации, нарушениям функций нервной и иммунной систем, задержке внутриутробного развития. Большое внимание уделяется как созданию экспериментальной модели при пассивном курении, так и поиску веществ, обладающих нейропротективным и иммуномодулирующим действием. Одним из них является препарат пептидной природы под лабораторным шифром KK1, обладающий ноотропным и психостимулирующим действием, повышающим устойчивость к стрессу и гипоксии [2, 4, 5]. Общеизвестна связь нервной, эндокринной и иммунной систем. Вместе с тем в литературе практически отсутствуют работы по влиянию данного препарата на иммунологические показатели. В связи с этим целью данной работы явилось создание экспериментальной модели для оценки влияния тетрапептида KK1 на физиологические и иммунологические показатели крысят, родившихся от пассивно куривших самок, которым в период беременности вводили данный препарат.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования были выполнены на 20 половозрелых крысах Вистар и на 52 крысках. Моделирование пассивного табакокурения проводили в камере без поддержания четкого режима влажности. Курящие крысы с 5-го по 20-й день гестации (ежедневно в течение 5 дней в неделю по 8 часов) подвергались фумигации табачным дымом, которая осуществлялась каждые 60 минут дымом, полученным от 1 тлеющей сигареты. Животные контрольной группы в аналогичный период помещались в камеру, вентилируемую атмосферным воздухом без табачного дыма. Начиная со 2-й недели беременности контрольным крысам вводили: I группе (5 крыс) – физраствор (0,2 мл интраназально), II гр. (5 крыс) – пептид KK1 (в дозе 40 мкг/кг/сут. 5 раз через день интраназально). Опытным курившим крысам вводили: III гр. (5 крыс) – физраствор (0,2 мл интраназально), IV гр. (5 крыс) – KK1 (в дозе 40 мкг/кг/сут. 5 раз через день интраназально). Выбор дозы и схема введения иммуномодуляторов обусловлены ранее проведенными исследованиями [3, 5]. Иммуномодулятор синтезирован и любезно предоставлен А.А. Колобовым (ФГУП Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России). Родившиеся крысята были разделены на аналогичные 4 группы. Эвтаназию крысят осуществляли дислокацией шейных позвонков под эфирным наркозом на 21-е сутки после рождения.

С 1-х по 21-е постнатальные сутки исследовано соматическое и сенсомоторное развитие потомства с помощью набора тестов, разработанных в Институте нормальной физиологии им. П.К. Анохина. Для

оценки индекса своевременности соматического (ИССР) и сенсомоторного развития (ИССМР) каждого крысенка период, в течение которого у крысят проявлялись признаки развития, делился на три части: раннее, среднее и позднее время появления признака. Своевременность развития каждого признака регистрировали в баллах (2, 1 и 0 баллов соответственно). Суммарный индекс своевременности соматического и сенсомоторного развития крысенка рассчитывался путем сложения баллов всех исследуемых признаков.

В соответствии с рекомендациями [1] у крысят определяли: в крови число лейкоцитов, уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови с использованием ПЭГ-6000; в лимфоидных органах – массу и количество клеток. Продукцию цитокинов ИЛ-6 и ИФН γ исследовали в супернатантах культур спленоцитов после 48-часовой инкубации клеток при 37°C в атмосфере 5 % CO $_2$ в полной культуральной среде (RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM глутамина и 80 мкг/мл гентамицина). Оценивали спонтанную и индуцированную конканавалином А (Кон А) в конечной концентрации 10 мкг/мл секрецию спленоцитами ИФН γ и ИЛ-6. Уровень цитокинов исследовали в культуральной жидкости с помощью наборов (RayBio Rat IFN-gamma ELISA Kit, U.S.A., RayBio Rat IL-6 ELISA Kit, U.S.A.). Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия).

Результаты исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и STATISTICA 10.0 и представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25-й и 75-й проценты), а также в виде среднеарифметического значения ($M \pm m$). Для сравнения групп использовали U-критерии Манна-Уитни, Стьюдента и χ -квадрат.

Результаты и обсуждение

При одинаковом содержании и питании животных средняя масса крысят на 21-й день от рождения была достоверно снижена у животных III гр. ($31,4 \pm 1,2$ г) и IV гр. ($28,5 \pm 0,73$ г) по сравнению с аналогичным параметром контрольной группы ($37,2 \pm 0,55$ г). Оценивая результаты своевременности соматического развития, установлено достоверное снижение ИССР у крысят III гр., по сравнению с контролем, следующих признаков: появление шерсти (на 82,7 %), полное обшерствление (на 65,7 %), появление верхних (на 28,3 %) и нижних резцов (на 27,9 %).

Введение пептида KK1 некурившим самкам приводило к достоверному увеличению всех восьми индексов соматического развития у крысят II гр. по сравнению с аналогичными индексами в I гр.

Аналогичное введение пептида КК1 курившим самкам не выявило существенных отличий среднего ИССР ($8,35 \pm 0,25$) по сравнению с ИССР крысят I гр. ($8,77 \pm 0,47$).

Оценивая 15 параметров своевременности сенсомоторного развития, важно отметить существенное снижение всех исследованных показателей у крысят III гр. по сравнению с контролем. Отмечается наибольшее снижение следующих сенсомоторных признаков: зрительный плейсинг (на 82,7 %), движение ушей (на 62 %), класпинг (на 56,4 %), подъем и спуск по вертикальному канату (на 54,1 %), аудиторный стартл (на 49,4 %).

Введение пептида КК1 некурившим самкам приводило к увеличению 9 из 15 индексов сенсомоторного развития у крысят II гр. по сравнению с аналогичными индексами у животных контрольной I гр. Аналогичное введение пептида КК1 курившим самкам не выявило существенных отличий среднего ИССМР ($16,39 \pm 0,61$) по сравнению с ИССМР крысят I гр. ($16,18 \pm 1,08$).

Таким образом, у крысят, родившихся от пассивно куривших самок, по сравнению с животными, родившимися от некуривших крыс, установлено снижение массы крысят, а также отставание своевременности соматического и сенсомоторного развития. Введение пептида КК1 некурившим самкам повышает выживаемость, ИССР и ИССМР у крысят.

Параллельно исследованию физиологических тестов проведено изучение иммунологических параметров крысят всех групп на 21 день от рождения, при этом в качестве контроля были использованы показатели крысят I гр., родившихся от некуривших крыс. Выявлено отсутствие значимых изменений числа лейкоцитов у крысят всех исследуемых групп. У опытных крысят III гр., родившихся от пассивно куривших самок, по сравнению с контролем, установлено снижение массы тимуса, числа тимоцитов

и спленоцитов при увеличении содержания ЦИК (табл. 1). Введение некурившим крысам пептида КК1 не приводило к существенным изменениям иммунологических параметров у крысят II гр. При введении беременным курившим самкам пептида КК1 у родившихся крысят IV гр. также отмечено снижение массы тимуса, количества тимоцитов и спленоцитов при увеличении содержания ЦИК.

Анализ количества ИФН γ , продуцируемого спленоцитами обследованных крысят, выявил тенденцию к снижению спонтанной продукции ИФН γ у животных II гр. [$162,3$ ($157,5-180,2$) пг/мл] по сравнению с аналогичным показателем у крысят I гр. [$179,0$ ($176,6-181,4$) пг/мл]. Установлено значимое снижение индуцированной продукции ИФН γ у спленоцитов крысят II гр. [$181,4$ ($173-186,8$) пг/мл] по сравнению с крысятами I гр. [$200,5$ ($185,5-229,7$) пг/мл].

Выявлено достоверное снижение спонтанной продукции ИЛ-6 спленоцитами крысят IV гр. [$50,0$ ($38,9-55,1$) пг/мл] по сравнению с аналогичным показателем у животных I гр. [$67,9$ ($51,6-75,2$) пг/мл]. Анализ индуцированной продукции ИЛ-6 спленоцитами показал тенденцию к снижению данного показателя у животных II группы [$75,3$ ($68,5-118,4$) пг/мл] соответственно по сравнению с аналогичным показателем у крысят I гр. [$91,7$ ($72,2-107,1$) пг/мл].

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали в пользу развития индуцированного варианта вторичного иммунодефицита у крысят, родившихся от пассивно куривших крыс во время беременности. Введение пептида КК1 некурившим крысам существенно не изменяло иммунологические параметры крысят. Напротив, введение пептида КК1 курившим беременным крысам сопровождалось изменениями количества клеток в лимфоидных органах и продукции цитокинов спленоцитами у родившихся крысят.

Таблица 1

Иммунологические параметры периферической крови и лимфоидных органов крысят Вистар (Ме, 25-й и 75-й процентиль)

Группа крысят	Лейкоциты, 10^9	Масса тимуса (мг)	Тимоциты ($\times 10^6$)	Масса селезенки (мг)	Спленоциты ($\times 10^6$)	Миело-карициты, 10^6 /орган	ЦИК, ЕД ОП
I (n=18)	4,0 [3,8; 4,6]	126 [117; 137]	167 [145; 173]	95 [84; 111]	118 [108; 137]	25 [22; 28]	25,5 [17; 45]
II (n=12)	5,7 [4,1; 7,0]	113 [90; 124]	175 [150; 221]	75 [66; 100]	98 [95; 102]	21 [18; 23]	26 [14; 30]
III (n=12)	3,6 [3,2; 4,9]	95* [92; 110]	130* [115; 135]	103 [94; 107]	98* [88; 110]	21 [20; 25]	54,5* [35; 64,5]
IV (n=10)	4,4 [3,6; 5,4]	84* [71; 92]	100* [96; 111]	106 [103; 116]	98* [90; 101]	22 [13; 27]	55,5* [47; 64,5]

Примечание: * обозначены достоверные отличия ($p < 0,05$) показателей.

При обсуждении полученных результатов важно отметить, что эндогенная интоксикация самок крыс, вызываемая пассивным курением, обладает отрицательным воздействием как на клеточные сосудистые образования головного мозга с развитием церебральных дисфункций, так и на развитие иммунной системы. В основе выявленных нарушений своевременности соматического и сенсомоторного развития, а также изменений иммунологических параметров может лежать внутриутробная гипоксия и фетоплацентарная недостаточность. В пользу данного предположения свидетельствуют данные литературы о том, что внутриутробная гипоксия связана с повышением концентрации карбоксигемоглобина, содержащегося в табачном дыме, и с вазоконстрикторным действием никотина, вызывающим снижение плацентарного кровотока [8]. Фетоплацентарная недостаточность, возникающая под действием табачного дыма, способствует задержке внутриутробного развития, что проявляется в будущем в снижении массы тела у потомства [7]. Известно, что при действии токсикантов табачного дыма в наибольшей степени страдает лимфоидная линия клеток, так как их полигидроокисленные метаболиты аккумулируются в костном мозге и лимфоидных органах, вызывая гипоплазию центральных и периферических органов иммунитета. Видимый признак такого явления – это уменьшение клеточности в органах кроветворения и лимфоидных органах (селезенка, тимус), что установлено в настоящей работе. В основе положительной тенденции сдвигов физиологических и иммунологических параметров при воздействии пептида КК1 лежит возможное снижение последствий токсического действия табачного дыма за счет противовоспалительного и ноотропного эффекта данных препаратов [5].

Практическая значимость работы заключается в создании экспериментальной модели оценки влияния тетрапептида КК1 на физиологические и иммунологические параметры крысят, родившихся от пассивно куривших самок. Данная работа может являться основанием для создания модели оценки нарушений иммунной системы и разработки методологии с ее использованием при определении эффективности новых иммуномодуляторов у экспериментальных животных.

Список литературы / References

1. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. – Челябинск: ЧГПУ, 2000. – С. 167.
Volchegorsky I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Tseilikman V.E. [Experimental modeling and laboratory evaluation of adaptive reactions of the organism]. Chelyabinsk : Chelyabinsk state pedagogical University, 2000. P.167. Russian.
2. Дейко Р.Д., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Симбирцев А.С. Церебропротекторные свойства и протеолитическая устойчивость пептидов, гомологичных первичной последовательности участка АКТГ15-18 (экспериментальное исследование) // Цитокины и воспаление. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 65-69.
Deiko R.D., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A., Simbirtsev A.S. Cerebroprotective properties of the original peptides homologous to ACTH15-18 primary sequence (experimental study). Cytokines and Inflammation, 2015, No. 14, P. 65-69. Russian.
3. Захарчук Н.В., Невзорова В.А., Шуматов В.Б., Шестакова Н.В., Гончар Е.Ю. Субстанция в механизмах развития церебральной дисфункции при хроническом табакокурении // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2016. – № 2. – С. 62-66.
Zakharchuk N.V., Nevzorova V.A., Shumatov V.B., Shestakova N.V., Gonchar E.Yu. [Substance P in the mechanisms of the development of cerebral dysfunction in chronic tobacco Smoking] // Pacific medical journal. 2016. No. 2. P. 62-66. Russian.
4. Кудина О.В., Штрыголь С.Ю., Колобов А.А., Ларьяновская Ю.Б. Влияние олигопептидов - гомологов фрагмента актг15-18 на состояние печени и надпочечников крыс на модели острого иммобилизационного стресса // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т. 15, № 4. – С. 30-37.
Kudina O.V., Shtrygol S.Yu., Kolobov A.A., Laryanovskaya Yu.B. The influence of oligopeptides - the homologues of ACTH15-18 on the liver and adrenal glands in the rats on the model of acute immobilization stress. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy, 2017, Vol. 15, No. 4, P. 30-37. Russian.
5. Толкач П.Г., Башарин В.А., Гребенюк А.Н., Колобов А.А. Оценка эффективности пептида КК1 для профилактики отдаленных нарушений функций центральной нервной системы после тяжелой интоксикации оксидом углерода в эксперименте // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2015. – Т. 13. – № 3. – С. 29-34.
Tolkach P.G., Basharin V.A., Grebenyuk A.N., Kolobov A.A. [Experimental assessment of the KK1 peptide effectiveness for prevention of CNS delayed impairments after acute intoxication with carbon monoxide]// Reviews of clinical pharmacology and drug therapy, 2015. – Vol.13. No. 3, P. 29-34. Russian.
6. Толкач П.Г., Башарин В.А., Соловьева Т.С., Слуцкая Д.Р. Сравнительная эффективность нейропептидов КК1 и семакса для терапии поражений центральной нервной системы после тяжелого отравления оксидом углерода // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2016. – № 2 (54). – С. 131-137.
Tolkach P.G., Basharin A.V., Solovyeva T.S., Slutskey D.R. [Comparative effectiveness of neuropeptides KK1 and semax for therapy impairment of central nervous system after acute intoxication of carbon monoxide]//Vestnik of Russian military medical Academy. 2016. No. 2 (54). P. 131-137. Russian.
7. Тюлькова Е.И., Ватаева Л.А., Самойлов М.О., Отеллин В.А. Механизмы формирования реакций мозга на действие гипобарической гипоксии в различные сроки пренатального периода развития у крыс // Журнал акушерства и женских болезней. – 2010. – Т. LIX, № 4. – С. 99-110.

Tiul'kova E.I., Vataeva L.A., Samoïlov M.O., Otellin V.A. [The mechanisms of hypobaric hypoxia-induced alteration in brain development influence of gestational age at exposure]// Journal of obstetrics and women's diseases. 2010. T. LIX. No. 4. P. 99-110. Russian.

8. Strzelak, A., Ratajczak, A., Adamiec, A., & Feleszko, W. (2018). Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15(5), 1033.

Сведения об авторах:

Смолягин Александр Иванович, д.м.н., профессор, заслуженный работник высшей школы РФ, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6, тел. 8(922)8294793; e-mail: probllab.orenburg@mail.ru.

Симбирцев Андрей Семенович, член-корреспондент РАН, профессор ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России.

Михайлова Ирина Валерьевна, д.б.н., доцент, заведующий кафедрой фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ермолина Евгения Вячеславовна, к.б.н., биолог иммунологической лаборатории Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Исенгулова Айнагуль Акимкиреевна, к.м.н., доцент, доцент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Пушкарева Людмила Анатольевна, аспирант кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Кузьмичева Наталья Александровна, старший преподаватель кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Филиппова Юлия Владимировна, к.м.н., доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Чайникова Ирина Николаевна, д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Мирошниченко Игорь Васильевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Автор для переписки

Смолягин Александр Иванович, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6, тел. 8(922)8294793; e-mail: probllab.orenburg@mail.ru.

Н.С. Чепурнова¹, О.Н. Бирко^{1,2}, Я.А. Юцковская², Л.В. Герасименко¹, Д.Е. Русанова¹,
А.Г. Петухова¹, Е.В. Маркелова¹

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ЦИТОКИНОВ У ЖЕНЩИН РАЗНОГО ВОЗРАСТА

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской
Федерации (г. Владивосток);

²ООО «Профессорская клиника Юцковских» (г. Владивосток)

Резюме. В статье представлены результаты исследования цитокинового профиля сыворотки венозной крови 100 практически здоровых женщин разных возрастных групп (ИЛ-1β, ФНО-α, ИФН-γ, ИЛ-4 и ИЛ-10), проведенного методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Показано относительное превалирование Th 1 типа ответа у практически здоровых женщин в пожилом возрасте, что отражает напряженность иммунных реакций против внутриклеточных патогенов и свидетельствует об усилении процессов гиперчувствительности замедленного типа. Выявленные особенности требуют дальнейшего изучения, в том числе с учетом гормональной регуляции.

Ключевые слова: цитокины, фенотип иммунного ответа, практически здоровые женщины.

Образец цитирования: Чепурнова Н.С., Бирко О.Н., Юцковская Я.А., Герасименко Л.В., Русанова Д.Е., Петухова А.Г., Маркелова Е.В. Состояние системы цитокинов у женщин разного возраста // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 80-84.

N.S. Chepurnova¹, O.N. Birko^{1,2}, Ya.A. Yutskovskaya², L.V. Gerasimenko¹, D.E. Rusanova¹,
A.G. Petukhova¹, E.V. Markelova¹

THE STATE OF THE CYTOKINE SYSTEM IN WOMEN OF DIFFERENT AGES

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pacific State Medical University»
of the Ministry of Health of the Russian Federation (Vladivostok);

²LLC «Professor's Clinic of the Yutskovskis» (Vladivostok)

Resume. The article presents the results of a study of the cytokine profile of venous blood serum of 100 practically healthy women of different age groups (IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-4 and IL-10), conducted by the sandwich variant of solid-phase enzyme immunoassay. The relative prevalence of Th 1 type of response in practically healthy women in old age is shown, which reflects the intensity of immune reactions against intracellular pathogens and indicates an increase in delayed hypersensitivity processes. The identified features require further study, including taking into account hormonal regulation.

Keywords: cytokines, immune response phenotype, practically healthy women.

В настоящее время практически в каждой медицинской специальности обсуждается раннее старение организма и роль возраст-зависимых заболеваний в его основе. В этой связи возрастает значение своевременного выявления и персонализированной коррекции иммунной дисфункции, поскольку ученые убеждены, что именно фенотипам иммунного ответа принадлежит главная роль в патогенезе старения организма.

В настоящее время рассматривают основные четыре типа адаптивного иммунного ответа, которые регулируются разными популяциями Т-лимфоцитов, а именно, Th 1, Th 2, Th 17 и Т-регуляторными клетками [2; 8], в основу классификации положено

два признака – набор транскрипционных факторов и индуцируемых ими цитокинов. Th 1 типа имеют транскрипционный фактор Tbet и продуцируют ИФН-γ, ФНО-α и ИЛ-2, Th 1 иммунный ответ важен для борьбы с внутриклеточными бактериями, вирусами, грибами, в противоопухолевой защите. Th 2 лимфоциты активируются через транскрипционный фактор Gata 3, продуцируют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-10 и важны в защите от гельминтов и простейших. Характерным для Th 17 типа лимфоцитов транскрипционным фактором является RORγt, передача сигнала через который опосредует продукцию ИЛ-17 и ИЛ-22, необходимых для уничтожения внеклеточных бактерий. При превалировании Th 17 типа иммунного ответа

активируются нейтрофилы и эпителиальные клетки [8]. Th 17 клетки продуцируют ИЛ-17 А, ИЛ-17 F и ИЛ-22, которые привлекают нейтрофилы и активируют синтез антимикробных пептидов в клетках эпителия [3]. Считается, что иммунный ответ, развивающийся по Th 17 типу, наиболее важен на начальных этапах тканевого воспаления и защиты слизистых. Однако при его гиперактивации возможно развитие аутоиммунных реакций [2; 5]. Т-регуляторные клетки контролируют все формы ответа, имеют транскрипционный фактор Foxp 3, продуцируют ИЛ-10 и ТФРβ. Следует отметить, что классификация цитокинов затруднена из-за перекреста и многогранности функций многих из них [8; 6].

Целью исследования явилось изучение сыровоточных уровней провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у женщин разных возрастных групп для определения преобладающего типа иммунного ответа.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужила сыровотка крови 100 практически здоровых женщин, которые были распределены на 3 подгруппы в зависимости от возраста (ВОЗ): 18-44 (молодой возраст) – 30 человек, 45-59 (средний возраст) – 40 человек, 60-74 (пожилой возраст) – 30 человек. Определение уровня ИЛ-1β, ФНО-α, ИФН-γ, ИЛ-4 и ИЛ-10 в сыровотке крови проводили с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (USA) методом сандвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа, согласно прилагаемым инструкциям. Учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Расчет количества цитокинов проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Количество выражали в пг/мл. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ Statistica 10 и R. Данные представляли в виде медианы и двух квартилей (Ме,

Q25, Q75). Внутри- и межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна-Уитни в рамках прикладной программы. Уровень доверительной вероятности был задан равным 95 %, т.е. нулевые гипотезы отвергались в том случае, когда достигнутый уровень значимости Р используемого статистического критерия принимал значения менее 5 %. Объем выполненных исследований позволял оценить результаты с достоверностью 95-99 % при использовании соответствующих статистических методов.

Результаты и обсуждение

При исследовании уровня провоспалительных цитокинов обнаружено повышение значений ИЛ-1β и ФНО-α у пациенток пожилого возраста по сравнению с группами молодого и среднего возраста ($p < 0,05$, табл. 1). Уровень ИФН-γ во всех возрастных группах женщин статистически значимо не отличался.

Определены разнонаправленные изменения содержания противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у обследованных женщин. Так, уровень ИЛ-10 был самым высоким у женщин в возрасте от 45 до 59 лет ($p < 0,001$, табл. 2). Самые низкие значения ИЛ-10 обнаружены у пациенток в возрасте от 60 до 74 лет ($p < 0,05$, табл. 2).

Уровень ИЛ-4 также был самым высоким в возрастной группе женщин от 45 до 59 лет ($p < 0,05$), а самые низкие его значения выявлены в третьей возрастной группе (табл. 2). Анализ удельного веса цитокинов в сыворотке крови у обследованных женщин показал повышение доли ИЛ-1β и ФНО-α в профиле в группах женщин в возрасте от 60 до 74 лет. Уровни ИЛ-4 и ИЛ-10 в этих возрастных группах, напротив, снижались: ИЛ-4 – также в 2 раза, а ИЛ-10 – в 8 раз.

При сравнении показателей цитокинового профиля сывороток крови женщин, включенных в исследование, с данными, опубликованными другими авторами, в том числе с исследованиями, проводившимися в Приморском крае, были установлены некоторые отличия, что, по нашему мнению, в опре-

Таблица 1

Содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови у обследованных женщин в зависимости от возраста

№	Показатели Ме; Q25; Q75 пг/мл	30-44 года n=30	45-59 года n=40	60-74 лет n=30
		1	2	3
1	ИЛ-1β	1,1 (0,7; 3,0) $p_{1-3} < 0,05$	1,22 (0,79; 4,38) $p_{2-3} < 0,05$	3,29 (0,77; 7,25)
2	ФНО-α	2,0 (0,95; 4,38) $p_{1-3} < 0,05$	2,84 (1,32; 9,04) $p_{2-3} < 0,05$	7,20 (2,26; 19,89)
5	ИФН-γ	13,36 (4,06; 19,80)	15,24 (5,62; 19,84)	16,20 (1,46; 28,50)

Примечание: $p_{1,2,3}$ – сравниваемые группы (указаны только статистически значимые различия).

деленной мере может быть связано с гендерными и возрастными отличиями практически здоровых людей. Но так как в исследование Сайбель А.В. (2013) [7] были включены только женщины, но в возрасте от 30 до 59 лет, а в ряде источников возраст контрольной группы не указан, в большей мере выявленные различия связываем с возрастными изменениями. Для анализа влияния этого фактора мы распределили женщин на группы молодого, среднего и пожилого возраста и сравнили показатели цитокинового профиля. Данные представлены в табл. 3. Было зафиксировано, что уровень ИЛ-1 β сопоставим с данными, полученными Е.В. Маркеловой с соавт. (2016) [4], Е.П. Турмовой с соавт. (2017) [1] и О.С. Слеповой

с соавт. (2016, в старшей возрастной группе) [9], но ниже значений пациентов О.С. Слеповой с соавт. (2016) в возрасте 26,6 $\pm$ 5 лет (табл. 3). ФНО- α был выше значений, полученных А.В. Сайбель с соавт. (2013) [7] и Е.В. Маркеловой с соавт. (2016, $p<0,05$) [4], за счет выраженной вариативности индивидуальных результатов. Уровни ИФН- γ были сопоставимы с данными, полученными в ходе исследований А.В. Сайбель с соавт. (2013), Е.В. Маркеловой с соавт. (2016) [4], но оказались более высокими по сравнению с результатами Е.П. Турмовой с соавт. (2017) [1]. Не определено существенных различий в уровне ИЛ-4 по сравнению с данными литературы (табл. 3). Значения ИЛ-10 в группах настоящего исследова-

Таблица 2

Содержание противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови у обследованных женщин в зависимости от возраста

№	Показатели Ме; Q ₂₅ ; Q ₇₅ пг/мл	30-44 года n=30	45-59 лет n=40	60-74 года n=30
		1	2	3
1	ИЛ-10	6,3 (1,86; 10,83) $p_{1-3}<0,05$	7,4 (2,02; 19,00) $p_{2-3}<0,001$	2,37 (0,89; 4,01)
2	ИЛ-4	11,00 (3,64; 14,50) $p_{1-2}<0,05$	14,85 (4,00; 18,86) $p_{2-3}<0,05$	9,60 (1,80; 12,00)

Примечание: $p_{1,2,3}$ – сравниваемые группы (указаны только статистически значимые различия).

Таблица 3

Сравнительные результаты показателей цитокинового профиля сыворотки крови обследуемых женщин и данных других авторов

№ п/п	Показатели пг/мл	Контрольная группа					Обследованные женщины n=100 ME (Q ₂₅ ; Q ₇₅)
		Сайбель А.В. с соавт., 2013; ME (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	Маркелова Е.В. с соавт., 2017; ME (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	Турмова Е.П. с соавт., 2017; ME (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	Слепова О.С. с соавт., 2016; M±σ		
					Возраст 26,6±5 лет	Возраст 69,3±3 года	
		1	2	3	4	5	6
1	ИЛ-1β	–	1,09 (1,23; 2,37) p ₂₋₄ <0,05	1,2 (0,5; 9,2) p ₃₋₄ <0,05	17,5±5,5	0,65±0,5 p ₄₋₅ =0,04	1,72 (0,70; 4,18) p ₄₋₆ <0,05
2	ФНО-α	3,83 (2,19;6,67)	3,83 (2,19;6,67) p ₂₋₆ <0,05	4,8 (2,2; 7,9)	–	–	4,94 (1,26; 19,89)↑ p ₁₋₆ <0,05
3	ИФН-γ	12,52 (7,4;27,52)	–	5,5 (3,8; 14,5) p ₃₋₆ <0,05	–	–	14,58 (4,16; 24,80)
4	ИЛ-10	11,77 (4,70;23,19) p ₁₋₃ <0,01 p ₁₋₄ <0,001 p ₁₋₅ <0,01	8,17 (4,61; 11,87) p ₂₋₃ <0,05 p ₂₋₄ <0,05 p ₂₋₅ <0,05	36,7 (20,7; 60,1) p ₃₋₄ <0,001 p ₃₋₅ <0,001	2,6±1,4	3,2±1,5	5,45 (2,66; 13,58) p ₁₋₆ <0,05 p ₃₋₆ <0,05
5	ИЛ-4	9,28 (5,0;10,60)	–	–	–	–	10,2 (3,0; 16,35)

Примечание: $p_{1,2,3,4,5,6}$ – сравниваемые группы (указаны только статистически значимые различия).

**Соотношения регуляторных коэффициентов в сыворотке венозной крови
практически здоровых женщин**

Коэффициент	30-44 года n=30	45-59 лет n=40	60-74 года n=30
	1	2	3
ИФН-γ/ИЛ-4	1,21±0,1	1,06±0,13	1,68±0,32
ФНО-α +ИФН-γ/ИЛ-10+ИЛ-4	0,88±0,2	0,84±0,14	2,12±0,54 p ₁₋₃ <0,01 p ₂₋₃ <0,01

Примечание: p_{1,2,3} – сравниваемые группы (указаны только статистически значимые различия).

ния были в 6 раз ниже данных Турмовой Е.П. с соавт. (2017, p<0,01) [1] и в 1,5 раза ниже представленных А.В. Сайбель с соавт. (2013, p<0,05) [7], но не отличались от результатов О.С. Слеповой с соавт. (2016) (табл. 3) [9]. Таким образом, проведенный анализ позволяет констатировать, что показатели цитокинового профиля у женщин сопряжены с возрастом. У женщин пожилого возраста выявлено повышение сывороточной концентрации ИЛ-1β, ФНО-α на фоне снижения ИЛ-4 и дефицита ИЛ-10. Для определения фенотипа иммунного ответа у обследованных женщин нами были исследованы регуляторные коэффициенты соотношения ИФН-γ/ИЛ-4, а также ФНО-α+ИФН-γ/ИЛ-10+ИЛ-4. Так, уровень регуляторного коэффициента ИФН-γ/ИЛ-10 в сыворотке венозной крови во всех возрастных группах был сопоставим (табл. 4). При исследовании регуляторного коэффициента ФНО-α+ИФН-γ/ИЛ-10 нами зафиксировано повышение его уровня в 2,4 раза у практически здоровых женщин в группе пожилого возраста в сравнении с остальными группами женщин (p<0,01).

Подводя итоги, нами было установлено, что именно в группе женщин пожилого возраста в большей степени превалирует Th 1 тип иммунного ответа, который играет важную роль в развитии реакций клеточного иммунитета, направленных против внутриклеточных патогенов, в то же время участвует в реакциях гиперчувствительности замедленного типа. Это указывает на то, что в разном возрастном периоде интенсивность Th 1 фенотипа разная и зависит от ряда причин, в том числе гормональной регуляции. Показано относительное превалирование Th 1 типа ответа у практически здоровых женщин, однако в пожилом возрасте девиация иммунного ответа с преобладанием Th 1 фенотипа усиливается. Это, с одной стороны, отражает напряженность иммунных реакций против внутриклеточных патогенов, с другой стороны, свидетельствует об усилении процессов гиперчувствительности замедленного типа. Выявленные особенности требуют дальнейшего изучения, в том числе с учетом гормональной регуляции.

Список литературы / References

1. Атеросклероз: иммуногенетические и метаболические аспекты патогенеза: монография / Е.П. Турмова [и др.]. – Владивосток: Медицина ДВ, 2017. – 172 с.
2. Иммунология: Учебник для студентов / А.А. Ярилин. – Москва: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – 749 с.
3. Караулов А.В. Микрофлора, колонизационная резистентность слизистых и мукозальный иммунитет / А.В. Караулов, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, Е.А. Воропаева и др. // Иммунология. – 2015. – № 5. – С. 290-294.
4. Клинико-иммунологические аспекты глаукомной оптической нейропатии: Монография / Под ред. Е.В. Маркеловой [и др.]. – Владивосток: Медицина ДВ, 2017. – 204 с.
5. Козлов В.А. Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов / В.А. Козлов, Е.П. Тихонова, А.А. Савченко и др. – Красноярск: Издательство Поликор, 2021. – 576 с.
6. Козлов В.А. Очерки о функциональной настроенности иммунной системы / В.А. Козлов. – Красноярск: Версо, 2022. – 252 с.
7. Сайбель А.В. Клинико-иммунологическая характеристика хронической рецидивирующей и латентной герпетической инфекции и обоснование алгоритма ботулинотерапии на ее фоне: Автор. дис. ... к-та мед. наук / А.В. Сайбель; Тихоокеан. гос. мед. ун-т. – Владивосток: [б. и.], 2013. – 22 с.
8. Симбирцев А.С. Иммунофармакологические аспекты системы цитокинов / А.С. Симбирцев // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 84-95.
9. Слепова О.С. Цитокины в слезной жидкости и сыворотке крови как ранние биомаркеры возрастной макулярной дегенерации / О.С. Слепова, Е.А. Еремеева, М.В. Рябина, Е.С. Сорожкина // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 245-252.

Сведения об авторах:

Чепурнова Наталья Сергеевна, к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2); тел. 8-914-960-60-06; e-mail: dr.cns@yandex.ru.

Бирко Оксана Николаевна, лаборант Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 5); врач-дерматолог, косметолог ООО «Профессорская клиника Юцковских» (690001, г. Владивосток, ул. Металлистов, 3).

Юцковская Яна Александровна, д.м.н., профессор, врач-дерматолог, косметолог ООО «Профессорская клиника Юцковских» (690001, г. Владивосток, ул. Металлистов, 3).

Герасименко Лилия Владимировна, студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2).

Русанова Диана Евгеньевна, студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный

медицинский университет» Минздрава России (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2).

Петухова Антонина Глебовна, студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2).

Маркелова Елена Владимировна, д.м.н., профессор, зав. каф. нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2).

Автор для переписки

Маркелова Елена Владимировна, Тихоокеанский государственный медицинский университет, 690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2; e-mail: markev2010@mail.ru.