

2024

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Иллюстрация к статье «Эффект введения пробиотической бактерии *Akkermansia muciniphila* в норме и при DSS-индуцированном воспалении у мышей» (авторы: А.Д. Шейнова, О.А. Подсокорская, Е.О. Губернаторова) (с. 564–568)

Illustration for the article “The effect of the probiotic bacteria *Akkermansia muciniphila* in intestinal homeostasis and DSS-induced inflammation in mice” (authors: Sheynova A.D., Podosokorskaya O.A., Gubernatorova E.O.) (pp. 564–568)

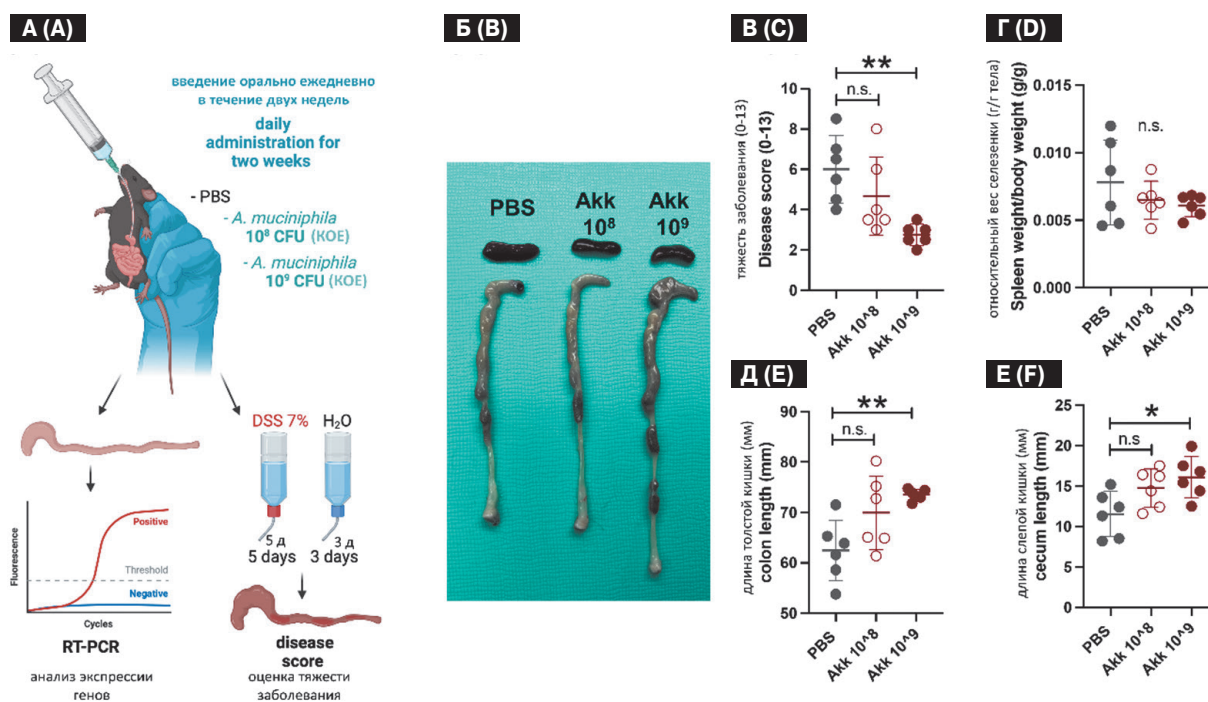


Рисунок 1. Пероральное введение *A. muciniphila* в дозе 10⁹ CFU защищает мышей от индукции острого колита
Figure 1. Oral administration of *A. muciniphila* at a dose of 10⁹ CFU protects mice from the induction of acute colitis

Примечание. А. Схема эксперимента по определению влияния *A. muciniphila* на чувствительность к индукции острого колита. Мышей разделяли на три группы по 12 особей, а затем ежедневно перорально вводили PBS, 10⁸ CFU *A. muciniphila* или 10⁹ CFU *A. muciniphila* в течение 2-х недель. На 14-й день 6 особей из каждой группы терминировали, из комплекса толстой и слепой кишки выделяли РНК и проводили анализ экспрессии генов. Оставшихся мышей подвергали индукции острого колита добавлением 7% DSS в питьевую воду в течение пяти дней, на 8-й день после начала индукции колита животных терминировали и проводили морфометрическую оценку тяжести заболевания. Б. Репрезентативное фото комплекса толстого кишечника и слепой кишки. В. Оценка тяжести индуцированного колита (0–13), рассчитываемая как сумма выраженности ректального кровотечения и консистенции фекалий. Г. Отношение веса селезенки к весу мыши. Д. Длина толстого кишечника. Е. Длина слепой кишки у мышей, принимавших PBS, 10⁸ CFU *A. muciniphila* и 10⁹ CFU *A. muciniphila* на 8-й день после цикла DSS. *p < 0,05, **p < 0,01, n.s. (non-significant) — недостоверная разница. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Note. A. Design of experiment to determine the effect of *A. muciniphila* on sensitivity of acute colitis. Mice were divided into three groups of 12 and then given PBS, 10⁸ CFU *A. muciniphila*, or 10⁹ CFU *A. muciniphila* orally daily for 2 weeks. On day 14, 6 individuals from each group were sacrificed, RNA was isolated from the colon tissues, and gene expression analysis was performed. The remaining mice were subjected to the induction of acute colitis by adding 7% DSS to drinking water for five days; on the 8th day after the onset of colitis induction, the animals were sacrificed and the disease score was performed. B. Representative photo of the colon and cecum complex. C. Disease score (0–13), calculated as the sum of the severity of rectal bleeding and the consistency of feces. D. Ratio of spleen weight to mouse weight. E. Length of the large intestine. F. Length of the cecum in mice treated with PBS, 10⁸ CFU *A. muciniphila*, and 10⁹ CFU *A. muciniphila* on day 8 after the DSS cycle. *p < 0.05, **p < 0.01, n.s. (non-significant) — unreliable difference. Data are presented as mean and standard deviation.

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

май–июнь

2024, том 14

№ 3

Журнал издается при участии Отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов,
микробиологов и паразитологов по Санкт-Петербургу и Ленинградской области

Главный редактор

Тотоян Арег А. д.б.н., профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Заместитель главного редактора

Мокроусов И.В. д.б.н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

- Апт А.С.** д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза, Москва, Россия
Барбеито Л. д.м.н., профессор, зав. лабораторией нейродегенерации Института Пастера, Монтевидео, Уругвай
Брей П. д.б.н., профессор, зав. лабораторией медицинской энтомологии и биологии переносчиков болезней Института Пастера в Лаосе, Вьентьян, Лаос
Гинцбург А.Л. д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
Лаврентьева И.Н. д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Лобзин Ю.В. д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
Лоузир Э. профессор, президент Института Пастера Туниса, Тунис
Львов Д.К. д.м.н., профессор, академик РАН, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
Маеда К. д.вет.н., профессор, директор Национального института инфекционных заболеваний, Токио, Япония
Медуницын Н.В. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия
Михайлов М.И. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Российского университета дружбы народов, Москва, Россия
Найденски Х. д.м.н., профессор, зав. отделом инфекционной микробиологии Института микробиологии им. Стефана Ангеловфа, София, Болгария
Онищенко Г.Г. д.м.н., профессор, академик РАН, зам. председателя Российской академии образования, Москва, Россия
Покровский В.В. д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель Федерального НМЦ по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва, Россия
Сантони А. зам. директора по научной работе Института Пастера в Риме, профессор иммунологии и иммунопатологии отдела молекулярной медицины Университета Сапиенца в Риме, Рим, Италия
Симбирцев А.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
Фрейдлин И.С. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
Черешнев В.А. д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель Института иммунологии и физиологии, Екатеринбург, Россия
Шпигель А. д.м.н., профессор, директор Института Пастера Камбоджи, Пномпень, Камбоджа

Редакционный совет

Алешкин В.А.	д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия
Бухарин О.В.	д.м.н., профессор, академик РАН, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург, Россия
Вишневский Б.И.	д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия
Долгушин И.И.	д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Южно-Уральского государственного медицинского университета, Челябинск, Россия
Зверев В.В.	д.б.н., профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
Кафтырева Л.А.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Кашкин К.П.	д.м.н., профессор, академик РАН, профессор кафедры иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования МЗ РФ, Москва, Россия
Кубарь О.И.	д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
Малеев В.В.	д.м.н., профессор, академик РАН, советник директора Центрального НИИ эпидемиологии, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия
Савичева А.М.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
Сельков С.А.	д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
Тец В.В.	д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
Харит С.М.	д.м.н., профессор, руководитель отдела профилактики инфекционных заболеваний ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
Чекнев С.Б.	д.м.н., зам. директора по научной работе ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, зав. лабораторией межклеточных взаимодействий, Москва, Россия
Шкарин В.В.	д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Нижегородской государственной медицинской академии, зав. кафедрой эпидемиологии, Нижний Новгород, Россия

Ответственный секретарь: Ракитянская Н.В. (Санкт-Петербург)
Редактор перевода: Исаков Д.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)
Выпускающий редактор: Мурадян А.Я., к.м.н. (Санкт-Петербург)
Редактор электронной версии: Ерофеева В.С. (Санкт-Петербург)

Учредители

Северо-Западное отделение медицинских наук
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
Санкт-Петербургское региональное отделение Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов

Журнал зарегистрирован Управлением Федеральной службы по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций по Санкт-Петербургу и Ленинградской области
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00578 от 26 апреля 2010 г.
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00910 от 24 июня 2011 г.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77–64788 от 02 февраля 2016 г.

Электронная версия журнала: www.iimmun.ru и www.elibrary.ru

С 2012 года журнал «Инфекция и иммунитет» входит в Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук

С 2014 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Ulrich's Periodicals Directory

С 2016 года включен в базу данных Russian Science Citation Index (RSCI), интегрированную с платформой Web of Science

С 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

С 2017 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Scopus

Адрес редакции:
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: (812) 233-08-58.

Издательство НИИЭМ имени Пастера
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел./факс: (812) 644-63-11.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Типография ООО «Аллегро»
196084, Санкт-Петербург,
наб. Обводного канала, 88, литера С,
помещ. 7-Н, оф. 1, 2.
Тел./факс: (812) 388-90-00.

Подписано в печать 24.06.2024 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 29,5.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1101

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2024
© НИИЭМ имени Пастера, 2024
© СПб РО РААКИ, 2024

Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet)

May–June

2024, volume 14

No. 3

The journal is published with the assistance of the Branch of All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists for St. Petersburg and Leningrad Region

Editor-in-chief

Areg A. Totolian DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

Deputy editor-in-chief

Igor V. Mokrousov DSc (Biology), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Russian Federation

Members of editorial board

- Alexander S. Apt** DSc (Biology), Professor, Central Research Institute of Tuberculosis, Head of the Laboratory of Immunogenetics, Moscow, Russian Federation
- Luis Barbeito** MD, PhD, Professor, Institut Pasteur de Montevideo, Head of the Laboratory of Neurodegeneration, Montevideo, Uruguay
- Paul Brey** PhD, Professor, Institut Pasteur du Laos, Director; Laboratory of Medical Entomology and Biology of Disease Vectors, Head, Vientiane, Laos
- Alexander L. Gintzburg** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation
- Irina N. Lavrentieva** DSc (Medicine), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg, Russian Federation
- Yuri V. Lobzin** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation
- Hechmi Louzir** Professor, Institut Pasteur de Tunis, President, Tunis, Tunisia
- Dmitry K. Lvov** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation
- Ken Maeda** PhD, DVM, Professor, National Institute of Infectious Diseases, Director, Tokyo, Japan
- Nikolai V. Medunitsyn** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow, Russian Federation
- Michael I. Michailov** DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Head of the Laboratory of Viral Hepatitis; Peoples' Friendship University of Russia, Head of the Department of Microbiology and Virology, Moscow, Russian Federation
- Hristo Najdenski** PhD, Professor, Institute Stephan Angeloff; Head of the Department of Infectious Microbiology, Sofia, Bulgaria
- Gennadiy G. Onishchenko** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Deputy President of the Russian Academy of Education, Moscow, Russian Federation
- Vadim V. Pokrovskiy** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Head of the Federal AIDS Center, Moscow, Russian Federation
- Angela Santoni** PhD, Professor, Institut Pasteur in Italy — Cenci Bolognetti Foundation, Scientific Director; Full Professor of Immunology and Immunopathology, Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy
- Andrei S. Simbirtsev** DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation
- Irina S. Freidlin** DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Institute of Experimental Medicine, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Valery A. Chereshev** DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology and Physiology, Scientific Director, Yekaterinburg, Russian Federation
- Andre Spiegel** MD, PhD, Professor, Institut Pasteur du Cambodge, Director, Phnom Penh, Cambodia

Members of editorial council

Vladimir A. Aleshkin	DSc (Biology), Professor, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Director, Moscow, Russian Federation
Oleg V. Bukharin	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Scientific Director, Orenburg, Russian Federation
Boris I. Vishnevsky	DSc (Medicine), Professor, Research Institute of Phthisiopulmonology, Head Researcher, Department of Laboratory Diagnostic, St. Petersburg, Russian Federation
Ilija I. Dolgushin	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Chelyabinsk State Medical Academy, President, Moscow, Russian Federation
Vitaly V. Zverev	DSc (Biology), Professor, RAS Full Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Scientific Director, Moscow, Russian Federation; I.M. Sechenov State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Moscow, Russian Federation
Lidiia A. Kaftyreva	DSc (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation
Kirill P. Kashkin	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Professor of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation
Olga I. Kubar	DSc (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
Victor V. Maleev	DSc (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Adviser of the Director, Moscow, Russian Federation
Alevtina M. Savicheva	DSc (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei A. Selkov	DSc (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation
Viktor V. Tets	DSc (Medicine), Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology and Virology, St. Petersburg, Russian Federation
Susanna M. Kharit	DSc (Medicine), Professor, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Head of the Prevention Department of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei B. Cheknev	DSc (Medicine), N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Cellular Interactions, Moscow, Russian Federation
Vyacheslav V. Shkarin	DSc (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, State Medical Academy, President, Head of the Department of Epidemiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Assistant editor: Natalia V. Rakitianskaia (St. Petersburg)

Translation editor: Dmitrii V. Isakov (St. Petersburg)

Copy editor: Aram Ya. Muradyan (St. Petersburg)

Online version editorial manager: Vera S. Erofeeva (St. Petersburg)

Founders

North-West Regional Branch of Medical Sciences

Saint Petersburg Pasteur Institute

Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists, St. Petersburg Regional Branch (SPb RAACI)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass media in Saint Petersburg and Leningrad region

Certificate of registration PI no. TU 78–00578 from April, 26, 2010

Certificate of registration PI no. TU 78–00910 from June, 24, 2011

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media

Certificate of registration PI no. FS 77–64788 from February, 02, 2016

Electronic version: www.iimmun.ru and www.elibrary.ru

Since 2012, the Infection and Immunity journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science

Since 2014 the Infection and Immunity journal is included into international Ulrich's Periodicals Directory database

Since 2016 included in Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science

Since 2016 the Russian Journal of Infection and Immunity is included in Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

Since 2017 the Russian Journal of Infection and Immunity is included into international Scopus database

Editorial Office

197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Тел.: (812) 233-08-58.

Publishing House of St. Petersburg Pasteur Institute

197101, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone/fax: (812) 644-63-11.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Produced at the Allegro Printing House

196084, Russian Federation, St. Petersburg,
Naberezhnaya Obvodnogo Kanala, 88,
build. C, suite 7-H, off. 1, 2.
Phone/fax: (812) 388-90-00.

Passed for printing 24.06.2024. Print format 60 x 90 1/8.

Offset printing. Printed sheets 29,5.

Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet

© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2024

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2024

© SPb RAACI, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Краткие сообщения

Коротаева А.А., Самойлова Е.В., Чепурнова Д.А., Погосова Н.В., Кучиев Д.Т., Палеев Ф.Н.

МОЛЕКУЛЫ-ЛОВУШКИ ИНТЕРЛЕЙКИНА 6 И ИНТЕРЛЕЙКИНА 18 ПРИ COVID-19 411

Оспельникова Т.П., Свитич О.А., Ершов Ф.И.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ИНТЕРФЕРОНОВ ПРИ ГРИППЕ И COVID-19 416

Рассказова Н.Д., Абрамова Н.Д., Сощенко Т.Д., Калужная Н.О., Меремьянина Е.А., Шатохин М.Н., Зайцева Т.А.

**ЭКСПРЕССИЯ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ (IL-18, IL-33) НА УРОВНЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ
ВХОДНЫХ ВОРОТ ИНФЕКЦИИ У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ ЗАБОЛЕВАНИЕ COVID-19 423**

Коробова З.Р., Любимова Н.Е., Арсентьева Н.А., Жебелева М.С., Черных Е.И., Давлетшина В.В.,
Кащенко В.А., Тотолян А.А.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРИ COVID-19 И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ГЕНОВАРИАНТОМ ВИРУСА 429

Радаева О.А., Симбирцев А.С., Искандярова М.С., Негоднова Е.В., Куляпкин В.В., Красноглазова К.А., Еремеев В.В.

**ЦИТОКИНЫ КРОВИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ SARS-CoV-2-АССОЦИИРОВАННОЙ
ПНЕВМОНИИ У ПАЦИЕНТОВ С ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ II СТАДИИ 437**

Зафранская М.М., Нижегородова Д.Б., Шатова О.Г., Русских И.И., Величко А.В., Ванслав М.И., Новицкая С.Ф.,
Денисевич Т.Л., Колядко М.Г., Курлянская Е.К.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ
С ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫМ СЕРДЦЕМ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ИНФЕКЦИИ COVID-19 443**

Бляхер М.С., Федорова И.М., Котелева С.И., Капустин И.В., Тульская Е.А., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е.,
Сандалова С.В., Новикова Л.И., Бочкарева С.С.

**АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ УРОВНЯ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ SARS-CoV-2
И РЕЗУЛЬТАТЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ У НЕВАКЦИНИРОВАННЫХ И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЛЮДЕЙ,
ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19 451**

Ли Ю.А., Дмитраченко М.Н., Маркелова Е.В., Королев И.Б., Костинов М.П., Бондарь Л.И.

**БАЛАНС ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА,
ПРОШЕДШИХ АКТИВНУЮ ИММУНИЗАЦИЮ ОТ SARS-CoV-2 В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19 459**

Астахова Е.А.

**АВИДНОСТЬ ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ СТИМУЛИРОВАННЫХ IN VITRO
В-КЛЕТОК ПАМЯТИ ДОНОРОВ, НЕ МЕНЯЕТСЯ ЧЕРЕЗ МЕСЯЦ ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ СПУТНИКОМ V
ИЛИ COMIRNATY 465**

Бязрова М.Г., Сухова М.М., Михайлов А.А., Романова А.Ф., Юсубалиева Г.М., Филатов А.В.

ПЛАЗМАБЛАСТНЫЙ ОТВЕТ ПРИ ОСТРОЙ SARS-CoV-2-ИНФЕКЦИИ 471

Бердюгина О.В.

ПОСТКОВИДНЫЙ СИНДРОМ: К ДИСКУССИИ О СРОКАХ НАСТУПЛЕНИЯ 476

Москалец О.В.

**ПРОДУКЦИЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ КАК ОТРАЖЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ
МЕХАНИЗМОВ ПРИ ПОСТКОВИДНОМ МИОКАРДИТЕ 483**

Атажахова М.Г., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Поеджаев Е.А.

**ВАРИАТИВНОСТЬ ИЗМЕНЕНИЙ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ
НА ФОНЕ ДЕФИЦИТА IFN α И IFN γ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ,
АССОЦИИРОВАННЫМ С АКТИВАЦИЕЙ ХРОНИЧЕСКИХ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ 488**

Косякова Н.И., Акуленко М.В.

**БРОНХООБСТРУКТИВНЫЙ СИНДРОМ И ФЕРМЕНТЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА
В ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ 495**

Булгакова И.Д., Зверев В.В., Кравцова Е.О., Усатова Г.Н., Шойхет Д.А., Задворных Е.А., Шумкина А.А. ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ МИКРОГЛИИ У МЫШЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВПГ-1	500
Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ким А.Э., Рогожина Л.С. НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ КАК МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИОННОГО И АСЕПТИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ	505
Масленникова И.Л., Некрасова И.В., Старич Эрьявец М., Кузнецова М.В. ВЛИЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ И ИХ ЭКЗОПРОДУКТОВ НА БИОМАССУ БИОПЛЕНКИ, ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ И КОНЪЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС В КЛЕТКИ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	511
Гончарова Е.П., Бец В.Д., Макушева Ю.С., Литвинова Е.А. ВЛИЯНИЕ <i>TRITRICHOMONAS</i> spp. НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ МЫШЕЙ ЛИНИИ Muc2^{-/-} ПОСЛЕ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ	519
Байкузина П.Г., Горбачева Д.В., Апт А.С., Коротецкая М.В. ТЕЧЕНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗА У МЫШЕЙ ГАПЛОТИПА H2^v, АССОЦИИРОВАННОГО СО СВЕРХВЫСОКОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТЬЮ К ИНФЕКЦИИ	525
Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Еремеев В.В. ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ miR-222-3p В КУЛЬТУРЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> МАКРОФАГОВ НЕ ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЯ НА ИХ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ	532
Сальникова М.А., Лебедев Ю.Б. ПРОДОЛЖИТЕЛЬНЫЙ ТРЕКИНГ РЕПЕРТУАРА Т-КЛЕТОК ПОЗВОЛЯЕТ ДЕТЕКТИРОВАТЬ УСТОЙЧИВЫЙ CD4⁺ КЛАСТЕР КЛОНОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИХ К ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКЕ	539
Федорова К.С., Абрамовских К.А., Савочкина А.Ю., Минасова А.А., Зотова М.А., Саматова А.И., Нохрин Д.Ю., Никушкина К.В. СОСТОЯНИЕ БИОЦЕНОЗА ВЛАГАЛИЩА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛАКТОБАКТЕРИЙ	544
Жеребцов А.П., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф., Михайлова Н.А. ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЛАГЕЛЛИНА <i>C PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	551
Шкуратова М.А., Хлынцева А.Е., Калмантаева О.В., Карцев Н.Н., Музуров А.Л., Фирстова В.В. ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ШИГА-ТОКСИН 2 (Stx2) У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ЭШЕРИХИОЗОМ С ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ	557
Шейнова А.Д., Подосокорская О.А., Губернаторова Е.О. ЭФФЕКТ ВВЕДЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ БАКТЕРИИ <i>AKKERMANSIA MUCINIPHILA</i> В НОРМЕ И ПРИ DSS-ИНДУЦИРОВАННОМ ВОСПАЛЕНИИ У МЫШЕЙ	564
Волосникова Е.А., Щербаков Д.Н., Волкова Н.В., Есина Т.И., Зайковская А.В., Шимина Г.Г., Даниленко Е.Д. ИЗУЧЕНИЕ АДЪЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ БЕТА-ГЛЮКАНОВ ИЗ ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	569
Ращупкин И.М., Меледина И.В., Котова М.А., Желтова О.И. ЭКСПРЕССИЯ PD-1 И Tim-3 РАЗЛИЧНЫМИ СУБПОПУЛЯЦИЯМИ МОНОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЧАСТО РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ	575
Гулимов М.К., Калюжная Н.О., Аммура Ю.И., Зверев В.В., Свитич О.А. ДЛИННЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК — РЕГУЛЯТОРЫ КРАСНУШНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПРОТИВОВИРУСНОГО ОТВЕТА	581
Сайдакова Е.В., Королевская Л.Б., Власова В.В., Шмагель Н.Г., Шмагель К.В. ПРИЗНАКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИСТОЩЕНИЯ CD4⁺ И CD8⁺ Т-КЛЕТОК У ВИЧ/ВГС КОИНФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НЕОТВЕТЧИКОВ НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ	586
Котомина Т.С., Сычев И.А., Рак А.Я., Вон П.-Ф., Бажина А.В., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г. КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЛИНЕЙНЫЕ В-КЛЕТОЧНЫЕ ПЕПТИДЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А УСИЛИВАЮТ КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЦЕЛЬНОВИРИОННОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ	593

Рак А.Я., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОНСЕРВАТИВНОСТИ ИММУНОГЕННЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСОВ-ДОНОРОВ ДЛЯ ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН	601
--	------------

Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Любимова Н.Е., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А.

РОЛЬ ХЕМОКИНА CX3CL1/FRACTALKINE ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ В	609
---	------------

Ковалева С.В., Чапурина В.Н., Ломтатидзе Л.В., Лягуша Д.Э., Тетерин Ю.В., Барова Н.К., Мелконян К.И.

СИНТЕТИЧЕСКИЙ ТИМИЧЕСКИЙ ГЕКСАПЕПТИД В КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ И НОРМАЛИЗАЦИИ ПРОФИЛЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ С МЕСТНЫМ НЕОТГРАНИЧЕННЫМ ОСТРЫМ ПЕРИТОНИТОМ	615
--	------------

Халтурина Е.О., Гарскова Н.В., Шеметова А.Д.

ПЕРСониФИЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД К РЕАБИЛИТАЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С КРУГЛОГОДИЧНЫМ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ, СТРАДАЮЩИХ РЕКУРРЕНТНЫМИ ОРВИ И РЕЦИДИВИРУЮЩИМИ ГЕРПЕСВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ	623
--	------------

Правила для авторов	632
----------------------------------	------------

Авторский указатель	635
----------------------------------	------------

Предметный указатель	635
-----------------------------------	------------

CONTENTS

Short communications

<i>Korotaeva A.A., Samoilova E.V., Chepurnova D., Pogosova N.V., Kuchiev D.T., Paleev F.N.</i> IL-6 AND IL-18 CYTOKINE TRAPS IN COVID-19	411
<i>Ospelnikova T.P., Svitich O.A., Ershov F.I.</i> COMPARATIVE ASSESSMENT OF INTERFERON ACTIVITY IN INFLUENZA AND COVID-19	416
<i>Rasskazova N.D., Abramova N.D., Soshchenko T.D., Kalyuzhnaya N.O., Meremyanina E.A., Shatokhin M.N., Zaitseva T.A.</i> EXPRESSION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES (IL-18, IL-33) AT THE LEVEL OF THE MUCOUS MEMBRANE, THE ENTRY POINT OF INFECTION, IN PERSONS WHO HAVE EXPERIENCED COVID-19 DISEASE	423
<i>Korobova Z.R., Liubimova N.E., Arsentieva N.A., Zhebeleva M.S., Chernykh E.I., Davletshina V.V., Kashchenko V.A., Totolian A.A.</i> LABORATORY BLOOD MARKERS IN COVID-19 AND THEIR CONNECTION TO VIRAL VARIANT	429
<i>Radaeva O.A., Simbirtsev A.S., Iskandiyarova M.S., Negodnova E.V., Kulyapkin V.V., Krasnoglazova K.A., Ereemeev V.V.</i> BLOOD CYTOKINES AS POTENTIAL PREDICTORS OF THE DEVELOPMENT OF SARS-CoV-2 ASSOCIATED PNEUMONIA IN PATIENTS WITH STAGE II ESSENTIAL HYPERTENSION	437
<i>Zafranskaya M.M., Nizheharodava D.B., Shatova O.G., Russkih I.I., Velichko A.V., Vanslau M.I., Novitskaya S.F., Denisevich T.L., Kolyadko M.G., Kurlyanskaya E.K.</i> CHARACTERISTICS OF VIRUS-SPECIFIC IMMUNOLOGICAL REACTIONS FOLLOWING COVID-19 VACCINATION IN HEART TRANSPLANT RECIPIENTS	443
<i>Blyakher M.S., Fedorova I.M., Koteleva S.I., Kapustin I.V., Tulskaya E.A., Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I., Bochkareva S.S.</i> ALGORITHM FOR ASSESSING THE LEVEL OF T CELL IMMUNE RESPONSE AGAINST SARS-CoV-2 AND THE RESULTS OF ITS APPLICATION IN UNVACCINATED AND VACCINATED PEOPLE WHO HAVE BEEN INFECTED WITH COVID-19	451
<i>Li Yu.A., Dmitrachenko M.N., Markelova E.V., Korolev I.B., Kostinov M.P., Bondar L.I.</i> BALANCE OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN YOUNG PATIENTS WHO PASSED ACTIVE IMMUNIZATION AGAINST SARS-CoV-2 DURING THE COVID-19 PANDEMIC	459
<i>Astakhova E.A.</i> THE AVIDITY OF VIRUS-SPECIFIC ANTIBODIES OBTAINED FROM <i>IN VITRO</i> STIMULATED MEMORY B CELLS DOES NOT CHANGE ONE MONTH AFTER BOOSTER WITH SPUTNIK V OR COMIRNATY	465
<i>Byazrova M.G., Sukhova M.M., Mikhailov A.A., Romanova A.F., Yusubalieva G.M., Filatov A.V.</i> PLASMA BLAST RESPONSE DURING ACUTE SARS-CoV-2 INFECTION	471
<i>Berdiugina O.V.</i> POST-COVID-19 SYNDROME: A DISCUSSION OF ONSET TIMING	476
<i>Moskaletc O.V.</i> PRODUCTION OF SOME CYTOKINES AS A REFLECTION OF VARIOUS IMMUNOREGULATORY MECHANISMS IN POST-COVID MYOCARDITIS	483
<i>Atazhakhova M.G., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Poezhaev E.A.</i> VARIABILITY OF CHANGES IN PRO AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES DUE TO IFNα AND IFNγ DEFICIENCY IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME ASSOCIATED WITH ACTIVATION OF CHRONIC HERPES VIRAL INFECTIONS	488
<i>Kosyakova N.I., Akulenko M.V.</i> BRONCHO-OBSTRUCTIVE SYNDROME AND THE ENZYMES OF CELLULAR ENERGY METABOLISM AFTER CORONAVIRUS INFECTION	495

<i>Bulgakova I.D., Zverev V.V., Kravtsova E.O., Usatova G.N., Shoichet D.A., Zadvornyykh E.A., Shumkina A.A.</i>	
MICE MICROGLIA CYTOKINE PROFILE CHANGES UNDER THE INFLUENCE OF HSV-1	500
<i>Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Kim A.E., Rogozhina L.S.</i>	
NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS AS MARKERS OF INFECTIOUS AND ASEPTIC INFLAMMATION	505
<i>Maslennikova I.L., Nekrasova I.V., Starčić Erjavec M., Kuznetsova M.V.</i>	
THE INFLUENCE OF NEUTROPHILS AND THEIR EXOPRODUCTS ON BIOFILM BIOMASS, BACTERIAL VIABILITY AND CONJUGATIVE TRANSFER INTO <i>ESCHERICHIA COLI</i>	511
<i>Goncharova E.P., Bets V.D., Makusheva Yu.S., Litvinova E.A.</i>	
IMPACT OF <i>TRITRICHOMONAS</i> SPP. ON THE IMMUNE SYSTEM OF <i>Muc2</i>^{-/-} MICE AFTER ANTIBIOTIC THERAPY	519
<i>Baikuzina P.G., Gorbacheva D.V., Apt A.S., Korotetskaya M.V.</i>	
THE COURSE OF TUBERCULOSIS INFECTION IN HYPER-SUSCEPTIBLE MICE CARRYING THE <i>H2</i>^Y HAPLOTYPE	525
<i>Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Yermeev V.V.</i>	
OVEREXPRESSING <i>miR-222-3p</i> IN CULTURED <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>-INFECTED MACROPHAGES DOES NOT AFFECT THEIR BACTERIOSTATIC ACTIVITY	532
<i>Salnikova M.A., Lebedev Yu.B.</i>	
LONGITUDINAL TRACKING OF T-CELL REPERTOIRE REVEALS LONG-LASTING <i>CD4</i>⁺ YELLOW FEVER SPECIFIC CLONE CLUSTER	539
<i>Fedorova K.S., Abramovskikh K.A., Savochkina A.Yu., Minasova A.A., Zotova M.A., Samatova A.I., Nokhrin D.Yu., Nikushkina K.V.</i>	
STATE OF THE VAGINAL BIOCECENOSIS DEPENDING ON THE SPECIES DIVERSITY OF LACTOBACILLI	544
<i>Zherebtsov A.P., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F., Mikhailova N.A.</i>	
PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR DETECTION OF RECOMBINANT FLAGELLIN C FROM <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	551
<i>Shkuratova M.A., Khlyntseva A.E., Kalmantaeva O.V., Kartsev N.N., Muzurov A.L., Firstova V.V.</i>	
HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO SHIGA TOXIN 2 (<i>Stx2</i>) IN CHILDREN WITH <i>ESCHERICHIOSIS</i> WITH HEMOLYTIC-UREMIC SYNDROME	558
<i>Sheynova A.D., Podosokorskaya O.A., Gubernatorova E.O.</i>	
THE EFFECT OF THE PROBIOTIC BACTERIA <i>AKKERMANSIA MUCINIPHILA</i> IN INTESTINAL HOMEOSTASIS AND DSS-INDUCED INFLAMMATION IN MICE	565
<i>Volosnikova E.A., Shcherbakov D.N., Volkova N.V., Esina T.I., Zaikovskaya A.V., Shimina G.G., Danilenko E.D.</i>	
STUDY OF THE ADJUVANT PROPERTIES OF BETA-GLUCANS FROM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> YEAST	569
<i>Rashchupkin I.M., Meledina I.V., Kotova M.A., Zheltova O.I.</i>	
PD-1 AND <i>Tim-3</i> EXPRESSION ON DIFFERENT SUBPOPULATIONS OF MONOCYTES IN CHRONIC OFTEN RECURRENT HERPESVIRUS INFECTION	575
<i>Gulimov M.K., Kalyuzhnaya N.O., Ammour Yu.I., Zverev V.V., Svitich O.A.</i>	
LONG NON-CODING RNAs — REGULATORS OF RUBELLA VIRUS INFECTION AND ANTIVIRAL RESPONSE	581
<i>Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Vlasova V.V., Shmagel N.G., Shmagel K.V.</i>	
MARKERS OF <i>CD4</i>⁺ AND <i>CD8</i>⁺ T-CELL EXHAUSTION IN HIV/HCV COINFECTED IMMUNOLOGICAL NON-RESPONDERS TO ANTIRETROVIRAL THERAPY	586
<i>Kotomina T.S., Sychev I.A., Rak A.Ya., Wong P.-F., Bazhina A.V., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G.</i>	
CONSERVED LINEAR B-CELL PEPTIDES AMONG THE INFLUENZA A VIRAL NEURAMINIDASES ENHANCE THE CROSS-PROTECTIVE POTENTIAL OF INACTIVATED WHOLE-VIRION INFLUENZA VACCINE	593

Rak A.Ya., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONSERVATION OF NUCLEOPROTEIN IMMUNOGENIC T-CELL EPITOPES OF MASTER DONOR VIRUSES FOR LIVE AND INACTIVATED INFLUENZA VACCINES	601
--	------------

Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Lyubimova N.E., Basina V.V., Esaulenko E.V., Totolian A.A.

THE ROLE OF CHEMOKINE CX3CL1/FRACTALKINE IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS B	609
--	------------

Kovaleva S.V., Chapurina V.N., Lomtadze L.V., Lyagusha D.E., Teterin Yu.V., Barova N.K., Melkonyan K.I.

SYNTHETIC THYMIC HEXAPEPTIDE IN THE CORRECTION OF ALTERATIONS OF ANTIBACTERIAL IMMUNE DEFENSE AND NORMALIZATION OF THE PROFILE OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN IMMUNOCOMPROMIZED CHILDREN WITH LOCAL UNLIMITED ACUTE PERITONITIS	615
---	------------

Khalturina E.O., Garskova N.V., Shemetova A.D.

PERSONALIZED APPROACH TO IMMUNE SYSTEM REHABILITATION IN PATIENTS WITH YEAR-ROUND ALLERGIC RHINITIS SUFFERING FROM RECURRENT ARVI AND RECURRENT HERPES VIRUS INFECTIONS	623
--	------------

Instructions to Authors	632
--------------------------------------	------------

Author index	635
---------------------------	------------

Subject index	635
----------------------------	------------

МОЛЕКУЛЫ-ЛОВУШКИ ИНТЕРЛЕЙКИНА 6 И ИНТЕРЛЕЙКИНА 18 ПРИ COVID-19

А.А. Коротаева, Е.В. Самойлова, Д.А. Чепурнова, Н.В. Погосова, Д.Т. Кучиев,
Ф.Н. Палеев

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава
России, Москва, Россия

Резюме. Цитокины являются медиаторами иммунной системы, регулирующими воспалительный процесс. Интенсивность воспалительного процесса во многом зависит от типа цитокина и продолжительности его действия. Большое значение в развитии и прогрессировании воспаления принадлежит интерлейкину 6 (IL-6) и интерлейкину 18 (IL-18). Цитокины по-разному регулируют воспалительный процесс, индуцируя или подавляя воспалительные реакции. Функциональную активность цитокинов ограничивают молекулы-ловушки, уровни которых являются определяющими факторами для инициации либо защитных, либо патологических эффектов интерлейкинов. Для IL-6 такой ловушкой является растворимый гликопротеин sgp130. Контролирующим фактором IL-18 является IL-18-связывающий белок (IL-18BP). Высокие уровни IL-6 и IL-18 наблюдались при COVID-19 и ассоциировались с неблагоприятными исходами заболевания. Целью настоящего исследования был сравнительный анализ уровней sgp130 и IL-18BP у пациентов с разной степенью тяжести COVID-19. В ретроспективное исследование включили 74 пациента с COVID-19 в возрасте 63 ± 14 лет, среди которых 40 мужчин и 34 женщины. Пациенты были разделены на группы в соответствии со степенью поражения легких по данным компьютерной томографии. В первую группу входили пациенты без поражения легких; во вторую группу — пациенты с умеренной формой пневмонии, с поражением легких до 50%; в третью группу — пациенты с тяжелой формой пневмонии, с поражением легких $\geq 50\%$. Уровни цитокинов и их ловушек определяли в плазме крови количественным иммуноферментным методом. Концентрации IL-6 и IL-18 в крови пациентов возрастали при увеличении тяжести COVID-19. Уровни их ловушек менялись неоднозначно. Уровни sgp130 в группе пациентов с умеренной формой пневмонии были ниже, чем у пациентов без поражения легких. А у пациентов с тяжелой формой пневмонии уровни sgp130 оказались выше, чем у пациентов с умеренной формой и были схожи с уровнями в группе без поражения легких. В отличие от sgp130, уровни IL-18BP снижались по мере увеличения тяжести COVID-19. Таким образом, увеличение уровней IL-6 и IL-18 при возрастании тяжести COVID-19 сопровождается неоднозначными изменениями уровней их ловушек. Соотношение между концентрациями IL-6 и IL-18 и их ловушек отражает степень тяжести COVID-19.

Ключевые слова: IL-6, IL-18, растворимый рецептор IL-6, sgp130, IL-18-связывающий белок, COVID-19.

Адрес для переписки:

Самойлова Елена Виленовна
121552, Россия, Москва, ул. Академика Чазова, 15а,
ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр
кардиологии им. акад. Е.И. Чазова Минздрава России.
Тел.: 8 (495) 414-67-14.
E-mail: erihter@mail.ru

Contacts:

Elena V. Samoilo
121552, Russian Federation, Moscow, Academician Chazov str., 15a,
National Medical Research Centre of Cardiology named after
academician E.I. Chazov.
Phone: +7 (495) 414-67-14.
E-mail: erihter@mail.ru

Для цитирования:

Коротаева А.А., Самойлова Е.В., Чепурнова Д.А., Погосова Н.В.,
Кучиев Д.Т., Палеев Ф.Н. Молекулы-ловушки интерлейкина 6
и интерлейкина 18 при COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14,
№ 3. С. 411–415. doi: 10.15789/2220-7619-IAI-16651

Citation:

Korotaeva A.A., Samoilo E.V., Chepurnova D., Pogosova N.V., Kuchiev D.T.,
Paleev F.N. IL-6 and IL-18 cytokine traps in COVID-19 // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3,
pp. 411–415. doi: 10.15789/2220-7619-IAI-16651

IL-6 AND IL-18 CYTOKINE TRAPS IN COVID-19

Korotaeva A.A., SamoiloVA E.V., ChepurNOVA D., PogOSOVA N.V., Kuchiev D.T., Paleev F.N.

National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Abstract. Cytokines are mediators of immunity that regulate inflammation. Intensity of inflammatory process is strongly dependent on the cytokine type and duration of its effect. Interleukin 6 (IL-6) and interleukin 18 (IL-18) play an important role in the initiation and progression of inflammation. Cytokines regulate the inflammatory process in different ways by inducing or inhibiting inflammatory reactions. Functional activity of cytokines is limited by trap molecules whose levels determine initiation of protective or pathological effects of interleukins. Soluble glycoprotein sgp130 functions as a trap for IL-6, while IL-18 is controlled by IL-18 binding protein (IL-18BP). High IL-6 and IL-18 levels were recorded in COVID-19 patients, being associated with unfavorable outcome of the disease. Our objective was to compare sgp130 and IL-18BP levels in patients with different degrees of COVID-19. Retrospective study included 74 COVID-19 patients (40 men and 34 women) aged 63 ± 14 years. The patients were assigned to groups according to severity of lung damage. Group 1 included patients without lung damage; group 2, patients with moderate pneumonia (< 50% lung damage); group 3, patients with severe pneumonia (> 50% lung damage). Plasma levels of cytokines and their trap molecules were determined by quantitative immunoenzyme assay. IL-6 and IL-18 plasma concentrations increased with COVID-19 severity. Ambiguous changes were recorded for their traps. Plasma levels of sgp130 were lower in patients with moderate pneumonia than in patients without lung damage. In patients with severe pneumonia sgp130 plasma concentrations were higher than those in patients with mild pneumonia, being similar to those in patients without lung damage. In contrast to sgp130, IL-18BP levels decreased with COVID-19 severity. Thus, an increase in IL-6 and IL-18 levels parallel to COVID-19 severity is accompanied by ambiguous changes in the levels of their trap molecules. The ratio between the levels of IL-6 and IL-18 and their traps reflects the degree of COVID-19 severity.

Key words: IL-6, IL-18, soluble IL-6 receptor, sgp130, IL-18 binding protein, COVID-19.

Введение

Цитокины — это уникальные иммунорегуляторные молекулы. Обеспечивая межклеточное взаимодействие, они регулируют силу и продолжительность иммунного ответа и воспалительного процесса [1]. Цитокины взаимодействуют между собой, образуя единую рабочую сеть. Сбалансированность провоспалительных и противовоспалительных цитокиновых реакций способствует успешному разрешению воспалительного процесса. Однако изменение уровней цитокинов может нарушать данный баланс и приводить к развитию патологических процессов. В частности, увеличение уровней различных цитокинов ассоциировано с прогрессированием инфекции COVID-19, вызываемой коронавирусом SARS-CoV-2. Особое внимание в данном аспекте отводится интерлейкину 6 (IL-6) и интерлейкину 18 (IL-18). Уровни IL-6 и IL-18 были высокими у пациентов, умерших в результате COVID-19, и коррелировали между собой [3, 10]. Также выявлена корреляционная связь между повышенными уровнями IL-6 и длительным COVID-19, который ассоциируется с долгосрочными последствиями инфекции и различными осложнениями, включая необратимое повреждение органов [12].

В организме человека существуют механизмы, ограничивающие функциональную активность IL-6 и IL-18. Для IL-6 характерно наличие двух сигнальных путей: классического и транс-сигнального. При классической пере-

даче сигнала IL-6 образует комплекс со своим рецептором IL-6R на мембране клеток, а при транс-сигнализации — с растворимой формой рецептора sIL-6R. Циркулирующий в крови растворимый гликопротеин sgp130 является ловушкой и ингибирует активность IL-6, реализуемую транс-сигнальным путем, не влияя на классическую сигнализацию [4]. Считается, что эффекты IL-6, способствующие патологическим процессам, опосредуются преимущественно транс-сигнальным путем, в то время как противовоспалительная активность IL-6 реализуется классической передачей сигнала [8]. Для IL-18 контролирующим фактором является IL-18-связывающий белок (IL-18BP), который, обладая высоким сродством к IL-18, подавляет IL-18-зависимые эффекты [2]. Уровни цитокиновых ловушек являются определяющими факторами для инициации либо защитных, либо патологических эффектов интерлейкинов.

В настоящем исследовании оценивали уровни ловушек IL-6 и IL-18 у пациентов с разными формами COVID-19

Материалы и методы

В исследование включили 74 пациента с COVID-19, из них 40 мужчин (54%) и 34 женщины (46%). Средний возраст пациентов составил 63 ± 14 лет. Все пациенты, включенные в исследование, подписывали информированное согласие по забору биологических образцов для банкирования, одобренное Этическим комите-

том НМИЦ кардиологии им. акад. Е.И. Чазова (протокол № 249 от 30.09.2019 г.).

Пациенты были разделены на группы в соответствии со степенью поражения легких по данным компьютерной томографии. В первую группу входили пациенты без поражения легких; во вторую группу — пациенты с умеренной формой пневмонии, с поражением легких до 50%; в третью группу — пациенты с тяжелой формой пневмонии, с поражением легких $\geq 50\%$.

Образцы крови отбирали на 2–4 день госпитализации и хранили при температуре -80°C до проведения исследования.

Уровни IL-6, sgp130, sIL-6R, IL-18 и IL-18BP определяли иммуноферментным методом с использованием наборов реактивов фирмы R&D Systems, фирмы eBioscience, Cloud-Clone Corp.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ IBM SPSS STATISTICS 23. Результаты представлены в виде медианы с указанием интерквартильного интервала (25-й процентиль; 75-й процентиль) для параметров, имеющих распределение, отличное от нормального. При сравнении групп по количественному признаку использовали непараметрические критерии Манна–Уитни для независимых выборок. Статистически значимыми считались результаты при уровне достоверности $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Концентрации IL-6, sIL-6R и IL-18 в крови пациентов возрастали по мере увеличения тяжести COVID-19 (рис. 1), в то время как уровни ловушек цитокинов менялись неоднозначно.

Уровни sgp130 в группе пациентов с умеренной формой пневмонии были ниже, чем у пациентов без поражения легких. А у пациентов с тяжелой формой пневмонии уровни sgp130 оказались выше, чем у пациентов с умеренной формой и были схожи с уровнями в группе без поражения легких (рис. 2А).

Sgp130 и sIL-6R конститутивно присутствуют в крови и являются компонентами буферной системы, которая регулирует период полураспада IL-6 [8]. У здоровых людей концентрации sgp130 и sIL-6R находятся в молярном избытке, предполагая, что свободный IL-6 быстро захватывается и нейтрализуется [9]. Наблюдаемое в настоящем исследовании снижение уровней sgp130 у пациентов с умеренной формой пневмонии свидетельствует об интенсивном расходе этого гликопротеина на данной стадии COVID-19. Выявленное повышение уровней sgp130 на тяжелой стадии COVID-19 может быть связано с увеличением его продукции. Другие исследователи также показали, что уровни sgp130 повышаются при тяжелой стадии COVID-19 по сравнению с умеренной [7].

Нами установлено, что изменения уровней ловушки IL-18 в зависимости от стадии COVID-19 отличались от изменений ловушки IL-6. В отличие от sgp130, уровни IL-18BP снижались при увеличении тяжести COVID-19 (рис. 2Б). Наиболее высокие уровни IL-18BP наблюдались у пациентов без поражения легких. При этом уровни IL-18 в этой группе пациентов были ниже, чем в остальных исследуемых группах (рис. 1). Возможно, на данной стадии COVID-19 ловушка интенсивно связывается

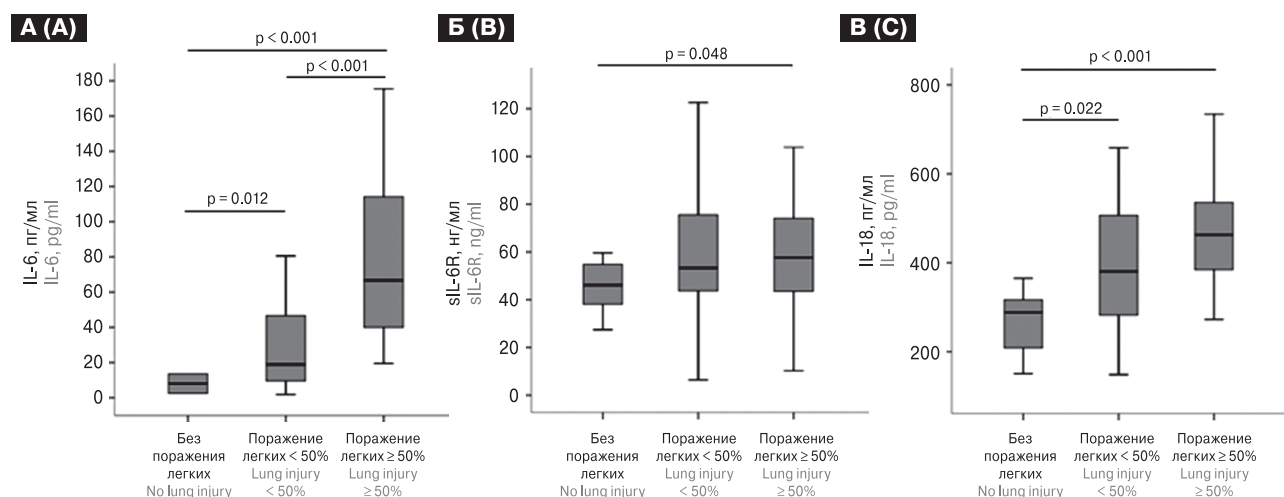


Рисунок 1. Уровни IL-6 (А), sIL-6R (Б) и IL-18 (В) в зависимости от тяжести COVID-19

Figure 1. IL-6 (A), sIL-6R (B) and IL-18 (C) levels depending on the severity of COVID-19

Примечание. Результаты представлены в виде бокс-плотов, где показаны медианы, интерквартильный размах (Q_1 ; Q_3), максимальные и минимальные значения; p — значение приведено для критерия Манна–Уитни.

Note. Box plots show medians (middle lines) with first and third quartiles (boxes), and whiskers show maximum and minimum values. Mann–Whitney test results are expressed as p -values.

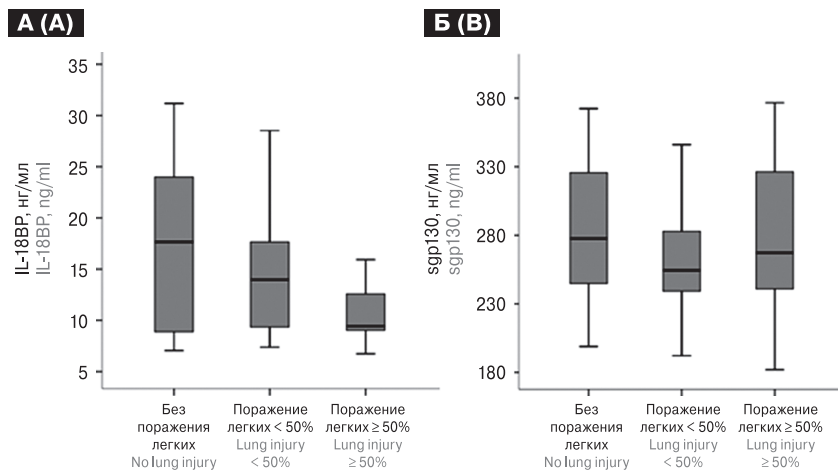


Рисунок 2. Уровни IL-18BP (А) и sgp130 (Б) в зависимости от тяжести COVID-19

Figure 2. IL-18BP (A) and sgp130 (B) levels depending on the severity of COVID-19

Примечание. Результаты представлены в виде бокс-плотов, где показаны медианы, интерквартильный размах (Q_1 ; Q_3), максимальные и минимальные значения; p — значение приведено для критерия Манна–Уитни.

Note. Box plots show medians (middle lines) with first and third quartiles (boxes), and whiskers show maximum and minimum values. Mann–Whitney test results are expressed as p -values.

с IL-18, тем самым активно ингибируя провоспалительные эффекты цитокина. На более тяжелых стадиях COVID-19 происходит нарушение баланса между продукцией IL-18 и его ловушки. Низкие уровни IL-18BP при повышенных уровнях IL-18 недостаточны для эффективной нейтрализации IL-18. Выявленное в настоящем исследовании нарушение баланса между концентрациями IL-18 и IL-18BP может приводить к увеличению концентрации свободного биологически активного IL-18, который вносит свой вклад в патогенез заболевания.

Дисбаланс в продукции IL-18 и его ловушки описан при многих хронических воспалительных заболеваниях. Дисбаланс может выражаться в увеличении продукции IL-18 при снижении, отсутствии увеличения или недостаточном увеличении продукции IL-18BP. В частности, при

системной красной волчанке отмечено значительное повышение уровней IL-18 и IL-18BP [6]. У больных волчаночным нефритом также наблюдалось повышение плазменных уровней IL-18 и IL-18BP, в то время как при первичном нефротическом синдроме повышался только IL-18BP [5]. При ревматоидном артрите уровни IL-18 повышались, а уровни IL-18BP понижались как в сыворотке, так и в синовиальной жидкости [11].

Таким образом, увеличение уровней IL-6 и IL-18 по мере возрастания тяжести COVID-19 не сопровождается однозначными изменениями уровней их ловушек, что приводит к неконтролируемому увеличению активных форм цитокинов и прогрессированию заболевания. Соотношение между концентрациями IL-6 и IL-18 и их ловушек отражает степень тяжести COVID-19.

Список литературы/References

1. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунология воспаления: роль цитокинов // Медицинская иммунология. 2001. Т. 3, № 3. С. 361–368. [Chereshnev V.A., Gusev E.Yu. Immunology of inflammation: the role of cytokines. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2001, vol. 3, no. 3, pp. 361–368. (In Russ.)]
2. Dinarello C.A., Novick D., Kim S., Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front. Immunol.*, 2013, no. 4: 289. doi: 10.3389/fimmu.2013.00289
3. Jamoussi A., Messaoud L., Jarraya F., Rachdi E., Ben Mrad N., Yaalaoui S., Besbes M., Ayed S., Ben Khelil J. Interleukin 6 prediction of mortality in critically ill COVID-19 patients: a prospective observational cohort study. *PLoS One*, 2023, vol. 18, no. 3: e0279935. doi: 10.1371/journal.pone.0279935
4. Jostock T., Mullberg J., Ozbek S., Atreya R., Blinn G., Voltz N., Fischer M., Neurath M.F., Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur. J. Biochem.*, 2001, vol. 268, no. 1, pp. 160–167. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.01867
5. Liang D., Ma W., Yao C., Liu H., Chen X. Imbalance of interleukin 18 and interleukin 18 binding protein in patients with lupus nephritis. *Cell. Mol. Immunol.*, 2006, vol. 3, no. 4, pp. 303–306.
6. Novick D., Elbirt D., Miller G., Dinarello C.A., Rubinstein M., Stoeber Z.M. High circulating levels of free interleukin-18 in patients with active SLE in the presence of elevated levels of interleukin-18 binding protein. *J. Autoimmun.*, 2010, vol. 34, no. 2, pp. 121–126. doi: 10.1016/j.jaut.2009.08.002

7. Rodriguez-Hernandez M.A., Carneros D., Nunez-Nunez M., Coca R., Baena R., Lopez-Ruiz G.M., Cano-Serrano M.E., Martinez-Telleria A., Fuentes-Lopez A., Praena-Fernandez J.M., Garbers Ch., Hernandez-Quero J., Garcia F., Rose-John S., Bustos M. Identification of IL-6 signalling components as predictors of severity and outcome in COVID-19. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13: 891456. doi: 10.3389/fimmu.891456
8. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci.*, 2012, vol. 8, no. 9, pp. 1237–1247. doi: 10.7150/ijbs.4989
9. Rose-John S. The Soluble Interleukin 6 Receptor: advanced therapeutic options in inflammation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2017, vol. 102, no. 4, pp. 591–598. doi: 10.1002/cpt.782
10. Satış H., Özger H.S., Aysert Yıldız P., Hızıl K., Gulbahar Ö., Erbaş G., Aygencel G., Guzel Tunccan O., Öztürk M.A., Dizbay M., Tufan A. Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19. *Cytokine*, 2021, no. 137: 155302. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155302
11. Shao X.T., Feng L., Gu L.J., Wu L.J., Feng T.T., Yang Y.M., Wu N.P., Yao H.P. Expression of interleukin-18, IL-18BP, and IL-18R in serum, synovial fluid, and synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Med.*, 2009, vol. 9, no. 3, pp. 215–221. doi: 10.1007/s10238-009-0036-2
12. Yin J.X., Agbana Y.L., Sun Z.S., Fei S.W., Zhao H.Q., Zhou X.N., Chen J.H., Kassegne K. Increased interleukin-6 is associated with long COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Infect. Dis. Poverty*, 2023, vol. 12, no. 1: 43. doi: 10.1186/s40249-023-01086-z

Авторы:

Коротаева А.А., д.б.н., главный научный сотрудник ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия;

Самойлова Е.В., к.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия;

Чепурнова Д.А., младший научный сотрудник ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия;

Погосова Н.В., д.м.н., профессор, зам. генерального директора по научной работе и профилактической кардиологии ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия;

Кучиев Д.Т., аспирант ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия;

Палеев Ф.Н., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, первый зам. генерального директора, зам. генерального директора по научной работе ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, Россия.

Authors:

Korotaeva A.A., DSc (Biology), Chief Researcher, National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Samoilova E.V., PhD, Leading Researcher, National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Chepurnova D.A., Junior Researcher, National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Pogosova N.V., DSc (Medicine), Professor, Deputy General Director for Scientific and Analytical Work and Preventive Cardiology, National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Kuchiev D.T., PhD Student, National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Paleev F.N., RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, First Deputy General Director, Deputy General Director for Research, National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.03.2024
Принята к печати 30.03.2024

Received 26.03.2024
Accepted 30.03.2024

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ИНТЕРФЕРОНОВ ПРИ ГРИППЕ И COVID-19

Т.П. Оспельникова^{1,2}, О.А. Свитич¹, Ф.И. Ершов²

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

² ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Среди респираторных вирусов наиболее серьезные осложнения вызывают вирусы гриппа А и В, а также коронавирусы. В большинстве исследований определялось абсолютное содержание интерферонов (IFN) разных типов в сыворотке крови. Однако концентрации белков IFN в сыворотке крови не всегда отражают уровень противовирусной защиты. Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка интерферонов статуса у пациентов с ОРВИ: гриппом и острой стадией COVID-19. *Материалы и методы.* Использовали биоматериал в виде образцов цельной крови от 113 пациентов с гриппом и 110 пациентов в острой фазе COVID-19 среднетяжелого течения. Противовирусную защиту организма при ОРВИ оценивали путем определения активности интерферонов I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, методом «Интерфероновый статус» в смоделированной *in vitro* системе клетка–вирус. *Результаты.* В данной работе выявлено статистически значимое снижение биологической активности интерферонов, продуцируемых лейкоцитами крови, при гриппе и дефицит активности IFN при COVID-19, по сравнению с референсными значениями, а также показаны возможные перспективы лечения данных нозологий такими иммуноактивными препаратами, как индукторы IFN (циклоферон, кагоцел) и иммуномодуляторы (ингавирин, поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4). *Выводы.* Результаты активности IFN необходимы для оценки противовирусного потенциала организма, особенно при COVID-19, учитывая «новизну» инфекции, тяжесть и многообразие ее клинических проявлений. На сегодняшний день известно, что вирус SARS-CoV-2 способен проникать не только в клетки эпителия верхних дыхательных путей, эпителиоциты желудка и кишечника, но и в клетки пищевода, сердца, надпочечников, мочевого пузыря, головного мозга, а также в эндотелий сосудов и макрофаги. Новый коронавирус SARS-CoV-2 ингибирует экспрессию клеточных генов, в том числе генов врожденного иммунитета, оказывает негативное влияние на систему IFN. Применение индукторов IFN и иммуномодуляторов при гриппе и COVID-19 показало иммунологическую целесообразность и клиническую перспективу.

Ключевые слова: острые респираторные вирусные инфекции, грипп, COVID-19, противовирусная защита, интерферон, иммуноактивные препараты.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF INTERFERON ACTIVITY IN INFLUENZA AND COVID-19

Ospelnikova T.P.^{a,b}, Svitich O.A.^a, Ershov F.I.^b

^a Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Among respiratory viruses, the most serious complications are caused by influenza A and B viruses, as well as coronaviruses. Most studies determined the absolute content of interferons (IFNs) of different types in blood serum.

Адрес для переписки:

Оспельникова Татьяна Петровна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (903) 521-32-60.
E-mail: ospelnikovat@mail.ru

Contacts:

Tatiana P. Ospelnikova
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a,
Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (903) 521-32-60.
E-mail: ospelnikovat@mail.ru

Для цитирования:

Оспельникова Т.П., Свитич О.А., Ершов Ф.И. Сравнительная оценка активности интерферонов при гриппе и COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 416–422. doi: 10.15789/2220-7619-CAO-16821

Citation:

Ospelnikova T.P., Svitich O.A., Ershov F.I. Comparative assessment of interferon activity in influenza and COVID-19 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 416–422. doi: 10.15789/2220-7619-CAO-16821

However, serum IFN protein concentrations do not always reflect the level of antiviral protection. The purpose of this study was a comparative assessment of interferon status in patients with ARVI: influenza and the acute stage of COVID-19. *Materials and methods.* We used biomaterial in the form of whole blood samples from 113 patients with influenza and 110 patients in the acute phase of moderate COVID-19. The body's antiviral defense during ARVI was assessed by determining the activity of type I and II interferons produced by blood leukocytes using the "Interferon status" method in a cell-virus system simulated *in vitro*. *Results.* This work reveals a statistically significant decrease in the biological activity of interferons produced by blood leukocytes in influenza and a deficiency of IFN activity in COVID-19, compared with reference values, and also shows possible prospects for the treatment of these nosologies with such immunoactive drugs as IFN inducers (cycloferon, Kagocel) and immunomodulators (ingavirin, multicomponent vaccine Immunovac-VP-4). *Conclusion.* The results of IFN activity are necessary to assess the antiviral potential of the body, especially with COVID-19, given the "novelty" of the infection, the severity and variety of its clinical manifestations. Today it is known that the SARS-CoV-2 virus is capable of penetrating not only into the epithelial cells of the upper respiratory tract, epithelial cells of the stomach and intestines, but also into the cells of the esophagus, heart, adrenal glands, bladder, brain, as well as into the vascular endothelium and macrophages. Coronavirus SARS-CoV-2 inhibits the expression of cellular genes, including innate immune genes, and has a negative effect on the IFN system. The use of IFN inducers and immunomodulators for influenza and COVID-19 has shown immunological feasibility and clinical promise.

Key words: acute respiratory viral infections, influenza, COVID-19, antiviral protection, interferon, immunoactive drugs.

Введение

Респираторные вирусы проникают в клетки эпителия слизистых дыхательных путей, являющихся воротами инфекции, в которых реплицируются с поражением других органов и тканей, вызывая клинически повышение температуры тела, головную боль, насморк, боль в горле и кашель. Частые острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) могут свидетельствовать о нарушениях врожденного и адаптивного иммунитета. На ранних стадиях инфекции цитокиновый каскад начинается с провоспалительных цитокинов, включая интерфероны (IFN) I типа, фактор некроза опухолей (TNF α), IL-1 β и др., действие которых клинически ассоциируют с лихорадочным состоянием, слабостью, сонливостью и анорексией. Из известных респираторных вирусов наиболее серьезные осложнения вызывают вирусы гриппа А и В, а также коронавирусы [3, 8, 11, 15]. Комплексное исследование системы IFN при гриппе изучалось [5, 14], а при COVID-19 результаты получены сравнительно недавно ввиду «новизны» инфекции. Активность IFN, как потенциала противовирусной защиты организма от вирусов, оценивается методом «Интерфероновый статус» с выявлением различной степени выраженности недостаточности биологической активности IFN, продуцируемых лейкоцитами крови. Определенный интерес вызывает возможность применения в комплексной терапии ОРВИ гриппа и COVID-19 иммуноактивных препаратов, способных повлиять на увеличение активности IFN. Целью настоящего исследования явилась оценка биологической активности IFN, продуцируемых лейкоцитами крови, клинической эффективности при использовании препаратов индукторов IFN, иммуномодуляторов на фоне базисной терапии.

Материалы и методы

Был исследован биологический материал: гепаринизированная кровь от пациентов среднетяжелого течения в острый период инфекции на 1–2 сутки заболевания с установленным диагнозом грипп (n = 113) (H3N2; H1N1) и COVID-19 (n = 110). Исследование проводилось при информированном согласии пациентов.

Биологическую активность интерферонов (IFN статус) определяли *in vitro* микрометодом по разработанной авторами методике [6]. Оценивали: циркулирующий (сывороточный) IFN; активность IFN I типа (α/β), продуцируемых лейкоцитами крови, при стимуляции их вирусом болезни Ньюкасла (NDV), штамм Канзас; активность IFN типа II (γ), продуцируемых лейкоцитами, при индукции их митогеном — фитогемагглютинином (ФГА) (ООО «Компания «ПанЭко», Россия); активность спонтанного IFN *in vitro*. За титр IFN принимали величину, обратную разведению, при котором задерживается деструкция монослоя клеток от внесенного тест-вируса везикулярного стоматита (VSV) — максимальное разведение, при котором наблюдается 100% защита монослоя клеток Vero от цитопатогенного действия (ЦПД) тест-вируса. Учет результатов проводили по последней лунке 100% защиты клеточного монослоя, однако, если в следующей лунке титрования имел место 50% показатель защиты, то брали их среднее значение. Данный метод позволяет по совокупности показателей оценить степень недостаточности/дефицита системы IFN по такому параметру, как способность к выработке биологически активного IFN лейкоцитами крови, выражаемого в титрах биологической активности (ТБА). За показатели биоактивности IFN I типа в норме принимались значения ТБА ≥ 640 , II типа — ≥ 64 , сыво-

роточного IFN $\leq 2-8$ и спонтанно продуцируемого — < 2 ТБА.

Дополнительно к базисной терапии применяли препараты для иммунокоррекции: индукторы IFN кагоцел, циклоферон, иммуномодуляторы ингавирин, поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4. Кагоцел назначали по 2 таблетки 3 раза в сутки в течение первых двух суток, затем по 1 таблетке 3 раза в сутки в течение последующих двух дней. Курс лечения 4 дня. Циклоферон — 2 таблетки однократно в первые, вторые, четвертые, восьмые сутки лечения. Ингавирин назначали в дозе 90 мг в сутки в течение 5 дней. Во всех группах пациентам проводили симптоматическую терапию (1% раствор нафтизина, мукалтин, аскорутин), при этом исключали препараты, обладающие жаропонижающим действием. На фоне базисной терапии госпитализированным пациентам с COVID-19 вводили бактериальные лиганды — поликомпонентную вакцину Иммуновак-ВП-4 — интраназально по 2 капли (1 мг) в каждую половину носа ежедневно и подкожно через день с 1-го по 11-й день нахождения в стационаре (группа А, $n = 30$); на фоне базисной терапии введение ВП-4 перорально по 2 мл (20 мг) и по 2 капли (1 мг) интраназально в каждую половину носа ежедневно с 1-го по 10-й день нахождения в стационаре (группа В, $n = 30$). Пациенты из группы контроля (С, $n = 50$) получали терапию в виде: фавипиравир 200 мг по схеме, эноксапарин 0,4 мг/сут подкожно, дексаметазон 8–12 мг/сут, при СРБ ≥ 60 мг/л — тоцилизумаб 400 мг/сут.

Статистическую обработку показателей проводили с использованием программного обеспечения Biostat. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При ОРВИ была определена биологическая активность IFN, продуцируемых лейкоцитами крови (IFN статус), что отражено на рис. 1. У пациентов неосложненным гриппом было отмечено статистически значимое угнетение биологической активности IFN I типа (α/β), подавление γ -IFN-генеза, повышение содержания биологической активности IFN в сыворотке крови у 73 из 113 пациентов ($64,5\% \pm 4,99\%$), что является ответной реакцией организма на вирусную инфекцию [2], и наличия у 64 из 113 пациентов ($57\% \pm 5,2\%$) биологически активного спонтанного IFN в реакции *in vitro* (рис. 1).

В пробах гепаринизированной крови пациентов с COVID-19 острого периода ($n = 110$) в реакции *in vitro* определена биологическая активность IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови. На рис. 1 отражены вы-

явленные нами показатели биологической активности IFN I и II типов при COVID-19 ($p < 0,05$) в острой стадии. Так, практически у всех пациентов выявлено значительное угнетение биологической активности IFN I и II типов, которое можно отнести к выраженной недостаточности 3 и 4 степени. У части обследуемых выявили глубокий дефицит (следовые количества) биологической активности IFN: 67 человек ($60,9\% \pm 4,7\%$) — 4 степени по IFN I типа и 40 ($36,4\% \pm 4,6\%$) — IFN II типа. Зарегистрировано повышение биологической активности IFN в сыворотке крови у 12 пациентов ($10,9\% \pm 2,9\%$). Выявлено токсическое воздействие сыворотки крови пациентов на культуру клеток у 20 больных ($18,2\% \pm 3,7\%$). Наконец, в 4 ($3,6\% \pm 1,8\%$) пробах неиндуцированной крови *in vitro* обнаружено наличие спонтанного IFN, не образующегося в физиологических условиях.

По сравнению с гриппом, при COVID-19 имеет место существенно более значительное угнетение биологической активности IFN, отражающее степень поражения вирусом SARS-CoV-2 системы IFN как естественной противовирусной защиты организма (рис. 1). В острой стадии заболевания значения ТБА для IFN I типа кратко отличаются от референсных: при норме в 640 ТБА средние значения составили < 32 (резкое угнетение в ≥ 20 раз) ($p < 0,05$). По IFN II типа при норме 64 ТБА отмечено снижение в 7,3 раза ($p < 0,05$). Эти результаты наглядно демонстрируют степень угнетения биологической активности IFN I и II типов при COVID-19 по сравнению с референсными значениями. Угнетение активности IFN в острой фазе COVID-19 отличается от иммунопатологической картины при остром гриппе: в последнем случае также выявлено снижение биоактивности IFN относительно нормы в несколько раз, однако оно не столь выражено по сравнению с таковым при COVID-19 (рис. 1).

В связи с угнетением физиологической биологической активности IFN при ОРВИ, вызванным вирусами гриппа и COVID-19, возникает необходимость усиления естественного противовирусного ответа с применением иммуноактивных препаратов (IFN, индукторы IFN, иммуномодуляторы) для увеличения противовирусного потенциала организма при помощи индукции биологической активности IFN ответа [1, 2, 10]. В настоящее время для лечения ОРВИ эффективно используются препараты IFN: растворы для инъекций, мази, гели, капли в нос. Препараты IFN α сочетают свойства ингибитора вирусной продукции и повышения иммунной защиты организма [2] и применяют как при сезонном гриппе, так и при пандемическом гриппе А. Под действием IFN повышается эффективность иммунного распознавания

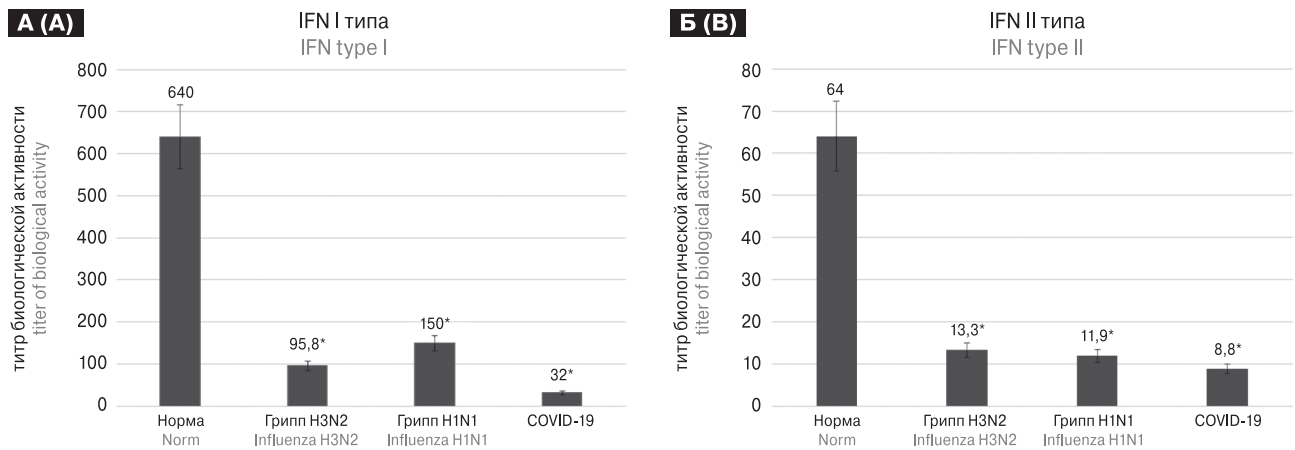


Рисунок 1. Показатели биологической активности IFN I (А) и IFN II (Б), продуцируемые лейкоцитами крови, при гриппе и COVID-19

Figure 1. Indicators of biological activity of IFN I (A) and IFN II (B) produced by blood leukocytes during influenza and COVID-19

Примечание. * $p < 0,05$ — статистически значимые отличия показателей здоровых добровольцев и пациентов ($p < 0,05$).
Note. * $p < 0.05$ — statistically significant differences in the indicators of healthy volunteers and patients ($p < 0.05$).

антигена, усиливаются фагоцитарная и цитолитическая функции, направленные на элиминацию возбудителя или антигенно измененных клеток, а также коррекция других вторичных иммунодефицитов, развивающихся вследствие патологического процесса. Ряд исследователей отмечают индукцию образования IFN и активацию фагоцитов после применения IFN β [7], IFN $\alpha 2b$ или сочетания IFN с арбидолом [13] при COVID-19.

Нами показано увеличение биологической активности IFN после лечения пациентов иммуноактивными препаратами, способными усилить противовирусную защиту организма. В качестве таких препаратов в комплексной базисной терапии были применены: циклоферон, кагоцел, ингавирин, бактериальные лиганды (Иммуновак-ВП-4).

Так, при гриппе были применены иммуноактивные препараты циклоферон, кагоцел, ингавирин. На рис. 2 отражено увеличение биологической активности IFN после лечения пациентов с гриппом иммуноактивными препаратами, способными усилить противовирусную защиту организма (рис. 2).

По окончании лечения нормализация показателей IFN статуса в большей степени отмечена у больных, получавших испытываемые препараты. Так, биологическая активность IFN α восстановилась у 25 (90% \pm 5,8%) больных, получавших кагоцел, у 24 (80% \pm 7,4%) — циклоферон ($p < 0,05$). Показатели IFN γ нормализовались у 24 (85% \pm 6,9%), 12 (60% \pm 9,1%), соответственно ($p < 0,05$). Показатели IFN в сыворотке крови нормализовались у 18 (65% \pm 9,2%), 29 (97% \pm 3,2%), соответственно ($p < 0,05$). Применение препа-

рата ингавирин также показало нормализацию показателей IFN статуса ($p < 0,05$). Следует отметить, что при повышении биологической активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, отмечено снижение биологической активности IFN в сыворотке крови и снижение концентрации белков IFN α и IFN γ .

Таким образом, при лечении препаратами кагоцел, циклоферон, ингавирин отмечено благоприятное влияние препаратов на течение неосложненного гриппа с более быстрым снижением температуры, исчезновении симптомов интоксикации и катаральных явлений у больных по сравнению с базисной терапией.

При COVID-19 в остром периоде заболевания были разработаны и применены 2 схемы лечения с назальным использованием в комплексной базисной терапии поликомпонентной вакцины Иммуновак-ВП-4: интраназально-подкожное введение ВП-4 (группа А, $n = 30$); интраназально-пероральный прием ВП-4 (группа В, $n = 30$). Группой контроля служили пациенты, также поступившие на лечение в стационар и получавшие только базисную терапию (группа контроля С, $n = 50$).

Мониторинг показателей биологической активности IFN I и IFN II типа в процессе лечения показал значительное увеличение ($p < 0,05$) активности IFN в группах (А и В) с добавлением в базисную терапию вакцины Иммуновак-ВП-4 сразу после проведенного курса лечения (2 визит) и дальнейшее увеличение активности IFN через месяц после заболевания (3 визит) в сравнении с группой контроля (С), пациенты которой получали только базисную терапию (рис. 3). Следует отметить и неплохой отдален-

ный эффект по истечении 12 мес. после начала заболевания (4 визит). Следует отметить, что полученные данные по увеличению функциональной биологической активности IFN сочетались с улучшением других лабораторных характеристик, а также с клинической эффективностью (рис. 3).

Оценка противовирусной защиты организма против нового коронавируса SARS-CoV-2 при

применении иммуотропного препарата — поликомпонентной вакцины Иммуновак-ВП-4 изучена впервые. Было показано, что разные схемы применения ВП-4 приводят к положительным лечебно-профилактическим эффектам, связанным с иммуоактивными свойствами поликомпонентной вакцины. Оценена перспективность противовирусной защиты организма против COVID-19 препаратом ВП-4

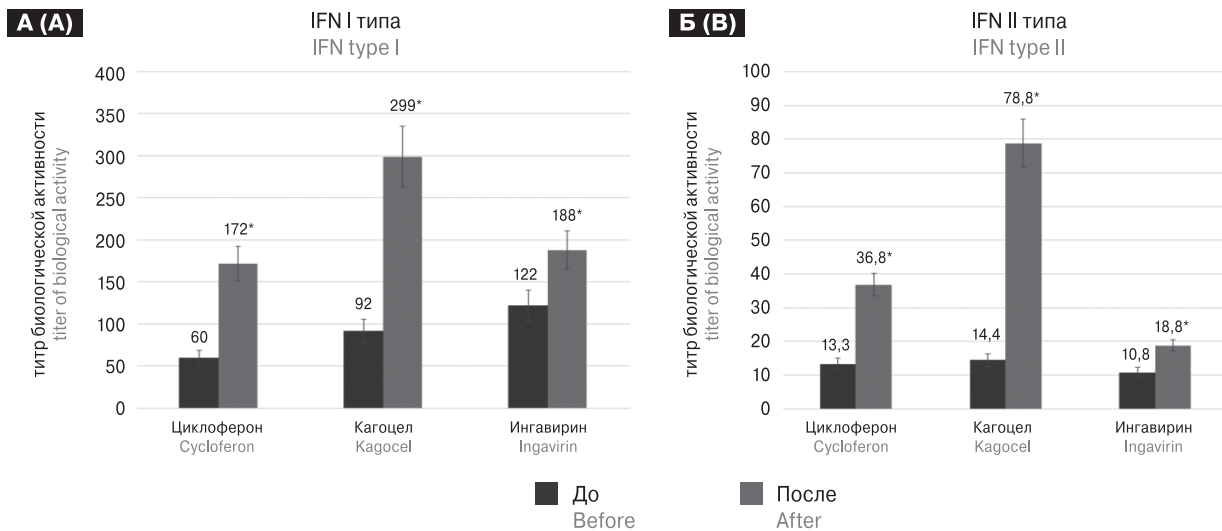


Рисунок 2. Показатели биологической активности IFN I типа (А) и IFN II типа (Б) при лечении сезонного гриппа H3N2 препаратами циклоферон, кагоцел, ингавирин

Figure 2. Indicators of biological activity of type I IFN (A) and type II IFN (B) in the treatment of H3N2 influenza with cycloferon, kagocel, and ingavirin

Примечание. * $p < 0,05$ — статистически значимые различия показателей после лечения с показателями до лечения.
 Note. * $p < 0.05$ — statistically significant differences in indicators after treatment with indicators before treatment.

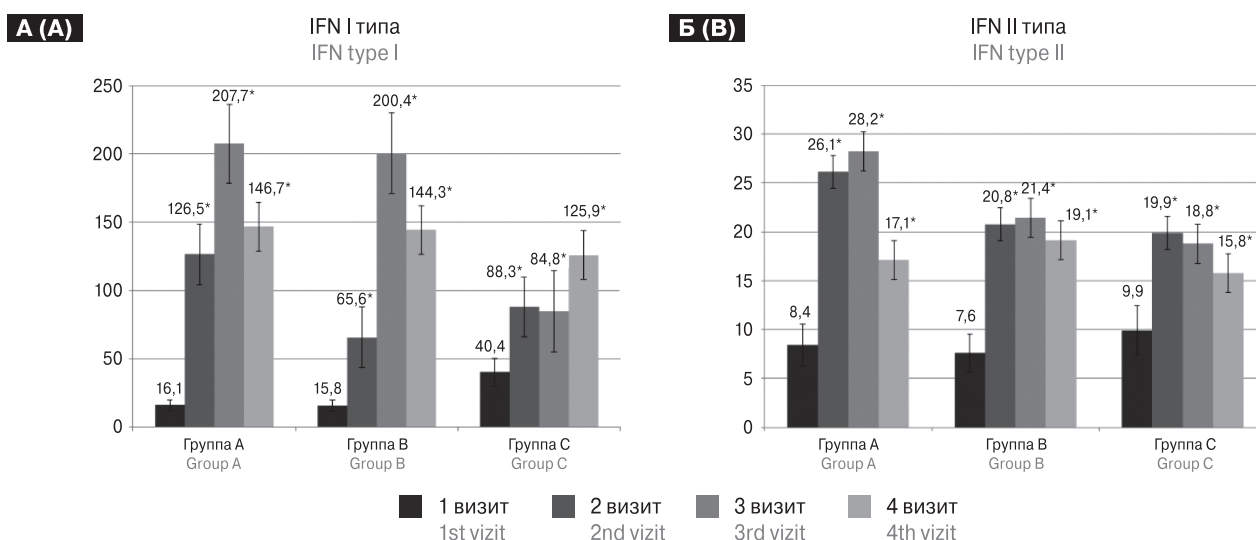


Рисунок 3. Изменение показателей биологической активности IFN I типа (А) и IFN II типа (Б) в процессе лечения пациентов в острой фазе COVID-19 (группы А, В, С)

Figure 3. Changes in the biological activity of type I IFN (A) and type II IFN (B) during the treatment of patients in the acute phase of COVID-19 (groups A, B, C)

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с визитом 1.
 Note. * — $p < 0.05$ compared to visit 1.

с индукцией биологической активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови.

Нами показано, что усиление естественного противовирусного ответа, выраженного в увеличении индукции активности IFN, продуцируемых лейкоцитами крови, возможно с применением препарата Иммуновак-ВП-4 [10]. В целом, влияние Иммуновак-ВП-4 на коррекцию параметров показателей врожденного и адаптивного иммунитета приводит к улучшению клинической картины заболевания [4].

Во многом благодаря тому, что IFN занимают ведущее место среди медиаторов противовирусного иммунитета [9, 12], терапевтические средства на их основе имеют преимущество перед другими противовирусными препаратами, так как обладают биологической активностью в отношении практически всех вирусов и запускают в клетках программу синтеза антивиральных белков. К тому же, на уровне организма IFN вызывает стимуляцию процессов врожденного и приобретенного противовирусного иммунитета, формируя единую защитную реакцию

против вирусов. Выраженность противовирусного ответа может быть усилена применением иммуноактивных (иммунотропных) препаратов (иммуномодуляторов, индукторов IFN) для увеличения индукции IFN-опосредованного ответа [10].

Заключение

Изучение активности IFN I и II типов, продуцируемых лейкоцитами крови, при ОРВИ позволило выявить их недостаточность (грипп) и даже дефицит (COVID-19). Применение в комплексной терапии иммуноактивных препаратов показало повышение противовирусной активности ($p < 0,05$). Следует отметить иммунологическую целесообразность и клиническую перспективность использования иммунокорректирующих препаратов (препараты IFN, индукторы IFN, иммуномодуляторы, бактериальные лиганды (Иммуновак-ВП-4)) в комплексном лечении и профилактике гриппа и новой коронавирусной инфекции COVID-19.

Список литературы/References

1. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Ахматова Н.К., Грубер И.М. Поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4 и иммуно-терапевтическая концепция ее использования для профилактики и лечения заболеваний, вызываемых условно патогенными микроорганизмами // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019. № 1. С. 43–49. [Egorova N.B., Kurbatova E.A., Akhmatova N.K., Gruber I.M. Multicomponent vaccine Immunovac-VP-4 and the immunotherapeutic concept of its use for the prevention and treatment of diseases caused by opportunistic microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 1, pp. 43–49. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2019-1-43-49
2. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 312 с. [Ershov F.I. Antiviral drugs. Moscow: GEOTAR-Media, 2006. 312 p. (In Russ.)]
3. Ершов Ф.И. Хронология пандемии COVID-19. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. 176 с. [Ershov F.I. Chronology of the COVID-19 Pandemic. Moscow: GEOTAR-Media, 2021. 176 p. (In Russ.)] doi: 10.33029/9704-6234-8-COV-2021-1-176
4. Крюкова Н.О., Абрамова Н.Д., Хромова Е.А., Хасанова А.А., Бишева И.В., Сходова С.А., Костинов М.П., Баранова И.А., Свитич О.А., Чучалин А.Г. Бактериальные лиганды в реабилитации медицинских работников после COVID-19 // Пульмонология. 2022. № 32. Вып. 5. С. 716–727. [Kryukova N.O., Abramova N.D., Khromova E.A., Khasanova A.A., Bisheva I.V., Skhodova S.A., Kostinov M.P., Baranova I.A., Svitich O.A., Chuchalin A.G. Bacterial ligands in the rehabilitation of healthcare workers after COVID-19. *Pulmonologiya = Pulmonologiya*, 2022, no. 32, iss. 5, pp. 716–727. (In Russ.)] doi: 10.18093/0869-0189-2022-32-5-716-727
5. Оспельникова Т.П., Морозова О.В., Андреева С.А., Исаева Е.И., Колодяжная Л.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Ершов Ф.И. Отличия спектров РНК интерферонов и интерферон-индуцируемого гена MX1 при гриппозной и аденовирусной инфекциях // Иммунология. 2018. Т. 39. № 5–6. С. 290–293. [Ospelnikova T.P., Morozova O.V., Andreeva S.A., Isaeva E.I., Kolodyazhnaya L.V., Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Ershov F.I. Features of RNA spectra of interferons and interferon-induced gene MX1 for infections of humans with influenza and adenoviruses. *Immunologiya = Immunologiya*, 2018, vol. 39, no. 5–6, pp. 290–293. (In Russ.)] doi: 10.18821/0206-4952-2018-39-5-6-290-293
6. Патент № 2657808 Российская Федерация, МПК G01N 33/48 (2006.01). Способ определения продукции интерферонов как параметров врожденного иммунитета: № 2017124353; заявлено 10.07.2017; опубликовано: 15.06.2018 / Оспельникова Т.П., Колодяжная Л.В., Табаков В.Ю., Ершов Ф.И. Патентообладатели: Оспельникова Татьяна Петровна, Колодяжная Лариса Васильевна. 11 с. [Patent No.2657808 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/48 (2006.01). Method for determining production of interferons as congenital immunity parameters. No. 2017124353; application: 10.07.2017; date of publication 15.06.2018 / Ospelnikova T.P., Kolodyazhnaya L.V., Tabakov V.Yu., Ershov F.I. Proprietors: Ospelnikova Tatyana Petrovna, Kolodyazhnaya Larisa Vasilevna. 11 p.]
7. Adamczyk B., Morawiec N., Arendarczyk M., Baran M., Wierzbiicki K., Sowa P. Multiple sclerosis immunomodulatory therapies tested for effectiveness in COVID-19. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 2021, vol. 55, iss. 4, pp. 357–368. doi: 10.5603/PJNNS.a2021.0051
8. Gao Y.H., Guan W.J., Xu G., Lin Z.Y., Tang Y., Lin Z.M., Gao Y., Li H.M., Zhong N.S., Zhang G.J., Chen R.C. The role of viral infection in pulmonary exacerbations of bronchiectasis in adults: a prospective study. *Chest*, 2015, vol. 147, no. 6, pp. 1635–1643. doi: 10.1378/chest.14-1961
9. Ivashkiv L., Donlin L. Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2014, vol. 14, no. 1, pp. 36–49. doi: 10.1038/nri3581

10. Park A., Iwasaki A. Type I and type III interferons — induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19. *Cell. Host Microbe.*, 2020, vol. 27, no. 6, pp. 870–878. doi: 10.1016/j.chom.2020.05.008
11. Pierce C.A., Preston-Hurlburt P., Dai Y., Aschner C.B., Cheshenko N., Galen B., Garforth S.J., Herrera N.G., Jangra R.K., Morano N.C., Orner E., Sy S., Chandran K., Dziura J., Almo S.C., Ring A., Keller M.J., Herold K.C., Herold B.C. Immune responses to SARS-CoV-2 infection in hospitalized pediatric and adult patients. *Sci. Transl. Med.*, 2020, vol. 12, no. 564: eabd5487. doi: 10.1126/scitranslmed.abd5487
12. Ye L., Schnepf D., Staeheli P. Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2019, vol. 19, no. 10, pp. 614–625. doi: 10.1038/s41577-019-0182-z
13. Zhou Q., Chen V., Shannon C.P., Wei X.S., Xiang X., Wang X., Wang Z.H., Tebbutt S.J., Kollmann T.R., Fish E.N. Interferon- α 2b Treatment for COVID-19. *Front.s Immunol.*, 2020, no. 11: 1061. doi: 10.3389/fimmu.2020.01061
14. Van Reeth K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet. Microbiol.*, 2000, vol. 74, no. 1–2, pp. 109–116. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00171-1
15. Varga Z., Flammer A.J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A.S., Mehra M.R., Schuepbach R.A., Ruschitzka F., Moch H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10234, pp. 1417–1418. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5

Авторы:

Оспельникова Т.П., к.м.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией интерферонов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; старший научный сотрудник лаборатории цитокинов ФГБНУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия;

Свитич О.А., д.м.н., профессор РАН, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Ершов Ф.И., академик РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия.

Authors:

Ospelnikova T.P., PhD (Medicine), Leading Researcher, Head of the Interferon Laboratory, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation, Moscow, Russian Federation; Senior Researcher, Cytokines Laboratory, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Svitich O.A., DSc (Medicine), Professor of RAS, RAS Corresponding Member, Director of Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Ershov F.I., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Head Researcher, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 03.04.2024
Отправлена на доработку 06.04.2024
Принята к печати 06.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 06.04.2024
Accepted 06.04.2024

ЭКСПРЕССИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ (IL-18, IL-33) НА УРОВНЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ВХОДНЫХ ВОРОТ ИНФЕКЦИИ У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ ЗАБОЛЕВАНИЕ COVID-19

Н.Д. Рассказова¹, Н.Д. Абрамова¹, Т.Д. Сощенко^{1,3}, Н.О. Калюжная¹,
Е.А. Меремьянина^{1,2}, М.Н. Шатохин², Т.А. Зайцева³

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

² ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования МЗ РФ, Москва, Россия

³ ФGAOU ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. Введение. Слизистая оболочка верхних дыхательных путей является входными воротами для большого количества инфекций, в том числе и для вируса SARS-CoV-2. Именно поэтому главной задачей иммунной системы слизистых оболочек входных ворот инфекции является поддержание респираторной функции. Однако при длительном воздействии вируса SARS-CoV-2 действие защитных механизмов становится чрезмерным, способствуя нарушению баланса и развитию гипервоспалительной реакции. Высокая продукция провоспалительных цитокинов, играющих ключевую роль в развитии тяжелого течения инфекции COVID-19, приводит к пагубным последствиям для всех систем организма. Их длительное влияние способно не только усугублять хронические патологии, но и значительно увеличивать период восстановления, приводя к снижению качества жизни пациентов. Исследование экспрессионного профиля молекул провоспалительных цитокинов на уровне слизистых оболочек входных ворот инфекции позволит лучше понять патогенез заболевания COVID-19. Целью данной работы является изучение экспрессии генов IL-18 и IL-33 на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у пациентов, перенесших заболевание COVID-19. **Материалы и методы.** В настоящем исследовании принимали участие пациенты, переболевшие COVID-19 в среднетяжелой или тяжелой форме. Контрольную группу составили условно здоровые лица. Уровни экспрессии IL-18 и IL-33 выявляли с помощью ОТ ПЦР-РВ. **Результаты.** В течение всего периода реабилитации после перенесенного заболевания COVID-19 у пациентов наблюдалась тенденция к увеличению уровня экспрессии IL-18 на уровне слизистых оболочек носоглотки и ротоглотки. Уровень продукции IL-33 также повышался, однако варьировался в зависимости от локализации и периода сбора образца. Так на уровне слизистой оболочки ротоглотки увеличение наблюдалось на 6 и 8 месяц. На слизистой оболочке носоглотки повышение уровня экспрессии IL-33 происходило с различной интенсивностью на 4, 6 и 8 месяц. **Выводы.** Такое повышение уровня IL-18 в период реабилитации пациентов после COVID-19 может объясняться тем, что вирус посредством активации глии через нейроны обонятельных рецепторов запускает мощный иммунный ответ и способствует выработке большого количества провоспалительных цитокинов. Напротив, гиперэкспрессия IL-33 на поздних этапах

Адрес для переписки:

Рассказова Надежда Дмитриевна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (903) 560-09-52.
E-mail: neonovita@mail.ru

Contacts:

Nadezhda D. Rasskazova
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a,
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (903) 560-09-52.
E-mail: neonovita@mail.ru

Для цитирования:

Рассказова Н.Д., Абрамова Н.Д., Сощенко Т.Д., Калюжная Н.О., Меремьянина Е.А., Шатохин М.Н., Зайцева Т.А. Экспрессия провоспалительных цитокинов (IL-18, IL-33) на уровне слизистой оболочки входных ворот инфекции у лиц, перенесших заболевание COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 423–428. doi: 10.15789/2220-7619-EOP-16804

Citation:

Rasskazova N.D., Abramova N.D., Soshchenko T.D., Kalyuzhnaya N.O., Meremyanina E.A., Shatokhin M.N., Zaitseva T.A. Expression of pro-inflammatory cytokines (IL-18, IL-33) at the level of the mucous membrane, the entry point of infection, in persons who have experienced COVID-19 disease // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 423–428. doi: 10.15789/2220-7619-EOP-16804

реабилитации вероятнее всего связана с его способностью восстанавливать барьерные ткани слизистых оболочек верхних дыхательных путей. Таким образом, можно сделать вывод, что вирус способствует чрезмерной выработке провоспалительных цитокинов, чье количество максимально увеличивается на 6 месяц реабилитации после перенесенного заболевания COVID-19.

Ключевые слова: IL-18, IL-33, экспрессия, COVID-19, цитокиновый шторм, мукозальный иммунитет, провоспалительные цитокины.

EXPRESSION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES (IL-18, IL-33) AT THE LEVEL OF THE MUCOUS MEMBRANE, THE ENTRY POINT OF INFECTION, IN PERSONS WHO HAVE EXPERIENCED COVID-19 DISEASE

Rasskazova N.D.^a, Abramova N.D.^a, Soshchenko T.D.^{a,c}, Kalyuzhnaya N.O.^a, Meremyanina E.A.^{a,b}, Shatokhin M.N.^b, Zaitseva T.A.^c

^a I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Introduction. The mucous membrane of the upper respiratory tract is the entrance gate for a large number of infections, including the SARS-CoV-2 virus. That is why the main task of the immune system of the mucous membranes of the entrance gate of infection is to maintain respiratory function. High production of proinflammatory cytokines, which play a key role in the development of severe COVID-19 infection, leads to detrimental consequences for all body systems. Their long-term influence can not only aggravate chronic pathologies, but also significantly increase the recovery period, leading to a decrease in the quality of life of patients. Therefore, the purpose of this work is to study the expression of IL-18 and IL-33 genes at the level of the mucous membranes of the upper respiratory tract in patients who have had COVID-19 disease. **Materials and methods.** The present study involved patients who had moderate or severe COVID-19. The control group consisted of relatively healthy individuals. The expression levels of IL-18 and IL-33 were detected using RT-PCR. **Results.** During the entire period of rehabilitation after suffering from COVID-19, patients showed a tendency to increase the level of IL-18 expression at the level of the mucous membranes of the nasopharynx and oropharynx. The level of IL-33 production was also increased, but varied depending on the location and period of sample collection. **Conclusion.** This increase in the level of IL-18 during the rehabilitation period of patients after COVID-19 may be explained by the fact that the virus, by activating glia through olfactory receptor neurons, triggers a powerful immune response and promotes the production of a large number of pro-inflammatory cytokines. On the contrary, overexpression of IL-33 in the late stages of rehabilitation is most likely associated with its ability to restore barrier tissues of the mucous membranes of the upper respiratory tract. Thus, we can conclude that the virus promotes excessive production of pro-inflammatory cytokines, the amount of which increases maximally at the 6th month of rehabilitation after suffering from COVID-19.

Key words: IL-18, IL-33, interleukins, expression, COVID-19, cytokine storm, mucosal immune, proinflammatory cytokines.

Введение

Заболевание COVID-19, вызываемая вирусом SARS-CoV-2, представляет собой системное полиорганное заболевание, которое характеризуется широким спектром тяжести от бессимптомного течения до летального исхода, особенно в группах риска. Высокое базовое репродуктивное число (R_0) инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, распространилась повсеместно. За 3 года пандемии были зарегистрированы более чем 5 штаммов вируса SARS-CoV-2, что связано со способностью вирусных частиц быстро эволюционировать. Такой стремительный мутационный процесс вируса SARS-CoV-2 свидетельствует о возможности появления новых штаммов вируса, которые могут нести очередную угрозу общественному здравоохранению. На сегодняшний день известно, что протекание заболевания COVID-19 зависит не только от штамма вируса, но и от других факторов. Вовлеченность иммун-

ной системы в патофизиологический процесс заболевания COVID-19 в значительной степени влияет как на тяжесть течения заболевания, так и на процесс выздоровления. Известно так же о том, что у пациентов, перенесших COVID-19 сохраняется нарушение равновесия между врожденной и адаптивной иммунной системы, что свидетельствует о том, что инфекция, вызванная SARS-CoV-2, является иммуноопосредованным заболеванием. Пациенты, перенесшие COVID-19, сохраняют стойкие симптомы нарушения здоровья в течении длительного времени после перенесенного заболевания.

На сегодняшний день доказана ключевая роль цитокинов в развитии тяжелого течения данного заболевания [1, 2]. Цитокиновые маркеры представляют собой группу полипептидных сигнальных молекул, которые могут индуцировать и регулировать многие клеточные биологические процессы путем стимуляции клеточных рецепторов на поверхности [5]. Исследования

показали, что инфекция SARS-CoV-2 способна вызывать специфические воспалительные реакции в организме. Семейство IL-1, которое включает IL-1(α , β) IL-18 и IL-33 и др. цитокины, играет важную и центральную роль в регуляции воспалительных реакций, включая инфекционные воспаления в организме [4]. Интерлейкин-18 обладает важной способностью организма противостоять инфекциям. Помимо мощной индукции IFN γ , IL-18 активирует Т клетки киллеры, которые играют центральную роль в клиренсе вируса, что указывает на протективную роль IL-18 в вирусной инфекции [9, 11]. Другой член семейства интерлейкина 1, IL-33 играет важную роль в гомеостазе легких благодаря своему действию на процессы заживления ран, фиброза и ремоделирования [7]. Однако, заражение вирусом SARS-CoV-2 вызывает мощную гиперовоспалительную реакцию, которая не только приводит к тяжелому течению самого заболевания, но и способна длительное время после перенесенного заболевания в значительной степени влиять на организм. Такое длительное влияние на организм, способно усугублять хронические патологии, увеличивать период восстановления после тяжелого течения заболевания COVID-19 и снижать качество жизни у лиц, перенесших данное заболевание. Исследования экспрессионного профиля молекул провоспалительных цитокинов на уровне слизистых оболочек входных ворот инфекции позволит лучше понять патогенез самого заболевания COVID-19. Поэтому цель данной работы изучение экспрессии генов IL-18, IL-33 на уровне слизистых оболочек входных ворот инфекции у пациентов, перенесших заболевание COVID-19.

Материалы и методы

В настоящее исследование были включены пациенты ($n = 25$) перенесшие заболевание COVID-19. Контрольную группу составили ($n = 30$) условно здоровые пациенты, контактировавших с инфекцией SARS-CoV-2, но без подтвержденного анализа на SARS-CoV-2. В работе использовали биоматериал в виде соскобов слизистых оболочек ротоглотки и носоглотки. Забор материала производился цитощеточкой типа А (Юнона, РФ) и транспортировался в лабораторию в пробирке на 1,5 мл в физиологическом растворе (Панекко, РФ) в закрытом пакете. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов.

Из полученного биоматериала выделяли РНК методом сорбции на силикагеле с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» (Amplisense, Россия) в соответствии с протоколом проведения для данного набора. Проверка качества выделенной РНК для исследования

экспрессии генов осуществлялась с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000® (Thermo Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции и последующую ПЦР-РВ анализ проводили с помощью коммерческих наборов «Набор для обратной транскрипции ОТ-1» «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ). Последовательность праймеров для генов IL-18, IL-33 подбирали с помощью программы Vector NTI, анализируя последовательность интересующих генов, полученную из GenBank.

Стандартизация результатов ПЦР-РВ проводилась по уровню экспрессии гена «домашнего хозяйства» β -актина. Обхват экспрессии гена был посчитан методом относительного анализа экспрессии гена с использованием метода $\Delta\Delta Ct$.

Результаты и обсуждение

Слизистая оболочка носоглотки и ротоглотки постоянно подвергаются вдыхаемым аллергенам, канцерогенам и патогенам, таким как респираторные вирусы. Полости носоглотки и ротоглотки являются местом как проникновения вируса, так и местом начальной репликации SARS-CoV-2. Иммунный ответ на вирусные инфекции инициируется врожденной иммунной системой, которая распознает патогены и индуцирует выработку провоспалительных цитокинов и хемокинов. Активация распознающих структур врожденного иммунитета и последующая выработка провоспалительных цитокинов способна эффективно элиминировать вирусные частицы, однако при длительном воздействии вируса SARS-CoV-2 может вызывать затяжной воспалительный процесс, который приводит как к тяжелому течению заболевания, так и к летальному исходу COVID-19. Для поддержания респираторной функции, иммунная система слизистой оболочки входных ворот инфекции должна соблюдать тщательный баланс между минимизацией повреждения тканей, вызванного воспалением, и адекватным действием на такие угрозы, как инфекция SARS-CoV-2. Длительная гиперовоспалительная реакция с высокой продукцией провоспалительных цитокинов в дальнейшем может приводить к повреждению тканей и к системному воспалению. Хотя было множество работ по профилированию динамики иммунного ответа у пациентов с COVID-19, включая передовые методы анализа отдельных клеток, практически все эти исследования были сосредоточены на системном уровне [4, 10]. Поэтому оценка уровня экспрессии эффекторных молекул врожденного иммунитета, таких как IL-18, IL-33 в период реабилитационного процесса у лиц, перенесших COVID-19, поможет раскрыть молекулярные процессы, происходящие в иммунной

системе на уровне слизистых оболочек. В работе получены следующие результаты (рис. 1).

Нами была выявлена тенденция к увеличению экспрессии гена IL-18 на уровне слизистых оболочек носоглотки и ротоглотки у лиц, перенесших заболевание COVID-19, в течении всего периода реабилитации (4, 6, 8 месяцев после перенесенного заболевания), однако достоверных отличий не было выявлено. Повышенный уровень экспрессии провоспалительного цитокина IL-18 может объясняться тем, что вирус, действуя на слизистый эпителий входных ворот инфекции, запускает мощный провоспалительный процесс на уровне слизистых оболочек и в дальнейшем, как только вирус попадает в нейроны обонятельных рецепторов, инфекция распространяется через синаптические связи. В случае оси «нейроны обонятельных рецепторов—митральные клетки» происходит активация глии, которая, в свою очередь, способствует высвобождению провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 α , IL-1 β , IL-18, и др. [3, 8, 11]. Такая гиперовоспалительная реакция может вызвать, как легкие симптомы anosмии, которые продолжаются после заболевания COVID-19, так серьезные длительные повреждение центральной нервной системы.

Заражение вирусом SARS-CoV-2 приводит к высвобождению IL-33, а повышенные уровни IL-33 связывают с тяжестью и неблагоприятными исходами при COVID-19. Роль IL-33 при COVID-19 может быть связана с регуляцией интерферона (IFNs) [6]. Известно, что вирусные инфекции приводят к повышенному высвобождению IFNs, а также уровням IL-33, а IFN γ ингибирует активацию и пролиферацию врожденных лимфоидных клеток типа II через IL-33-зависимый путь и способствует иммунному ответу Th1. IL-33, являясь основным участником цитокинового шторма, играет ключевую роль в патологических изменениях после заболевания COVID-19 [6]. Нами было выявлено (рис. 2) достоверное увеличение в 13,1 раз уровня экспрессии IL-33 на уровне слизистой оболочки ротоглотки на 6 месяцев после перенесенного заболевания COVID-19. Так же нами была выявлена тенденция к увеличению ($p = 0,068$) в 4,6 раз на 8 месяцев реабилитации после перенесенного заболевания COVID-19 на уровне слизистой оболочки ротоглотки. На уровне слизистой оболочки носоглотки наблюдалось достоверное увеличение уровня экспрессии IL-33 в 79,8, 1447,3 и 1371 раз на 4-й, 6-й, 8-й месяцы после перенесенного заболевания соответственно

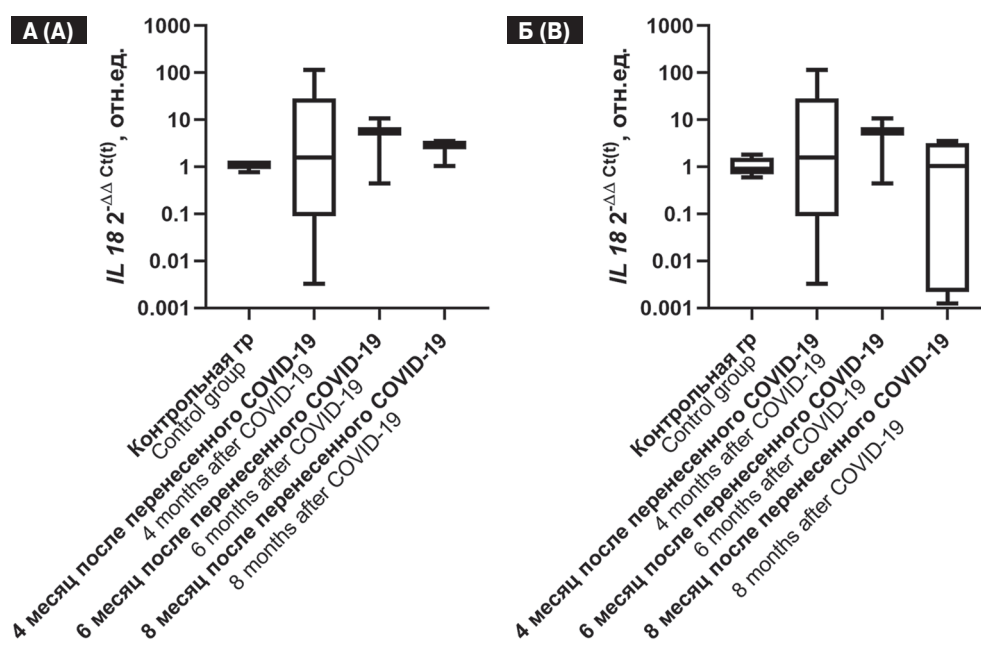


Рисунок 1. Экспрессия IL-18 на уровне слизистых оболочек входных ворот инфекции у лиц, перенесших заболевание COVID-19

Figure 1. Expression of IL-18 at the level of mucous membranes at the entrance gates of infection in individuals who have had COVID-19 disease

Примечание. А. Экспрессия IL-18 на уровне слизистой оболочки носоглотки. По оси абсцисс — время и группы, по оси ординат — относительные единицы от числа копий β -актина. Б. Экспрессия IL-18 на уровне слизистой оболочки ротоглотки. По оси абсцисс — время и группы, по оси ординат — относительные единицы от числа копий β -актина.

Note. A. IL-18 expression at the level of the nasopharyngeal mucosa. The x-axis is time and groups. Y axis Relative units of β -actin copy number. B. Expression of IL-18 at the level oropharyngeal of the mucosa. The x-axis is time and groups, y-axis — relative units of number of β -actin copies.

относительно контрольной группы. Такая гиперэкспрессия IL-33 у лиц перенесших заболевание COVID-19 может быть связана с тем что на поздних стадиях заболевания COVID-19 IL-33 индуцирует гиперактивацию ILC2, дифференцировку поочередно активированных макрофагов M2 и секрецию TGF- β и IL-13 из тучных клеток, что может приводить к трансформации эпителиальных клеток в мезенхимальные клетки и в дальнейшем приводить к легочному фиброзу [12]. Полученные данные позволяют предположить, что IL-33 является ключевым медиатором не только в острой фазе инфекции SARS-CoV-2, но также в процессах заживления ран и восстановления барьерных тканей слизистых оболочек входных ворот инфекции. Несмотря на открытия относительно патофизиологии инфекции, сложность механизмов, участвующих в развитии COVID-19, все еще остается множество вопросов как относительно самого заболевания, так и патологических состояний после перенесенного COVID-19. Более того, участие многих медиаторов, включая воспалительные цитокины, вовлеченность слизис-

тых оболочек, делает исследования еще более сложными. Таким образом, изучение экспрессии эффекторных молекул врожденного иммунитета, приводящих как к развитию тяжелого течения заболевания COVID-19, так и длительным изменениям в иммунной системе в течение времени после выздоровления, позволяет лучше понять молекулярные механизмы, связанные COVID-19.

Благодарности

Авторы выражают благодарность д.м.н., профессору, члену-корреспонденту РАН Свитич О.А. а также д.м.н., профессору, члену-корреспонденту РАН Костинову М.П. за всестороннюю помощь в разработке концепции исследования, а также за предоставление материала исследования.

Авторы благодарят сотрудников кафедры госпитальной терапии ПФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова: академика РАН, д.м.н., профессора, заведующего кафедрой госпитальной терапии ПФ Чучалина А.Г. а также профессора кафедры госпитальной терапии ПФ Барановой И.А.

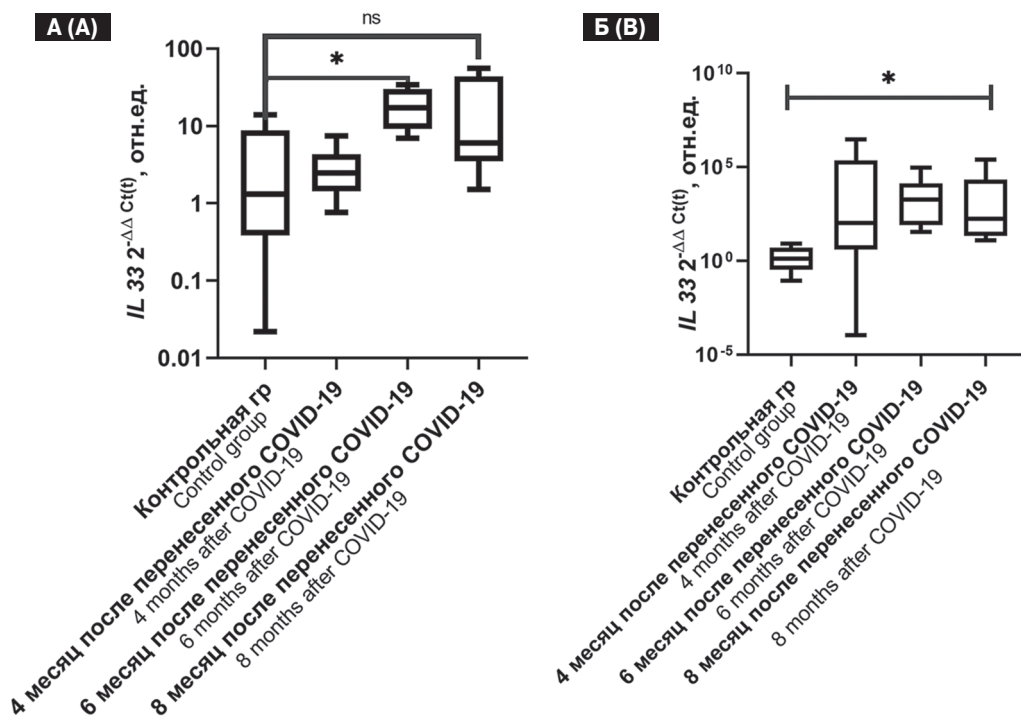


Рисунок 2. Экспрессия IL-33 на уровне слизистой входных ворот инфекции у лиц, перенесших заболевание COVID-19

Figure 2. Expression of IL-33 at the mucosal level at the entry gates of infection in individuals who have had COVID-19 disease

Примечание. А. Экспрессия IL-33 на уровне слизистой оболочки ротоглотки. По оси абсцисс время и группы, по оси ординат — относительные единицы от числа копий β -актина. * — $p \leq 0,05$ по тесту Манна–Уитни. Б. Экспрессия IL-33 на уровне слизистой оболочки носоглотки. По оси абсцисс время и группы, по оси ординат — относительные единицы от числа копий β -актина. * — $p \leq 0,05$ по тесту Манна–Уитни.

Note. A. IL-33 expression at the level of the oropharyngeal mucosa. The x-axis is time and groups. Y axis Relative units of β -actin copy number. * — $p \leq 0.05$ by Mann–Whitney test. B. Expression of IL-33 at the level of the nasopharyngeal mucosa. The x-axis is time and groups, y axis — relative units of number of β -actin copies. * — $p \leq 0.05$ by Mann–Whitney test.

Список литературы/References

1. Свитич О.А., Филина А.Б., Давыдова Н.В., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Роль факторов врожденного иммунитета в процессе опухолеобразования // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 2. С. 151–162. [Svitich O.A., Filina A.B., Davydova N.V., Gankovskaya L.V., Zverev V.V. The role of innate immune factors in the process of tumor formation. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, vol. 20, no. 2, pp. 151–162. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-151-162
2. Хашукоева А.З., Свитич О.А., Маркова Э.А., Отдельнова О.Б., Хлынова С.А., Фотодинамическая терапия — противовирусная терапия? История вопроса. Перспективы применения // Лазерная медицина. 2012. Т. 16, № 2. С. 63–67. [Hashukoeva A.Z., Svitich O.A., Markova E.A., Otdel'nova O.B., Hlynova S.A. Photodynamic therapy — antiviral therapy? History of the issue. Prospects for use. *Lazernaya meditsina = Laser Medicine*, 2012, vol. 16, no. 2, pp. 63–67. (In Russ.)]
3. Albani S., Cervia D., Sugama S., Conti B. Interleukin 18 in the CNS. *J. Neuroinflammation*, 2010, vol. 7: 9.
4. Barteel E., McFadden G. Cytokine synergy: an underappreciated contributor to innate anti-viral immunity. *Cytokine*, 2013, vol. 63, no. 3, pp. 237–240.
5. Fathi F., Sami R., Mozafarpour S., Hafezi H., Motedayyeh H., Arefnezhad R., Eskandari N. Immune system changes during COVID-19 recovery play key role in determining disease severity. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2020, vol. 34: 2058738420966497.
6. Gao Y., Cai L., Li L., Zhang Y., Li J., Luo C., Wang Y., Tao L. Emerging Effects of IL-33 on COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no 21: 13656.
7. Gaurav R., Poole J.A. Interleukin (IL)-33 Immunobiology in Asthma and Airway Inflammatory Diseases. *J. Asthma*, 2022, vol. 59, no 12, pp. 2530–2538.
8. Gea-Mallorqui E. IL-18-dependent MAIT cell activation in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, vol. 20, no 12: 719.
9. Schooling C.M., Li M., Au Yeung S.L. Interleukin-18 and COVID-19. *Epidemiol. Infect.*, 2021, vol. 150: e14.
10. Schultheiß C., Willscher E., Paschold L., Gottschick C., Klee B., Bosurgi L., Dutzmann J., Sedding D., Frese T., Girndt M., Höll J.I., Gekle M., Mikolajczyk R., Binder M. Liquid biomarkers of macrophage dysregulation and circulating spike protein illustrate the biological heterogeneity in patients with post-acute sequelae of COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2023, vol. 95, no 1: e28364.
11. Yasuda K., Nakanishi K., Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 3: 649.
12. Zizzo G., Cohen P.L. Imperfect storm: is interleukin-33 the Achilles heel of COVID-19? *Lancet Rheumatol.*, 2020, vol. 2, no. 12, pp. e779–e790. doi: 10.1016/S2665-9913(20)30340-4

Авторы:

Рассказова Н.Д., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Абрамова Н.Д., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Сощенко Т.Д., лаборант-исследователь лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия; студентка 6 курса Международной школы «Медицина будущего», кафедра биологической химии ФГАУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Калюжная Н.О., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Меремьянина Е.А., к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия; старший преподаватель кафедры вирусологии ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования МЗ РФ, Москва, Россия;

Шатохин М.Н., д.м.н., профессор, профессор кафедры эндоскопической урологии ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования МЗ РФ, Москва, Россия;

Зайцева Т.А., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия.

Authors:

Rasskazova N.D., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Abramova N.D., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Soshchenko T.D., Research Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; 6th year Student at the International School "Medicine of the Future", Department of Biological Chemistry, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Kalyuzhnaya N.O., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Meremianina E.A., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Senior Lecturer, Department of Virology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education MOH Russia, Moscow, Russian Federation;

Shatokhin M.N., DSc (Medicine), Professor, Professor of the Department of Endoscopic Urology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education MOH Russia, Moscow, Russian Federation;

Zaitseva T.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erismann Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРИ COVID-19 И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ГЕНОВАРИАНТОМ ВИРУСА

З.Р. Коробова^{1,2}, Н.Е. Любимова¹, Н.А. Арсентьева¹, М.С. Жебелева², Е.И. Черных³,
В.В. Давлетшина³, В.А. Кашченко^{3,4}, А.А. Тотолян^{1,2}

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ Северо-Западный окружной научно-клинический центр им. Л.Г. Соколова ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Фактором, влияющим на показатель летальности, является своевременная диагностика COVID-19, а исследование связи биохимических маркеров и тяжести течения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, имеет важное значение. Первая волна COVID-19, связанная с распространением оригинального штамма SARS-CoV-2, сопровождалась высокой летальностью и тяжелым течением инфекции. Именно при первой волне COVID-19 наиболее часто наблюдался цитокиновый шторм. По мере сменяемости геноварианта наблюдалось изменение клинической картины в сторону менее выраженной воспалительной реакции. Эти изменения касались и участников воспаления, цитокинов. Однако цитокины — не единственные маркеры воспалительной реакции. Целью данной работы стало определить значимость лабораторных маркеров воспалительной реакции: абсолютного числа лимфоцитов, С-реактивного белка, ферритина, фибриногена, D-димера. В исследование вошло 227 пациентов с острым COVID-19, проходивших лечение в СЗОНКЦ им. Соколова в 5–7 сутки от начала заболевания. Исследование проводилось с января 2021 г. по март 2022 г. При сравнении с референсными значениями было отмечено, что для всех групп характерны сниженные абсолютные значения лимфоцитов. Корреляционный анализ между абсолютным значением лимфоцитов и концентрациями цитокинов в плазме крови также выявил статистически достоверные сильные взаимосвязи с уровнем хемокина CCL22/MDC. С учетом того, что CCL22/MDC является важным компонентом лимфопоеза, его низкие концентрации могут свидетельствовать о нарушении регуляции этого процесса при COVID-19. Нами была отмечена положительная взаимосвязь между уровнем С-реактивного белка и IL-6 в периферической крови. IL-6 является провоспалительным цитокином, его повышенные уровни связывают с развитием тяжелого COVID-19; одной из его функций является индукция С-реактивного белка, и эта тенденция сохраняется вне зависимости от того, каким геновариантом вызван COVID-19. Также нами были отмечены положительные корреляции между концентрациями фибриногена и IL-18, ферритина и IL-6, IL-18. Оба этих белка являются участниками воспаления наравне с цитокинами; в литературе представлены данные о значимости этих маркеров для определения тяжести COVID-19; существуют данные о синергичном действии ферритина и IL-18 против вирусных возбудителей. Интерес представила отрицательная корреляция между уровнем D-димера в плазме и IFN α ; при этом в литературе все чаще возникают данные о роли последнего в процессах тромбообразования.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, С-реактивный белок, ферритин, D-димер, фибриноген, лимфопения.

Адрес для переписки:

Коробова Зоя Романовна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (921) 400-26-83. E-mail: zoia-korobova@yandex.ru

Contacts:

Zoya R. Korobova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (921) 400-26-83. E-mail: zoia-korobova@yandex.ru

Для цитирования:

Коробова З.Р., Любимова Н.Е., Арсентьева Н.А., Жебелева М.С., Черных Е.И.,
Давлетшина В.В., Кашченко В.А., Тотолян А.А. Лабораторные показатели
крови при COVID-19 и их взаимосвязь с геновариантом вируса // Инфекция
и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 429–436. doi: 10.15789/2220-7619-
LBM-16765

Citation:

Korobova Z.R., Liubimova N.E., Arsentieva N.A., Zhebeleva M.S.,
Chernykh E.I., Davletshina V.V., Kashchenko V.A., Totolian A.A. Laboratory
blood markers in COVID-19 and their connection to viral variant // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14,
no. 3, pp. 429–436. doi: 10.15789/2220-7619-LBM-16765

© Коробова З.Р. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-LBM-16765>

LABORATORY BLOOD MARKERS IN COVID-19 AND THEIR CONNECTION TO VIRAL VARIANT**Korobova Z.R.^{a,b}, Liubimova N.E.^a, Arsentieva N.A.^a, Zhebeleva M.S.^b, Chernykh E.I.^c, Davletshina V.V.^c, Kashchenko V.A.^{c,d}, Totolian A.A.^{a,b}**^a *St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*^b *Pavlov First State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation*^c *North-Western District Scientific and Clinical Center Named after L.G. Sokolov, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation*^d *St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. Morality rates in COVID-19 are dependent on timely diagnosis. Therefore, studying the relationship between laboratory markers and the severity of disease is important. The first wave of COVID-19 associated with the spread of the original strain of SARS-CoV-2, showed higher mortality rates caused by cytokine storm. As the viral variant changed, a change in the disease course towards a less pronounced inflammatory reaction was observed. These changes affected major players of inflammation, cytokines. However, cytokines are not the only markers in the inflammatory response. The purpose of this work was to determine the significance of laboratory markers in inflammation: WBC, C-reactive protein, ferritin, fibrinogen, and D-dimer. The study included 227 patients with acute COVID-19 in the first 5–7 days from the onset of the disease from January 2021 to March 2022. When compared with reference, all groups were characterized by reduced absolute values of lymphocytes. Correlation analysis between the absolute value of lymphocytes and plasma cytokine concentrations also revealed statistically significant strong relationships with the level of the chemokine CCL22/MDC. Given that CCL22/MDC is an important component of lymphopoiesis, its low concentrations may indicate dysregulation of this process in COVID-19. In addition, we noted a positive correlation between the level of C-reactive protein and IL-6 in peripheral blood. IL-6 is a proinflammatory cytokine, and its elevated levels have been associated with the development of severe COVID-19. One of its functions is the induction of C-reactive protein, and this trend persists regardless of which variant causes COVID-19. We also noted positive correlations between the concentrations of fibrinogen and IL-18, ferritin and IL-6, IL-18. Both of these proteins are involved in inflammation along with cytokines. The literature provides data on the significance of these markers for determining the severity of COVID-19. There is evidence of a synergistic effect of ferritin and IL-18 against viral pathogens. Of interest was the negative correlation between plasma D-dimer levels and IFN α . At the same time, data on the role of the latter in thrombus formation processes are increasingly appearing in the literature.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, CRP, ferritin, D-dimer, fibrinogen, lymphopenia.

Введение

С начала пандемии новая коронавирусная инфекция стала причиной более 60 тысяч случаев смерти в России [4]. Фактором, влияющим на показатель летальности, является своевременная диагностика COVID-19, а исследование связи биохимических маркеров и тяжести течения инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, имеет важное значение.

Первая волна COVID-19, связанная с распространением оригинального штамма SARS-CoV-2, сопровождалась высокой летальностью и тяжелым течением инфекции. Именно при первой волне COVID-19 наиболее часто наблюдался цитокиновый шторм. Цитокины являются ключевыми маркерами протективных свойств иммунитета и активности воспаления [13]. Цитокины необходимы для осуществления межклеточных взаимодействий, активации клеток, их пролиферации [18], их сдвиг может привести к гипертрофии.

По мере сменяемости геноварианта наблюдалось изменение клинической картины в сторону менее выраженной воспалительной реакции [20]. Ранее нами было показано, что цитокиновый профиль при COVID-19 меняется между геновариантами [25, 26]. При этом изменения цитокинового профиля пациентов

с геновариантами Альфа, Дельта и Омикрон, становились менее выраженными по мере изменчивости вируса. При изучении COVID-19 важно исследовать пациентов, инфицированных разными геновариантами.

Цитокины — не единственные маркеры воспаления при COVID-19. В настоящее время в литературе описана корреляционная связь между повышением уровня биохимических маркеров и тяжестью клинического течения. COVID-19 — это не локализованная респираторная инфекция, а системное заболевание, включающее взаимодействие иммунологических, воспалительных и коагуляционных каскадов [31].

Letelier и соавт. указывают на связь уровня IL-6 и высокой смертности от COVID-19, а повышение уровня С-реактивного белка (СРБ) связывают с тяжелым течением [28]. Повышение уровня IL-6 и СРБ наблюдалось при респираторной дисфункции [12]. СРБ, как маркер неспецифического воспаления указывает на тяжесть клинического течения. Если у пациентов со среднетяжелым течением заболевания уровень этого реактанта острой фазы воспаления возрастал в 7,5 раз по сравнению с контрольной группой, то у пациентов с тяжелым течением и летальным исходом увеличение составило 20,8 и 28,3 раза соответственно [1].

Данных о зависимости общелабораторных маркеров воспаления от геноварианта SARS-CoV-2 не представлено в литературе.

Таким образом, целью работы стало определить значимость лабораторных маркеров воспалительной реакции: абсолютного числа лимфоцитов, С-реактивного белка, ферритина, фибриногена, D-димера, и цитокинов/хемокинов, в ассоциации с геновариантом SARS-CoV-2.

Материалы и методы

В исследование вошло 227 пациентов с острым COVID-19, проходивших лечение в СЗОНКЦ им. Соколова в 5–7 сутки от начала заболевания. Исследование проводилось с января 2021 г. по март 2022 г.

Критериями исключения из исследования стали: предшествующие COVID-19 и вакцинация от этой инфекции, наличие сопутствующих заболеваний в стадии обострения, беременность. Все участники исследования подписывали информированное добровольное согласие, исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией и было одобрено локальным этическим комитетом научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (заключение № 67 от 28.04.2021).

Средний возраст составил 56 ± 8 лет, процент мужчин в выборке — 55% ($n = 127$), женщин — 45% ($n = 100$).

На этапе поступления в приемный покой у пациентов отбиралась цельная кровь с К2ЭДТА, до назначения комбинированной терапии. В то же время в назофарингеальных мазках коллективом лаборатории молекулярно-генетического мониторинга ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера проводилось определение геновариантов SARS-CoV-2 [17].

Были получены следующие группы:

- геновариант Альфа (B.1.1.7) — 94 человека;
- геновариант Дельта (B.1.617.2) — 77 человек;
- геновариант Омикрон (B.1.1.529) — 56 человек.

В стационаре была проведена оценка тяжести течения COVID-19. В соответствии с этим пациенты были разделены на группы (табл. 1)

Нами проводилась оценка гематологических показателей (абсолютных и относительных значений лимфоцитов) с использованием гематологического анализатора Pentra 60 (HORIBA ABX, Франция). В исследование был включен анализ биохимических показателей крови: СРБ, D-димера, фибриногена, ферритина, которые измерялись с использованием анализатора Furuno CA-270 (Furuno Electric Co., Япония).

Также в плазме крови определялись концентрации цитокинов с использованием тест-

систем «Milliplex MAP» (Millipore, США), основанных на технологии Luminex xMAP (Luminex, США).

Для обработки и анализа данных использовался пакет программ GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для сравнений использовался критерий Краскела–Уоллеса с поправкой на множественные сравнения. Для определения взаимосвязей применялся критерий Спирмана R, сила взаимосвязей определялась по шкале Чеддока. Статистическая значимость определялась при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Лимфоциты

Первым этапом стало сравнение показателей лимфоцитов в разных группах. При сравнении с референсными значениями было отмечено, что для всех групп характерны сниженные абсолютные значения лимфоцитов. При этом для геноварианта Омикрон лимфопения была менее характерна, чем для других вариантов ($p < 0,0001$), но отмечалась при тяжелом течении. Данные о сравнении групп представлены на рис. 1.

Лимфопения при COVID-19 отмечается целым рядом исследователей. Так, в исследовании M. Samprathi и соавт. [33] отмечено, что лимфопения — это признак COVID-19, а через 7–14 дней после появления симптомов развитие значительной лимфопении совпадает с ухудшением клинического состояния, повышением уровня медиаторов воспаления и цитокиновым штормом. В мета-анализе Huang и Pranata была установлена связь между лимфопенией и тяжестью развития заболевания при COVID-19: чем тяжелее протекало заболевание, тем ниже был уровень лимфоцитов [21].

Корреляционный анализ между абсолютным значением лимфоцитов и концентрациями цитокинов в плазме крови также выявил статистически достоверные взаимосвязи. Так, при варианте Альфа отмечались слабые отрицательные корреляции с $IFN\gamma$ ($R = -0,422$, $p = 0,031$) и $IL-1RA$ ($R = -0,493$, $p = 0,012$). Для варианта Дельта была характерна отрицательная слабая взаимосвязь с $IL-3$ ($R = -0,471$, $p = 0,022$), а для варианта Омикрон — слабая положительная корреляция с $IL-1\beta$ ($R = 0,415$, $p = 0,040$) и отрицательная корреляция средней силы — с $TNF\alpha$ ($R = -0,565$, $p = 0,001$). При всех геновариантах наблюдалась средняя корреляция между абсолютными значениями лимфоцитов и хемокином CCL22/MDC ($R = 0,651$, $p = 0,002$; $R = 0,562$, $p = 0,020$ и $R = 0,501$, $p = 0,045$ для вариантов Альфа, Дельта и Омикрон, соответственно). Отмеченная нами тенденция повышения концентраций провоспалительных цитокинов при снижении абсолютных значений

лимфоцитов подтверждается и другими литературными данными [13, 23].

Наибольшее внимание привлек хемокин CCL22/MDC и его связь с содержанием лимфоцитов. Ранее нами было отмечено, что при COVID-19, вызванном основными геновариантами вируса, наблюдаются сниженные концентрации этого хемокина [25]. С учетом того, что CCL22/MDC является важным компонентом лимфоэза, его низкие концентрации могут свидетельствовать о нарушении регуляции этого процесса при COVID-19 [28].

С-реактивный белок

СРБ — это альфа-глобулин острой фазы, который рассматривается как лабораторный показатель острого воспалительного процесса, повреждения тканей [11].

Для всех групп было характерно статистически значимое повышение СРБ, причем концентрации этого маркера воспаления превышали референсные значения в 2–30 раз. Данные о сравнении С-реактивного белка с референсными значениями представлены на рис. 1.

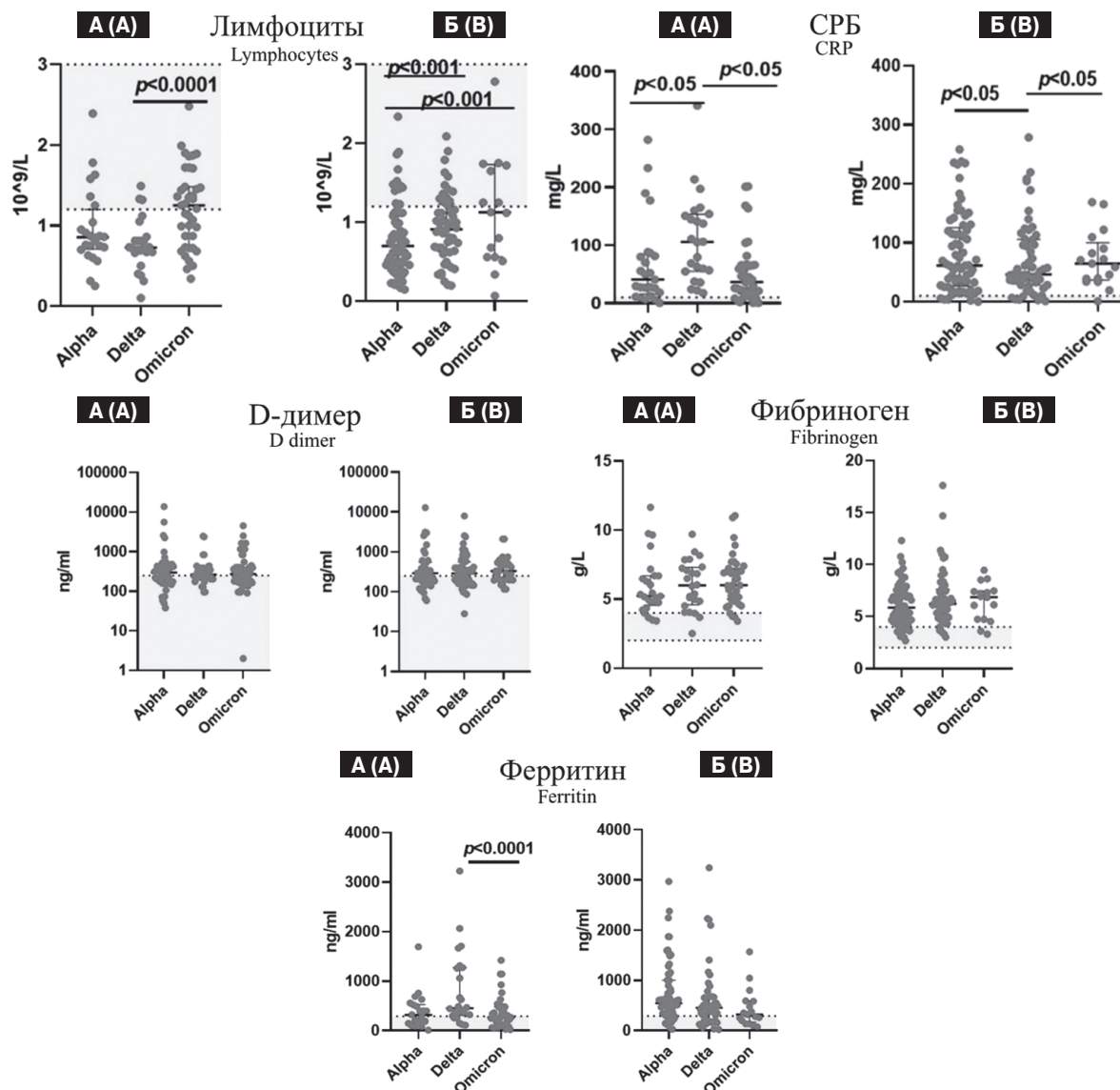


Рисунок 1. Абсолютные значения лимфоцитов (кл $\times 10^9$ /л), концентрации С-реактивного белка (мг/л), D-димера (нг/мл), фибриногена (г/л), ферритина (нг/мл) в зависимости от геноварианта вируса у пациентов со среднетяжелым (А) и тяжелым (Б) течением заболевания

Figure 1. Absolute lymphocyte count (cells $\times 10^9$ /l), CRP, D-dimer, fibrinogen and ferritin concentrations based on viral variant in patients with moderate (A) and severe (B) disease

Примечание. Светло-серая полоса обозначает референсные значения для данного показателя. Серые точки обозначают те группы, которые показывают статистически достоверные различия при сравнении с референсными значениями.

Note. Lightgray stripe represents reference numbers for each parameter. Gray dots represent statistically significant differences between groups and references.

При анализе концентраций СРБ и цитокинов отмечались положительные корреляции с уровнями ИЛ-6 в плазме. При геноварианте Альфа отмечались слабые корреляции только при тяжелом течении заболевания ($R = 0,297$, $p = 0,015$), но для других геновариантов актуальность этой связи значительно возросла ($R = 0,487$, $p = 0,001$ для варианта Дельта, $R = 0,580$, $p = 0,20$ для варианта Омикрон). Данные о взаимосвязи этих молекул представлены в литературе — в исследованиях Picod и соавт. [30], Vakiri и соавт. [12] подчеркивается взаимосвязь СРБ рядом воспалительных маркеров, в том числе ИЛ-6, который является индуктором синтеза СРБ. Высокие концентрации ИЛ-6 ведут к системным воспалительным эффектам, реализуемым, в том числе, через СРБ [34].

Однако ИЛ-6 и СРБ служат не только маркерами воспалительной реакции; их ассоциируют с развитием изменений сосудов [14]. Эти молекулы рассматриваются как часть регуляторных механизмов, лежащих в основе поддержания гомеостаза крови в условиях инфекции [16].

Д-димер

Другим важным маркером воспалительной реакции при COVID-19 с учетом формирующихся тромботических осложнений является Д-димер.

Д-димер — это продукт распада фибрина, его обнаружение в крови свидетельствует о распаде фибриновых нитей, и запуске системы свертывания крови [7].

Концентрации Д-димера в крови продемонстрировали повышение в сравнении с референсными значениями (рис. 1).

При этом корреляционный анализ продемонстрировал отрицательную взаимосвязь между концентрациями Д-димера и $IFN\alpha$. В случае инфекции вариантом Альфа показа-

тель R составил $-0,5358$, $p = 0,0084$; для варианта Дельта $R = -0,37$, $p = 0,0064$; для варианта Омикрон — $R = -0,5343$, $p = 0,0291$.

Интерфероны I типа в плазме крови представлены в литературе как участники коагуляционного каскада, так же, как Д-димер [32]. При этом формирующиеся во время COVID-19 аутоантитела к $IFN\alpha$ играют роль в развитии более тяжелых форм COVID-19 и неблагоприятного исхода [5]. При COVID-19 отмечается дисрегуляция выработки интерферонов I типа [8,9], что, в совокупности с активацией факторов коагуляции, может быть причиной развития тромботических осложнений, сопровождающих течение COVID-19.

Фибриноген

Помимо Д-димера, еще одним участником коагуляционного процесса является белок фибриноген. Фибриноген — это первый белок-фактор свертывания крови, растворимый белок плазмы крови, который под действием фермента тромбина превращается в нерастворимый полимерный фибрин, составляющий основу сгустка крови, а также острофазный белок, характеризующий наличие повреждения тканей или воспаление в организме [15]. При сравнении с референтными значениями, показатели фибриногена были повышенными во всех группах, вне зависимости от геноварианта и степени тяжести течения инфекции (рис. 1).

При этом корреляционный анализ показал слабые положительные корреляции с ИЛ-18 для всех геновариантов ($R = 0,267$, $p = 0,033$ для варианта Альфа, $R = 0,514$, $p = 0,0101$ для варианта Дельта и $R = 0,3784$, $p = 0,010$ для варианта Омикрон). Также нами были отмечены корреляции между фибриногеном и уровнями ИЛ-6 ($R = 0,285$, $p = 0,0235$ для варианта Альфа и $R = 0,686$, $p < 0,0001$ для варианта Омикрон), ИЛ-15 ($R =$

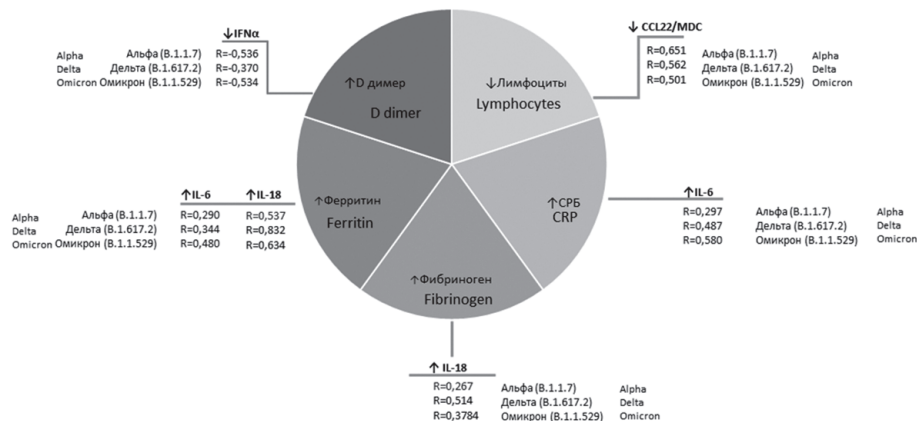


Рисунок 2. Наблюдаемые при COVID-19 константные изменения со стороны показателей крови и их значимая взаимосвязь с цитокинами/хемокинами

Figure 2. COVID-associated changes in blood parameters and their connection to cytokines/chemokines

0,272, $p = 0,030$ для варианта Альфа, $R = 0,511$, $p < 0,0001$ для варианта Омикрон). Фибриноген является активатором воспалительных иммунных реакций; в экспериментальных моделях он стимулирует выработку цитокинов, в том числе IL-6 [22]. Наравне с D-димером, высокие концентрации фибриногена являются прогностическими маркерами неблагоприятного исхода, вызванного нарушениями коагуляции при COVID-19 [24].

Ферритин

Один из биомаркеров, вызывающих интерес, является ферритин, уровень которого в крови значительно повышается при тяжелом течении COVID-19. Ферритин выполняет специфические физиологические функции, такие как аккумуляция железа, и рассматривается как острофазовый белок в сочетании с С-реактивным белком (СРБ) [6]. Уровень ферритина может возрастать в результате деструкции тканей [24].

Мы отмечали повышенные концентрации ферритина в крови вне зависимости от геноварианта вируса (рис. 1). При тяжелом течении отмечались повышенные концентрации этого биохимического показателя ($p < 0,001$).

Вне зависимости от геноварианта отмечалась положительная корреляция между ферритином и IL-18, причем чем тяжелее течение заболевания — тем сильнее взаимосвязь. При варианте Альфа при среднем течении заболевания $R = 0,2845$, $p = 0,017$, а при тяжелом — $R = 0,5735$, $p = 0,020$. При варианте Дельта при средней тяжести заболевания $R = 0,302$, $p = 0,015$; при тяжелом течении $R = 0,8329$, $p < 0,0001$. При варианте Омикрон при среднем течении заболевания $R = 0,362$, $p = 0,023$, при тяжелом — $R = 0,634$, $p = 0,006$. Сила корреляций между IL-6 и уровнем ферритина не зависела от тяжести течения. При варианте Альфа показатель R составил 0,2899, $p = 0,017$, при варианте Дельта $R = 0,344$, $p = 0,013$. При варианте Омикрон — $R = 0,480$, $p = 0,002$.

Являясь воспалительным маркером, ферритин часто ставится в один ряд с IL-6 и IL-18 [18]. При этом известно, что и IL-6, и IL-18 являются важными маркерами тяжести COVID-19 [2]. Предположительно, ферритин работает в синергии с IL-18, причем Slaats и соавт. предлагают свою модель иммунного ответа, в которой комплекс IL-1 β /IL-6/С-реактивный белок является медиатором иммунного ответа, направ-

ленного на бактерии, в то время как комплекс IL-18/ферритин осуществляет иммунный ответ против вирусов [34]. При этом IL-18 в таком случае продуцируется не макрофагами, а поврежденным эндотелием.

Заключение

Несмотря на изменчивость вируса, некоторые паттерны воспаления сохраняют свою значимость от геноварианта к геноварианту и носят так называемый «константный» характер (см. рис. 2). В частности, важна взаимосвязь между сниженным уровнем хемокина CCL22/MDC в плазме крови и абсолютной лимфопенией. CCL22/MDC является важным регулятором воспаления и лимфопоэза, что может служить одной из причин для формирования лимфопении при COVID-19.

Помимо этого, нами была отмечена положительная взаимосвязь между уровнем С-реактивного белка и IL-6 в периферической крови. IL-6 является провоспалительным цитокином, его повышенные уровни связывают с развитием тяжелого COVID-19; одной из его функций является индукция С-реактивного белка, и эта тенденция сохраняется вне зависимости от того, каким геновариантом вызван COVID-19. Также нами были отмечены положительные корреляции между концентрациями фибриногена и IL-18, ферритина и IL-6, IL-18. Оба этих белка являются участниками воспаления наравне с цитокинами; в литературе представлены данные о значимости этих маркеров для определения тяжести COVID-19; существуют данные о синергичном действии ферритина и IL-18 против вирусных возбудителей. Интерес представляла отрицательная корреляция между уровнем D-димера в плазме и IFN α ; при этом в литературе все чаще возникают данные о роли последнего в процессах тромбообразования.

Изменчивость SARS-CoV-2 является значимым фактором, влияющим на силу инфекционного воспаления. Ранее нами было показано характерное «сужение» воспалительного профиля в зависимости от геноварианта вируса, причем как для цитокинов, так и хемокинов [25, 26]. Изучение других лабораторных показателей, связанных с процессом воспаления при COVID-19, а также вовлеченных в иммуннопатогенез заболевания, необходимо проводить, учитывая геновариант вируса.

Список литературы/References

1. Абдуллаев Р.Ю., Комиссарова О.Г. Изменения маркеров гематологического, биохимического и коагулологического анализов крови при новой коронавирусной инфекции COVID-19 // *Consilium Medicum*, 2020, Т. 22, № 11. С. 51–55. [Abdullaev R.Yu., Komissarova O.G. Changes in markers of hematological, biochemical and coagulological blood tests with coronavirus COVID-19 infections. *Consilium Medicum*, 2020, vol. 22, no. 11, pp. 51–55. (In Russ.)] doi: 10.26442/20751753.2020.11.200369
2. Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Коробова З.Р., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В., Куликов А.Н., Лиюзнов Д.А., Шарапова М.А., Певцов Д.Э., Тотолян А.А. Цитокины в плазме крови

- больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления // Медицинская иммунология. 2021. Т. 23, № 2. С. 311–326. [Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Lioznov D.A., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Plasma cytokines in patients with COVID-19 during acute phase of the disease and following complete recovery. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, vol. 23, no. 2, pp. 311–326. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2312
3. Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Коробова З.Р., Кузнецова Р.Н., Рубинштейн А.А., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В., Куликов А.Н., Гаврилова Е.Г., Певцов Д.Э., Полушин Ю.С., Шлык И.В., Тотолян А.А. Прогнозная значимость специфических цитокинов в отношении летального исхода COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 859–868. [Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Gavrilova E.G., Pevtsov D.E., Polushin Yu.S., Shlyk I.V., Totolian A.A. Predictive value of specific cytokines for lethal COVID-19 outcome. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 859–868. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-PVO-2043
 4. Коронавирус-монитор — интерактивная карта распространения и статистика COVID-19. [Coronavirus monitor — interactive distribution map and statistics COVID-19] URL: <https://coronavirus-monitor.info> (12.03.2024)
 5. Петриков С.С., Боровкова Н.В., Попугаев К.А., Сторожева М.В., Квасников А.М., Годков М.А. Аутоантитела к интерферону альфа и их значение при COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 279–287. [Petrikov S.S., Borovkova N.V., Popugaev K.A., Storozheva M.V., Kvasnikov A.M., Godkov M.A. Anti-interferon alpha autoantibodies and their significance in COVID-19. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 279–287. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-AAA-1789
 6. Полушин Ю.С., Шлык И.В., Гаврилова Е.Г., Паршин Е.В., Гинзбург А.М. Роль ферритина в оценке тяжести COVID-19 // Вестник анестезиологии и реаниматологии. 2021. Т. 18, № 4. С. 20–28. [Polushin Yu.S., Shlyk I.V., Gavrilova E.G., Parshin E.V., Ginzburg A.M. The role of ferritin in assessing COVID-19 severity. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii = Messenger of Anesthesiology and Resuscitation*, 2021, vol. 18, no. 4, pp. 20–28. (In Russ.) doi: 10.21292/2078-5658-2021-18-4-20-28
 7. Сабиров И.С., Муркамилов И.Т., Фомин В.В., Сабирова А.И. Прогностическое значение D-димера в развитии тромбозных осложнений при новой коронавирусной инфекции (Covid-19) // The Scientific Heritage. 2021. № 60. С. 38–46. [Sabirov I.S., Murkamilov I.T., Fomin V.V., Sabirova A.I. Prognostic value of D-dimer in the development of thromboembolic complications in new coronavirus infection (Covid-19). *The Scientific Heritage*, 2021, no. 60, pp. 38–46. (In Russ.)]
 8. Смирнов В.С., Тотолян А.А. Врожденный иммунитет при коронавирусной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 259–268. [Smirnov V.S., Totolian A.A. Innate immunity in coronavirus infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 259–268. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-111-1440
 9. Acharya D., Liu G., Gack M.U. Dysregulation of type I interferon responses in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, vol. 20, no. 7, pp. 397–398. doi: 10.1038/s41577-020-0346-x
 10. Akbari H., Tabrizi R., Lankarani K.B., Aria H., Vakili S., Asadian F., Noroozi S., Keshavarz P., Faramarz S. The role of cytokine profile and lymphocyte subsets in the severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. *Life. Sci.*, 2020, no. 258: 118167. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118167
 11. Ansar W., Ghosh S. C-reactive protein and the biology of disease. *Immunol. Res.*, 2013, vol. 56, no. 1, pp. 131–142. doi: 10.1007/s12026-013-8384-0
 12. Bakin E.A., Stanevich O.V., Chmelevsky M.P., Belash V.A., Belash A.A., Savateeva G.A., Bokinova V.A., Arsentieva N.A., Sayenko L.F., Korobkov E.A., Lioznov D.A., Totolian A.A., Polushin Y.S., Kulikov A.N. A Novel Approach for COVID-19 Patient Condition Tracking: From Instant Prediction to Regular Monitoring. *Front. Med. (Lausanne)*, 2021, no. 8: 744652. doi: 10.3389/fmed.2021.744652
 13. Bartee E., McFadden G. Cytokine synergy: an underappreciated contributor to innate anti-viral immunity. *Cytokine*, 2013, vol. 63, no. 3, pp. 237–40. doi: 10.1016/j.cyto.2013.04.036
 14. Bermudez E.A., Rifai N., Buring J., Manson J.E., Ridker P.M. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002, vol. 22, no. 10, pp. 1668–1673. doi: 10.1161/01.atv.0000029781.31325.66
 15. Davalos D., Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin. Immunopathol.*, 2012, vol. 34, no. 1, pp. 43–62. doi: 10.1007/s00281-011-0290-8
 16. Del Giudice M., Gangestad S.W. Rethinking IL-6 and CRP: why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. *Brain. Behav. Immun.*, 2018, vol. 70, pp. 61–75. doi: 10.1016/j.bbi.2018.02.013
 17. Gladkikh A., Dolgova A., Dedkov V., Sbarzaglia V., Kanaeva O., Popova A., Totolian A. Characterization of a Novel SARS-CoV-2 Genetic Variant with Distinct Spike Protein Mutations. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 6: 1029. doi: 10.3390/v13061029
 18. Dong C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2021, vol. 39, pp. 51–76. doi: 10.1146/annurev-immunol-061020-053702
 19. Gómez-Pastora J., Weigand M., Kim J., Wu X., Strayer J., Palmer A.F., Zborowski M., Yazer M., Chalmers J.J. Hyperferritinemia in critically ill COVID-19 patients — is ferritin the product of inflammation or a pathogenic mediator? *Clin. Chim. Acta*, 2020, vol. 509, pp. 249–251. doi: 10.1016/j.cca.2020.06.033
 20. Gupta P., Gupta V., Singh C.M., Singhal L. Emergence of COVID-19 Variants: An Update. *Cureus*, 2023, vol. 15, no. 7: e41295. doi: 10.7759/cureus.41295
 21. Huang I., Pranata R. Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis. *J. Intensive. Care*, 2020, no. 8: 36. doi: 10.1186/s40560-020-00453-4
 22. Jensen T., Kierulf P., Sandset P.M., Kligenberg O., Joø G.B., Godal H.C., Skjønberg O.H. Fibrinogen and fibrin induce synthesis of proinflammatory cytokines from isolated peripheral blood mononuclear cells. *Thromb. Haemost.*, 2007, vol. 97, no. 5, pp. 822–829. doi: 10.1160/th07-01-0039
 23. Jiang N., Li Z., Yang B., Jin M., Sun Y., He Y., Liu Y., Wang Y., Si D., Ma P., Zhang J., Liu T., Yu Q. Peripheral Inflammatory Cytokines and Lymphocyte Subset Features of Deceased COVID-19 Patients. *Biomed. Res. Int.*, 2021, no. 2021: 9101082. doi: 10.1155/2021/9101082

24. Kangro K., Wolberg A.S., Flick M.J. Fibrinogen, Fibrin, and Fibrin Degradation Products in COVID-19. *Curr. Drug. Targets*, 2022, vol. 23, no. 17, pp. 1593–1602. doi: 10.2174/1389450123666220826162900
25. Kernan K.F., Carcillo J.A. Hyperferritinemia and inflammation. *Int. Immunol.*, 2017, vol. 29, no. 9, pp. 401–409. doi: 10.1093/intimm/dxx031
26. Korobova Z.R., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Dedkov V.G., Gladkikh A.S., Sharova A.A., Chernykh E.I., Kashchenko V.A., Ratnikov V.A., Gorelov V.P., Stanevich O.V., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Totolian A.A. A Comparative Study of the Plasma Chemokine Profile in COVID-19 Patients Infected with Different SARS-CoV-2 Variants. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 16: 9058. doi: 10.3390/ijms23169058
27. Korobova Z.R., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Dedkov V.G., Gladkikh A.S., Sharova A.A., Adish Z., Chernykh E.I., Kaschenko V.A., Ratnikov V.A., Gorelov V.P., Stanevich O.V., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Cytokine Profiling in Different SARS-CoV-2 Genetic Variants. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 22: 14146. doi: 10.3390/ijms232214146
28. Korobova Z.R., Arsentieva N.A., Totolian A.A. Macrophage-Derived Chemokine MDC/CCL22: An Ambiguous Finding in COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, no. 17: 13083. doi: 10.3390/ijms241713083
29. Letelier P., Encina N., Morales P., Riffo A., Silva H., Riquelme I., Guzmán N. Role of biochemical markers in the monitoring of COVID-19 patients. *J. Med. Biochem.*, 2021, vol. 40, no. 2, pp. 115–128. doi: 10.5937/jomb0-29341
30. Locati M., Otero K., Schioppa T., Signorelli P., Perrier P., Baviera S., Sozzani S., Mantovani A. The chemokine system: tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses. *Allergy*, 2002, vol. 57, no. 11, pp. 972–982. doi: 10.1034/j.1398-9995.2002.02166.x
31. Picod A., Morisson L., de Roquetaillade C., Sadoune M., Mebazaa A., Gayat E., Davison B.A., Cotter G., Chousterman B.G. Systemic Inflammation Evaluated by Interleukin-6 or C-Reactive Protein in Critically Ill Patients: Results From the FROG-ICU Study. *Front. Immunol.*, 2022, no. 13: 868348. doi: 10.3389/fimmu.2022.868348
32. Ryan T.A.J., O'Neill L.A.J. An Emerging Role for Type I Interferons as Critical Regulators of Blood Coagulation. *Cells*, 2023, vol. 12, no. 5: 778. doi: 10.3390/cells12050778
33. Samprathi M., Jayashree M. Biomarkers in COVID-19: An Up-To-Date Review. *Front. Pediatr.*, 2021, no. 8: 607647. doi: 10.3389/fped.2020.607647
34. Slaats J., Ten Oever J., van de Veerdonk F.L., Netea M.G. IL-1 β /IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct Inflammatory Programs in Infections. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 12: e1005973. doi: 10.1371/journal.ppat.1005973
35. Zeng G., Chen D., Zhou R., Zhao X., Ye C., Tao H., Sheng W., Wu Y. Combination of C-reactive protein, procalcitonin, IL-6, IL-8, and IL-10 for early diagnosis of hyperinflammatory state and organ dysfunction in pediatric sepsis. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2022, vol. 36, no. 7: e24505. doi: 10.1002/jcla.24505

Авторы:

Коробова З.Р., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; старший лаборант кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика Павлова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Любимова Н.Е., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Арсентьева Н.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Жебелева М.С., студент 4-го курса лечебного факультета ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Черных Е.И., д.м.н., врач-терапевт приемного отделения ФГБУ Северо-Западный окружной научно-клинический центр им. Л.Г. Соколова ФМБА, Санкт-Петербург, Россия;
Давлетшина В.В., младший научный сотрудник ФГБУ Северо-Западный окружной научно-клинический центр им. Л.Г. Соколова ФМБА, Санкт-Петербург, Россия;
Кащенко В.А., д.м.н., профессор, зам. генерального директора по научно-образовательной работе ФГБУ Северо-Западный окружной научно-клинический центр им. Л.Г. Соколова ФМБА, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой факультетской хирургии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;
Тотolian А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Korobova Z.R., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Liubimova N.E., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Arsentieva N.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Zhebeleva M.S., 4th year Student, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Chernykh E.I., DSc (Medicine), Admitting Physician, North-Western District Scientific and Clinical Center named after L.G. Sokolov, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation;
Davletshina V.V., Junior Researcher, North-Western District Scientific and Clinical Center named after L.G. Sokolov, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation;
Kashchenko V.A., DSc (Medicine), Professor, Deputy-Director for Scientific and Educational Work, North-Western District Scientific and Clinical Center named after L.G. Sokolov, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Faculty Surgery, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian A.A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

ЦИТОКИНЫ КРОВИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ SARS-CoV-2- АССОЦИИРОВАННОЙ ПНЕВМОНИИ У ПАЦИЕНТОВ С ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ II СТАДИИ

О.А. Радаева¹, А.С. Симбирцев², М.С. Искандярова¹, Е.В. Негоднова¹, В.В. Куляпкин¹,
К.А. Красноглазова¹, В.В. Еремеев¹

¹ ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева,
г. Саранск, Россия

² ФГУП Государственный научноисследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Поиск предикторов тяжелого течения COVID-19 был актуален как в период пандемии, так и в настоящее время. Цель исследования — анализ связи уровней цитокинов у пациентов с эссенциальной гипертензией (ЭАГ) до SARS-CoV-2-инфицирования с частотой развития коронавирусной пневмонии. *Материалы и методы.* Из базы данных 290 пациентов с ЭАГ II стадии, которые находятся под наблюдением в течение 8–12 лет с ежегодным забором крови для определения уровней цитокинов, отобраны лица, перенесшие COVID-19 (легкое течение без пневмонии и среднетяжелое, пневмония КТ 1–2, КТ-3). Проанализированы анамнестические уровни IL-1 β , IL-1 α , IL-1ra, IL-18, IL-18 BP, IL-37, IL-6, sIL-6r, M-CSF, VEGF-A, IL-34 и HMGB1) в сыворотке крови пациентов с ЭАГ II стадии (метод ИФА). Анализ полученных результатов проведен с помощью Stat Soft Statistica 13.5. *Результаты и обсуждение.* Пациенты с ЭАГ и COVID-19 с пневмонией (КТ I-II) после SARS-CoV-2-инфицирования за 2–6 месяцев до инфекционного заболевания имели достоверно более высокие уровни в сыворотке крови: IL-1 α ($p < 0,05$) и снижение IL-37 ($p < 0,001$), у пациентов без гипертензии подобных изменений выявлено не было, но зарегистрировано увеличение в сыворотке крови IL-18 ($p < 0,01$). При проведении многофакторного корреляционного анализа статистически независимая связь между повышением частоты развития вирусной пневмонии у пациентов с ЭАГ II стадии была подтверждена только для IL-37 при уровне в крови менее 60,2 пг/мл (коэффициент регрессии — 2,21, стандартная ошибка — 0,28, t критерий — 6,12, относительный риск — 2,52, критерий Вальда — 7,92, $p = 0,006$). При изучении циркадианных ритмов содержания цитокинов в сыворотке крови у пациентов анализируемых групп с расчетом силы корреляционных связей анамнестических вечерних уровней IL-37 у больных с ЭАГ II стадии в 19.00–20.00 с частотой развития пневмонии на фоне SARS-CoV-2-инфицирования обладает большей специфичностью и чувствительностью (специфичность — 0,75,

Адрес для переписки:

Радаева Ольга Александровна
430032, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,
ул. Ульянова, 26а, ФГБОУ ВО Национальный исследовательский
Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева.
Тел./факс: 8 (8342) 32-19-83. E-mail: radaevamed@mail.ru

Contacts:

Olga A. Radaeva
430032, Russian Federation, Republic of Mordovia, Saransk,
Ulyanov str., 26a, National Research Mordovia State University.
Phone/fax: +7 (8342) 32-19-83. E-mail: radaevamed@mail.ru

Для цитирования:

Радаева О.А., Симбирцев А.С., Искандярова М.С., Негоднова Е.В.,
Куляпкин В.В., Красноглазова К.А., Еремеев В.В. Цитокины крови как
потенциальные предикторы развития SARS-CoV-2-ассоциированной
пневмонии у пациентов с эссенциальной гипертензией II стадии //
Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 437–442. doi: 10.15789/2220-
7619-BCA-16695

Citation:

Radaeva O.A., Simbirtsev A.S., Iskandiarova M.S., Negodnova E.V.,
Kulyapkin V.V., Krasnoglazova K.A., Ereemeev V.V. Blood cytokines as potential
predictors of the development of SARS-CoV-2 associated pneumonia
in patients with stage II essential hypertension // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 437–442.
doi: 10.15789/2220-7619-BCA-16695

Работа поддержана грантом РНФ «Анализ изменения циркадианных ритмов синтеза цитокинов в крови пациентов с эссенциальной артериальной гипертензией как предиктор развития сердечно-сосудистых осложнений», № 23-25-00147.

This work was Supported by the Russian Science Foundation grant "Analysis of changes in circadian rhythms of cytokine synthesis in the blood of patients with essential arterial hypertension as a predictor of cardiovascular complications", No. 23-25-00147.

© Радаева О.А. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-BCA-16695>

чувствительность — 0,82), чем утренних концентраций. Учитывая, что данные о циркадианных ритмах получены на ограниченной по количеству больных группе, необходимо дальнейшее наблюдение, которое проводится нашей научной группой. Необходимо отметить, что пациенты с эссенциальной гипертензией патогенетически неоднородны, в том числе по особенностям цитокинового регулирования. Изучения данного направления позволит персонализировать цитокиновые фенотипы заболевания и разработать новые методы расчета прогноза как сердечно-сосудистых осложнений, так особенностей течения инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: эссенциальная гипертензия, IL-37, IL-1 α , циркадианные ритмы, COVID-19, SARS-CoV-2-ассоциированная пневмония.

BLOOD CYTOKINES AS POTENTIAL PREDICTORS OF THE DEVELOPMENT OF SARS-CoV-2 ASSOCIATED PNEUMONIA IN PATIENTS WITH STAGE II ESSENTIAL HYPERTENSION

Radaeva O.A.^a, Simbirtsev A.S.^b, Iskandiyarova M.S.^a, Negodnova E.V.^a, Kulyapkin V.V.^a, Krasnoglazova K.A.^a, Ereemeev V.V.^a

^a National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

^b State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The search for predictors of the severe course of COVID-19 was relevant both during the pandemic and at the present time. The aim of the study was to analyze the relationship of cytokine levels in patients with EH before SARS-CoV-2 infection with the incidence of coronavirus pneumonia. *Materials and methods.* From the database of 290 patients with stage II EAG who have been under observation for 8–12 years with annual blood sampling to determine cytokine levels, COVID-19 survivors were selected (mild without pneumonia and moderate to severe, pneumonia CT 1–2, CT-3). Anamnestic levels of IL-1 β , IL-1 α , IL-1ra, IL-18, IL-18 BP, IL-37, IL-6, sIL-6r, M-CSF, VEGF-A, IL-34 and HMGB1) in the blood serum of patients with stage II EH were analyzed (method ELISA). The analysis of the obtained results was carried out using Stat Soft Statistica 13.5. *Results and discussion.* Patients with EH and COVID-19 with pneumonia (CT I-II) after SARS-CoV-2 infection 2–6 months before the infectious disease had significantly higher serum levels: IL-1 α ($p < 0.05$) and a decrease in IL-37 ($p < 0.001$). During multivariate correlation analysis, a statistically independent relationship between an increase in the incidence of viral pneumonia in patients with stage II EH was confirmed only for IL-37 with a blood level of less than 60.2 pg/ml (regression coefficient — 2.21, standard error — 0.28, t criterion — 6.12, relative risk — 2.52, criterion Walda — 7.92, $p = 0.006$). When studying circadian rhythms of cytokine content in blood serum in patients of the analyzed groups, calculating the strength of correlations of anamnestic evening IL-37 levels in patients with stage II EP at 19.00–20.00 with the frequency of pneumonia against the background of SARS-CoV-2 infection, it has greater specificity and sensitivity (specificity — 0.75, sensitivity — 0.82) than morning concentrations. Considering that data on circadian rhythms were obtained in a limited number of patients, further monitoring is necessary, which is carried out by our scientific group. It should be noted that patients with essential hypertension are pathogenetically heterogeneous, including in terms of cytokine regulation. The study of this area will make it possible to personalize cytokine phenotypes of the disease and develop new methods for calculating the prognosis of both cardiovascular complications and features of the course of infectious diseases.

Key words: essential hypertension, IL-37, IL-1 α , circadian rhythms, COVID-19, SARS-CoV-2-associated pneumonia.

Введение

Поиск предикторов тяжелого течения COVID-19 был актуален как в период пандемии, так и в настоящее время [1]. Так в 2024 г. опубликованы данные комплексного биоинформационного исследования с результатом научного поиска ключевых биомаркеров для предварительной клинической верификации тяжести течения COVID-19 [5]. По данным PubMed в 2023 г. опубликовано более 1700 статей, посвященных COVID-19 и значению цитокинов в патогенезе данного заболевания, 2024 — 512 статей (запрос от 27.03.2024). Необходимо отметить, что исследователи подчеркивают схожие принципы цитокинового регулирования тяжести течения COVID-19 и гриппа [4], так как в настоящее вре-

мя мы анализируем иммунопатогенез повторных случаев новой коронавирусной инфекции. Результаты, отражающие цитокиновые закономерностей острого периода и реконвалесценции COVID-19, в будущем могут быть проспективно проанализированы уже у лиц с вирусом гриппа (тип А). Выделение именно среди пациентов с ЭАГ лиц высоким риском развития SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонии значимо, так как у данной категории запуск коронавирусом на фоне вовлечения в патологический процесс комплекса легкое-сосудистая сеть и через систему цитокинов повышения экспрессии натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа (SGLT2) определяет более значимые осложнения из-за стратегии старения эндотелия со вторичной адгезией, агрегации тром-

боцитов и выработкой тромбина [7]. С учетом вышеизложенного, целью исследования стал анализ связи уровней цитокинов у пациентов с ЭАГ до SARS-CoV-2-инфицирования с частотой развития коронавирусной пневмонии.

Материалы и методы

С учетом обозначенной цели из базы данных 290 пациентов с ЭАГ II стадии, которые находятся под наблюдением в течение 8–12 лет с ежегодным забором крови для определения уровней цитокинов, отобраны лица, перенесшие COVID-19 (легкое течение без пневмонии и среднетяжелое, пневмония КТ 1–2, КТ-3), забор крови для очередного анализа уровней цитокинов за 2–6 месяцев до COVID-19. На основании этого сформированы две группы: 1 группа — перенесшие COVID-19 без пневмонии и 2 группа — с пневмонией. В группе с пневмонией было проведено деление с учетом степени поражения ткани легкого: 2а–1а — 1 степень по данным компьютерной томографии, 2б — 2 степень, 2в — 3 степень по данным КТ.

Общие критерии внесения клиничко-лабораторных данных больных в научную работу в 1–2 группы (группы пациентов с ЭАГ): 54–60 лет, ЭАГ II стадии, наличие информированного согласия больного, новая коронавирусная инфекция подтверждена на основе актуальных клинических рекомендаций по профилактике, диагностике и лечению COVID-19 с учетом данных ПЦР при наличии РНК SARS-CoV-2 и определении IgM/IgA и Ig G к SARS-CoV-2 в динамике. Для первой группы дополнительно: COVID-19 легкое течение без пневмонии в анамнезе, для второй группы — COVID-19 среднетяжелое течение с пневмонией в анамнезе.

Критерии не включения клиничко-лабораторных данных больных в научную работу в 1–2 группы (группы пациентов с ЭАГ): ассоциированные клинические состояния (инфаркт миокарда, коронарная реваскуляризация, острое/транзиторное нарушения мозгового кровообращения и др.), СД 1/2 типа, аллергические/аутоиммунные заболевания, психические заболевания, отсутствие полного курса вакцинации (Спутник V).

Критерии для группы контроля (пациенты без ЭАГ) — 3–4 группы: мужчины и женщины в возрасте 59–65 лет, новая коронавирусная инфекция (COVID-19) в анамнезе (подтвержденная методом ПЦР и данными серологического исследования), наличие письменного согласия на обследование. Для первой третьей группы дополнительно: COVID-19 легкое течение без пневмонии в анамнезе, для четвертой группы — COVID-19 среднетяжелое течение с пневмонией в анамнезе.

Критерии не включения в группу контроля: ЭАГ, ассоциированные клинические состоя-

ния (инфаркт миокарда, коронарная реваскуляризация, острое/транзиторное нарушения мозгового кровообращения и др.), СД 1/2 типа, аллергические/аутоиммунные заболевания, психические заболевания, отсутствие полного курса вакцинации (Спутник V).

Анализировались данные цитокинов при заборе крови за 2–6 месяцев до COVID-19. Сыворотку хранили при температуре -30°C . Определение IL-1 β , IL-1 α , IL-1ra, IL-18, IL-18 BP, IL-37, IL-6, sIL-6r, M-CSF, VEGF-A, IL-34 и HMGB1 проводили методом ИФА на базе кафедры иммунологии, микробиологии, вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии (лаборатория иммуноферментного анализа — лицензия № 13.01.04.0001.Л.000005.06.11, бессрочная), с использованием иммуноферментного анализатора «Personal Lab™» (Adaltis, Италия). Учитывая включение пациентов из общей базы данных больных, находящихся под наблюдением длительное время, у 6 пациентов 1 группы, 8 пациентов — 2 группы, 4 пациентов — 3 группы, 6 пациентов — 4 группы был проведен анализ циркадианных ритмов содержания цитокинов в сыворотке крови (забор крови в 8:00, 13:00, 20:00, 00:00) в течение 3 суток в тот же временной промежуток, что и для всех пациентов группы наблюдения.

Анализ полученных результатов проведен с помощью Stat Soft Statistica 13.5. Данные представлены в виде медианы (Me) и персентилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Распределение данных отличалось от распределения Гаусса–Лапласа, что обосновало при сравнении зависимых выборок использование критерий Вилкоксона, несвязанных выборок — критерий Манна–Уитни. Использовали построение регрессионной модели Кокса с применением однофакторного и многофакторного анализов для выделения независимого цитокинового критерия, ассоциированного с повышением риска развития пневмонии на фоне SARS-CoV-2-инфицирования. Проведен интраквартильный анализ с расчетом риска развития пневмонии в зависимости от уровня цитокина, рассчитано отношение рисков.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарева (протокол № 12 от 14 декабря 2008 г., протокол № 85 от 27 мая 2020 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие. Получение биологического материала (кровь) произведено с учетом положений Хельсинской декларации ВМА (2013 г.), протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999) и дополнительного протокола к Конвенции по правам человека и биомедицине в области биомедицинских исследований (2005).

Результаты и обсуждение

Пациенты с ЭАГ и COVID-19 с пневмонией (КТ 1–2) после SARS-CoV-2-инфицирования за 2–6 месяцев до инфекционного заболевания имели достоверно более высокие уровни в сыворотке крови: IL-1 α ($p < 0,05$) и снижение IL-37 ($p < 0,001$) (табл. 1), у пациентов без гипертензии подобных изменений выявлено не было (табл. 1), но зарегистрировано увеличение в сыворотке крови IL-18 ($p < 0,01$). При проведении многофакторного корреляционного анализа статистически независимая связь между частотой развития вирусной пневмонии у данной категории пациентов была подтверждена только для IL-37 при уровне менее 60,2 пг/мл (коэффициент регрессии — 2,21, стандартная ошибка — 0,28, t-критерий — 6,12, относительный риск — 2,52, критерий Вальда — 7,92, $p = 0,006$). Данная тенденция продемонстрирована и в рамках интерквартильного анализа (табл. 2). При проведении ROC-анализа: специфичность — 0,65, чувствительность — 0,71, $\chi^2 = 25,4$ ($p < 0,001$), нормированное значение Пирсона = 0,47 (связь относительно сильная). Ранее опубликованы данные о связи раннего роста IL-37 в крови с благоприятными клиническими исходами при коронавирусной болезни 2019 г., а введение IL-37 в эксперименте ослабляло воспаление легких у трансгенных мышей с ангиотензинпревращающим ферментом 2 человека, инфицированных коронавирусом с тяжелым острым респираторным синдромом [3], что может подтверждать выяв-

ленные нашей группой исследователей изменения о негативном влиянии низких уровней данного цитокина, но в представленном исследовании подчеркивается их большая актуальность при артериальной гипертензии, так данные пациенты характеризуются более низкими базовыми концентрациями в крови IL-37.

При анализе предикторных данных с учетом степени поражения легких выявлена аналогичная закономерность с увеличением отличий содержания IL-37 и IL-1 α при повышении площади поражения легкого (рис.). Так пациенты с 3 степенью поражения легких характеризовались более низкими анамнестическими уровнями IL-37 — менее 35 пг/мл, что несколько отличается от данных Li A. [6], который обозначает критичным уровень данного цитокина менее 20 пг/мл, но уже во время острого периода COVID-19 при тяжелом течении инфекционного заболевания. На основе этого может быть выдвинута патогенетическая теория о еще более выраженном падении концентрации IL-37 в крови больных ЭАГ после SARS-CoV-2-инфицирования.

Выявлено, что пациенты с ЭАГ II стадией и перенесшие COVID-19 с пневмонией КТ III, характеризовались идентичным спектром цитокинов с достоверным отличием содержания в крови в «доковидный» период (3–6 месяцев до SARS-CoV-2-инфицирования) IL-1 α ($p < 0,01$) и снижение IL-37 ($p < 0,001$) при сравнении с пациентами с ЭАГ, но с COVID-19 без пневмонии. Полученные данные обосновали интерквартильный анализ содержания в сыворотки

Таблица 1. Сравнительная характеристика уровней цитокинов (пг/мл) в сыворотке крови больных ЭАГ II стадии до перенесенного COVID-19 (Me [Q25%–Q75%]) в зависимости от формирования пневмонии в последующем

Table 1. Comparative characteristics of cytokine levels (pg/ml) in the blood serum of patients with stage II EH before COVID-19 (Me [Q25%–Q75%]) depending on the formation of pneumonia in the future

	Пациенты с ЭАГ II стадии/Patients with stage II EH		Пациенты без ЭАГ/Patients without EH	
	без пневмонии without pneumonia	с пневмонией with pneumonia	без пневмонии without pneumonia	с пневмонией with pneumonia
	1	2	3	4
	N = 119	N = 81	N = 42	N = 68
IL-1 β	18,7 [13,2–22,1]	19,3 [14–21,3]	5,12 [4,83–5,32]	5,38 [4,97–5,44]
IL-1 α	13,2 [10,6–15,5]	16,7* ¹ [12,1–19,7]	3,22 [3,04–3,41]	3,14 [2,97–3,24]
IL-1ra	698 [602–754]	612 [524–690]	697 [584–791]	657 [504–731]
IL-18	301 [243–352]	304 [321–358]	162 [145–197]	234 [177–267] ¹
IL-18 BP	5980 [5311–6720]	5410 [4963–6465]	4880 [3510–5670]	4768 [3640–5721]
IL-37	68,7 [54,7–68,9]	52,7* ¹ [48,1–60,3]	80 [68,7–93,3]	77,1 [63,3–95,7]
IL-6	23,7 [22,2–25,1]	24,1 [25,9–27,8]	3,04 [1,7–3,21]	2,91 [1,79–3,28]
sIL-6r	2435 [2007–2860]	2161 [1812–2208]	671 [445–867]	712 [483–855]
M-CSF	320 [197–371]	361 [364–389]	187 [127–236]	191 [139–230]
VEGF-A	230 [171–369]	260 [201–417]	156 [107–198]	162 [115–203]
IL-34	147 [121–169]	142 [93–177]	95,3 [75,1–112]	101 [66,3–108]
HMGB1	2506 [1780–2930]	2430 [1420–2890]	1200 [980–1930]	1310 [880–1730]

Примечание. * — уровень достоверности $p < 0,001$, ¹ — $p < 0,01$, * — $p < 0,05$ (применяли критерий Манна-Уитни для несвязанных совокупностей).
Note. * — The significance level $p < 0,001$, ¹ — $p < 0,01$, * — $p < 0,05$ (used the Mann–Whitney test for independent samples).

Таблица 2. Содержание в крови больных с ЭАГ IL-37 до перенесенного COVID-19 и частота SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонии в последующие 2–6 месяцев наблюдения

Table 2. Level of IL-37 in the blood of patients with EH before COVID-19 and the frequency of SARS-CoV-2-associated pneumonia in the next 2–6 months of observation

IL-37, пг/мл IL-37, pg/ml	I квантиль I quartile (31,3–54,7)	II квантиль II quartile (54,8–60,1)	III квантиль III quartile (60,2–67,3)	IV квантиль IV quartile (67,4–89,9)
	N = 50	N = 50	N = 50	N = 50
Число пациентов с пневмонией Number of patients with pneumonia	33	25	12	11
Абсолютный риск/Absolute risk	66%	50%	24%	22%
	58%		23%	
Относительный риск/Relative risk	I+II/III+IV квантили 2,52 [1,69–3,74]*			

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении абсолютных рисков, если интервал не включает 1.Note. * — $p < 0.05$ when comparing absolute risks if the interval does not include 1.

крови больных ЭАГ IL-1 α и IL-37 и частоты формирования SARS-CoV-2-ассоциированной пневмонии (табл. 2).

В нашем исследовании получены данные о связи уровня IL-37 с формированием пневмонии у больных с ЭАГ II стадии после SARS-CoV-2, а в ранее опубликованных данных рассматривается IL-37 как фактор повышения риска COVID-19 вне зависимости от поражения легких [2]. Низкие продуценты IL-37 были более склонны к развитию COVID-19 (отношение шансов = 2,66; 95% доверительный интервал = 1,51–4,70; скорректированная вероятность = 0,015) [2]. В нашем исследовании данная тенденция не регистрировалась, а у пациентов без ЭАГ не было выявлено никаких достоверных связей между количественными характеристиками IL-37 и особенностями течения новой коронавирусной инфекции.

При изучении циркадианных ритмов содержания цитокинов в сыворотке крови у пациентов анализируемых групп с расчетом силы корреляционных связей анамнестических вечерних уровней IL-37 у больных с ЭАГ II стадии в 19:00–20:00 с частотой развития пневмонии на фоне SARS-CoV-2-инфицирования обладает большей специфичностью и чувствительностью (специфичность — 0,75, чувствительность — 0,82), чем утренних концентраций. Учитывая, что данные о циркадианных ритмах получены на ограниченной по количеству больных группе, необходимо дальнейшее наблюдение, которое проводится нашей научной группой.

Полученные данные подчеркивают значимость научной и, возможно, в последующем клинико-диагностической ценности изучения количественных характеристик цитокинов только при наличии у пациентов концентраций до наступления заболевания, что позволяет с большей патогенетической значимостью анализировать предикторные связи, а также динамические показатели. IL-37 обладает клинико-диагностической перспективностью

в аспекте предикции вирусной пневмонии включая и патологический процесс на фоне гриппа, а не только COVID-19. В литературе сообщалось, что интерлейкин-37 (IL-37) подавляет чрезмерные иммунные реакции в том числе от дисбаланса макрофаг-зависимого ответа, что принципиально для альвеолярных макрофагов [8].

Полученные данные подтверждают гипотезу о патогенетической значимости IL-37 зависимых цитокиновых звеньев иммунного реагирования при SARS-CoV-2-инфицировании пациентов с ЭАГ II стадии и частоте вовлече-

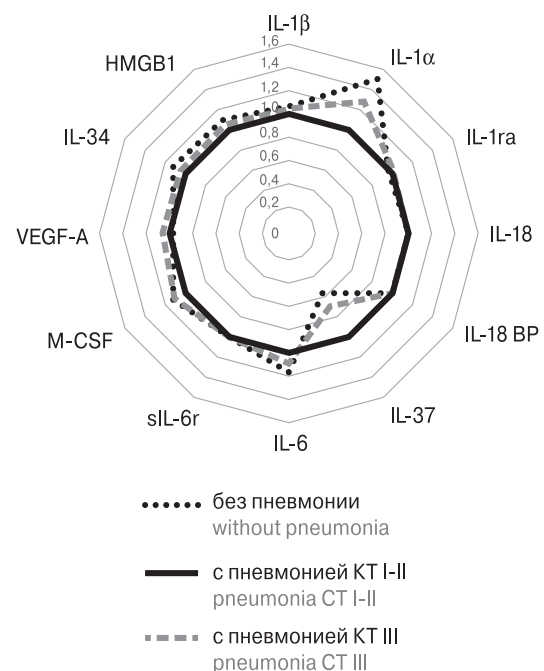
**Рисунок. Анамнестические уровни цитокинов у пациентов с ЭАГ II с учетом степени поражения легкого на фоне COVID-19**

Figure. Anamnestic levels of cytokines in patients with EAH II, taking into account the degree of lung damage due to COVID-19

ния в патологический процесс ткани легкого. Необходимо отметить, что пациенты с ЭАГ патогенетически неоднородны, в том числе по особенностям цитокинового регулирования. Изучения данного направления позволит пер-

сонализировать цитокиновые фенотипы данного заболевания и при апробации цитокиновой терапии основываться на этих характеристиках при отборе пациентов для включения в исследование и повышения его эффективности.

Список литературы/References

1. Радаева О.А., Симбирцев А.С. Цитокины в иммунопатогенезе артериальной гипертензии. М.: Наука, 2021. 350 с. [Radaeva O.A., Simbirtsev A.S. Cytokines in the immunopathogenesis of arterial hypertension. Moscow: Science, 2021, 350 p. (In Russ.)]
2. Ahmed A.A., Ad'hiah A.H. Interleukin-37 is down-regulated in serum of patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Cytokine*, 2021, vol. 148: 155702. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155702
3. Allam G., Gaber A.M., Othman S.I., Abdel-Moneim A. The potential role of interleukin-37 in infectious diseases. *Int. Rev. Immunol.*, 2020, vol. 39, no. 1, pp. 3–10. doi: 10.1080/08830185.2019.1677644
4. Chang D., Dela Cruz C., Sharma L. Beneficial and Detrimental Effects of Cytokines during Influenza and COVID-19. *Viruses*, 2024, vol. 16, no. 2: 308. doi: 10.3390/v16020308
5. Huang Z., Cheng Z., Deng X., Yang Y., Sun N., Hou P., Fan R., Liu S. Integrated Bioinformatics Exploration and Preliminary Clinical Verification for the Identification of Crucial Biomarkers in Severe Cases of COVID-19. *J. Inflamm. Res.*, 2024, vol. 17, pp. 1561–1576. doi: 10.2147/JIR.S454284
6. Li A., Ling Y., Song Z., Cheng X., Ding L., Jiang R., Fu W., Liu Y., Hu H., Yuan S., Chen J., Zhu C., Fan J., Wang J., Jin Y., Zhang M., Zhu L., Sun P., Zhang L., Qin R., Zhang W., Qiu C., Shen Y., Zhang L., Shi Z., Zhao C., Zhu T., Lu H., Zhang X., Xu J. Correlation Between Early Plasma Interleukin 37 Responses With Low Inflammatory Cytokine Levels and Benign Clinical Outcomes in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *J. Infect. Dis.*, 2021, vol. 223, no. 4, pp. 568–580. doi: 10.1093/infdis/jiaa713
7. Mroueh A., Fakhri W., Carmona A., Trimaille A., Matsushita K., Marchandot B., Qureshi A.W., Gong D.S., Auger C., Sattler L., Reydel A., Hess S., Oulehri W., Vollmer O., Lessinger J.M., Meyer N., Pieper M.P., Jesel L., Bäck M., Schini-Kerth V., Morel O. COVID-19 promotes endothelial dysfunction and thrombogenicity: role of proinflammatory cytokines/SGLT2 prooxidant pathway. *J. Thromb. Haemost.*, 2024, vol. 22, no. 1, pp. 286–299. doi: 10.1016/j.jth.2023.09.022
8. Qi F., Liu M., Li F., Lv Q., Wang G., Gong S., Wang S., Xu Y., Bao L., Qin C. Interleukin-37 Ameliorates Influenza Pneumonia by Attenuating Macrophage Cytokine Production in a MAPK-Dependent Manner. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 30, no. 10: 2482. doi: 10.3389/fmicb.2019.02482

Авторы:

Радаева О.А., д.м.н., доцент, зав. кафедрой иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

Симбирцев А.С., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГУП Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА, Санкт-Петербург, Россия;

Искандярова М.С., старший преподаватель кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

Негоднова Е.В., старший преподаватель кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

Куляпкин В.В., соискатель кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

Красноглазова К.А., ассистент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;

Еремеев В.В., аспирант кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия.

Authors:

Radaeva O.A., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Immunology, Microbiology and Virology with a course in Clinical Immunology and Allergology, National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

Simbirtsev A.S., RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head Researcher, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Iskandiyarova M.S., Senior Lecturer, Department of Immunology, Microbiology and Virology with a course in Clinical Immunology and Allergology, National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

Negodnova E.V., Senior Lecturer, Department of Immunology, Microbiology and Virology with a course in Clinical Immunology and Allergology, National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

Kulyapkin V.V., Applicant, Department of Immunology, Microbiology and Virology with a course in Clinical Immunology and Allergology, National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

Krasnoglazova K.A., Assistant Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology with a course in Clinical Immunology and Allergology, National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;

Eremeev V.V., PhD Student, Department of Immunology, Microbiology and Virology with a course in Clinical Immunology and Allergology, National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫМ СЕРДЦЕМ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ИНФЕКЦИИ COVID-19

М.М. Зафранская^{1,2}, Д.Б. Нижегородова^{1,2}, О.Г. Шатова³, И.И. Русских³, А.В. Величко^{1,2}, М.И. Ванслав¹, С.Ф. Новицкая¹, Т.Л. Денисевич³, М.Г. Колядко³, Е.К. Курлянская³

¹ УО Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

² Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

³ ГУ Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Республика Беларусь

Резюме. Пациенты с трансплантированным сердцем вследствие необходимой иммуносупрессии и наличия сопутствующих заболеваний подвергаются повышенному риску неблагоприятного исхода при инфекции COVID-19. До настоящего времени все крупномасштабные рандомизированные контролируемые испытания для различных вакцин против COVID-19 исключали реципиентов трансплантата солидных органов, вследствие чего эффективность и безопасность профилактики коронавирусной инфекции у пациентов с трансплантированным сердцем с применением вакцин от COVID-19 изучена недостаточно. В данном исследовании проведена оценка вирус-специфических иммунологических реакций после вакцинации против коронавирусной инфекции (двукратная вакцинация Vero Cell и бустерная вакцинация Спутник Лайт) у пациентов, перенесших трансплантацию сердца. У вакцинированных лиц, не имевших в анамнезе COVID-19, начиная с 4–6 мес. после 2-й дозы вакцины, наблюдалось увеличение уровня антител к S белку с сохранением статистически значимых различий на протяжении 9–12 мес. после вакцинации (вне зависимости с бустерной вакцинацией или без). Однако, концентрация антител оставалась низкой, а у 37% пациентов не обнаруживались антитела. У вакцинированных лиц после перенесенной ранее COVID-19 инфекции, по сравнению с серонегативными пациентами, поствакцинальный иммунитет сопровождался поддержанием высокого уровня вирус-специфических IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в динамике поствакцинального периода со статистически значимым увеличением данного показателя к 9–12 мес. после проведения бустерной вакцинации. Специфический клеточный ответ (по оценке уровня CD3⁺IFN γ ⁺TNF α ⁺ клеток) к S-белку вируса SARS-CoV-2 оставался низким на протяжении всего периода наблюдения, регистрировался у 5–40% пациентов с трансплантированным сердцем и статистически значимые изменения в количестве spike-реактивных лимфоцитов наблюдались к 4–6 мес. после введения 2-й дозы вакцины у пациентов, имевших в анамнезе COVID-19, что, в совокупности с результатами оценки гуморального ответа, свидетельствует о более выра-

Адрес для переписки:

Зафранская Марина Михайловна
220070, Республика Беларусь, Минск, ул. Долгобродская, 23/1,
НИИ экспериментальной и клинической медицины.
Тел.: +375 29 631-25-48.
E-mail: zafranskaya@gmail.com

Contacts:

Marina M. Zafranskaya
220070, Republic of Belarus, Minsk, Dolgobrodskaya str., 23/1,
Research Institute of Experimental and Clinical Medicine.
Phone: +375 29 631-25-48.
E-mail: zafranskaya@gmail.com

Для цитирования:

Зафранская М.М., Нижегородова Д.Б., Шатова О.Г., Русских И.И., Величко А.В., Ванслав М.И., Новицкая С.Ф., Денисевич Т.Л., Колядко М.Г., Курлянская Е.К. Характеристика вирус-специфических иммунологических реакций у пациентов с трансплантированным сердцем после вакцинации против инфекции COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 443–450. doi: 10.15789/2220-7619-COV-16632

Citation:

Zafranskaya M.M., Nizheharodava D.B., Shatova O.G., Russkih I.I., Velichko A.V., Vanslau M.I., Novitskaya S.F., Denisevich T.L., Kolyadko M.G., Kuryanskaya E.K. Characteristics of virus-specific immunological reactions following COVID-19 vaccination in heart transplant recipients // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 443–450. doi: 10.15789/2220-7619-COV-16632

женном поствакцинальном иммунитете у пациентов с гибридным иммунитетом. При разработке методологии оценки риска и пользы в отношении стратегии вакцинации для отдельных пациентов с трансплантированным сердцем необходимо учитывать клиническую эффективность, постоянный мониторинг редких серьезных нежелательных явлений и данные об иммуногенности вакцин.

Ключевые слова: реципиенты сердечного трансплантата, вакцинация, COVID-19, гуморальный иммунный ответ, клеточный иммунный ответ, гибридный иммунитет, специфические антитела.

CHARACTERISTICS OF VIRUS-SPECIFIC IMMUNOLOGICAL REACTIONS FOLLOWING COVID-19 VACCINATION IN HEART TRANSPLANT RECIPIENTS

Zafranskaya M.M.^{a,b}, Nizheharodava D.B.^{a,b}, Shatova O.G.^c, Russkih I.I.^c, Velichko A.V.^b, Vanslau M.I.^a, Novitskaya S.F.^a, Denisevich T.L.^c, Kolyadko M.G.^c, Kurlyanskaya E.K.^c

^a Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

^b International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

^c National Research and Practical Center "Cardiology", Minsk, Republic of Belarus

Abstract. Heart transplant patients are at an increased risk of COVID-19 infection adverse outcomes because of underlying immunosuppression and concomitant comorbidities. To date, all large-scale randomized controlled trials for various COVID-19 vaccines have excluded solid organ transplant recipients. Therefore, the efficacy and safety of coronavirus infection prevention using COVID-19 vaccines in transplant heart patients has not been sufficiently studied. In this research, the evaluation of virus-specific immunological reactions after vaccination (double Vero Cell vaccination and Sputnik Light booster vaccination) in heart transplant patients has been carried out. In vaccinated heart transplant individuals who did not have a history of COVID-19, starting from 4–6 months after the 2nd dose of the vaccine, an increase in antibodies to S protein level of was observed, while maintaining statistically significant differences for 9–12 months after vaccination (regardless of whether with or without booster vaccination). However, the concentration of antibodies remained low, and 37% of patients detected no antibodies. In vaccinated heart transplant individuals following the previous COVID-19 infection, as compared to seronegative patients, post-vaccination immunity is accompanied by maintaining a high level of virus-specific IgG antibodies to the S protein of the SARS-CoV-2 virus in the dynamics of the post-vaccination period with a statistically significant increase of these antibodies by 9–12 months after booster vaccination. The specific cellular response (according to the assessment of CD3⁺154⁺ and CD3⁺IFN γ ⁺ TNF α ⁺ cells) to the S protein of the SARS-CoV-2 virus remained low throughout the entire follow-up period, was recorded in 5–40% of heart transplant patients and statistically significant changes in the number of spikereactive lymphocytes were observed in patients with a history of COVID-19 by 4–6 months after administration of the 2nd dose of the vaccine. This, together with the results of the assessment of the humoral response, indicates a more pronounced post-vaccination immunity in patients with a hybrid immunity. While developing a methodology for assessing the risk and benefit of a vaccination strategy for individual heart transplant patients, clinical efficacy, ongoing monitoring of rare serious adverse events, and data on vaccine immunogenicity should be taken into account.

Key words: heart transplant recipients, vaccination, COVID-19, humoral immune response, cellular immune response, hybrid immunity, specific antibodies.

Введение

В настоящее время, несмотря на достижения в области фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний, операция ортотопической трансплантации сердца (ОТС) является общепризнанным золотым стандартом лечения терминальной стадии сердечной недостаточности, существенно улучшающим прогноз и качество жизни [9]. Наличие трансплантированного сердца в сочетании с иммуносупрессивной терапией и присоединением острой респираторной вирусной инфекции обуславливает сложность ведения пациента.

Пандемия коронавирусной болезни 2019 г. (COVID-19) создала серьезные глобальные проблемы для реципиентов трансплантата солидных органов (SOTR — solid organ transplant recipient). Показатели смертности от COVID-19

в этой популяции пациентов остаются высокими, несмотря на новые доступные варианты лечения и вакцинацию против коронавируса 2-го типа с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV-2). Оценка поствакцинального иммунитета у первично серонегативных лиц и переболевших инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, свидетельствуют о том, что предшествовавшая вакцинации инфекция COVID-19 способствует перестройке иммунной системы и обеспечивает возможность формирования вторичного иммунного ответа на последующую вакцинацию против SARS-CoV-2 — «гибридный иммунитет» [1, 2].

Показано, что у реципиентов трансплантата солидных/паренхиматозных органов (SOTR — solid organ transplant recipients) наблюдается менее устойчивый ответ антител и, в меньшей степени, клеточный ответ на вакцины. При этом

уреципиентов трансплантата сердца (НТ — heart transplant) после вакцинации против COVID-19 регистрируется более низкий уровень сероконверсии. В целом, после 2 доз мРНК вакцин антитела против рецептор-связывающего домена белка spike вируса SARS-CoV-2 обнаруживались у 10–57% пациентов и у 10–70% реципиентов НТ регистрируется реакция клеточного ответа [4, 12]. Повышенная интенсивность иммуносупрессии, использование антиметаболитов и агентов, которые ингибируют В-клеточный ответ, связаны со снижением иммуногенности вакцин [6, 8]. Несмотря на неоптимальные показатели сероконверсии, вакцинация связана со снижением риска смерти от COVID-19 [10], а также снижением риска симптоматического заболевания на 80% по сравнению с непривитыми SOTR [3].

Эффективность и безопасность профилактики коронавирусной инфекции у пациентов с трансплантированным сердцем с применением вакцин от COVID-19 изучена недостаточно. Клиническая эффективность, постоянный мониторинг редких серьезных нежелательных явлений и данные об иммуногенности вакцин необходимо учитывать при разработке методологии оценки риска и пользы в отношении стратегии вакцинации для отдельных пациентов с трансплантированным сердцем. В связи с вышеизложенным, в работе представлена характеристика вирусспецифических иммунологических реакций у пациентов с трансплантированным сердцем по оценке в динамике поствакцинального периода уровня специфических IgG-антител к S-белку коронавируса SARS-CoV-2 и количества spike-реактивных Т-клеток.

Материалы и методы

Основную группу составили пациенты ($n = 35$), которым проведена ортотопическая трансплантация сердца в период с 2009 по 2021 гг. на базе Республиканского научно-практического центра «Кардиология», Минск, Республика Беларусь. Средний возраст пациентов (м:ж — 34:1) на момент начала вакцинации составил 62,0 (56,0–66,0) года. Из них: 15 пациентов (возраст 63,5 (53,2–68,8)), которые не имели в анамнезе коронавирусную инфекцию (I группа) и 20 человек (возраст 62,0 (57,0–64,5)), переболевших инфекцией COVID-19 (3–6 мес. до начала вакцинации) или с бессимптомным течением болезни (II группа). Все пациенты находились на иммуносупрессивной терапии согласно протоколу МЗ РБ ОТС.

Забор периферической венозной крови для исследований проводился по следующей схеме:

– 1 — перед введением 1-й дозы вакцины (Vero Cell, инактивированная, CoronaVac®);

– 2 — перед введением 2-й дозы вакцины (Vero Cell, инактивированная, CoronaVac®), 21–28 день после первой вакцинации;

– 3 — перед бустерной вакцинацией (4–6 мес. после первичной вакцинации, Спутник Лайт);

– 4.1 — 9–12 мес. после первичной вакцинации (без проведения бустерной вакцинации, Vero Cell);

– 4.2 — 9–12 мес. после бустерной вакцинации (полный курс вакцинации, Vero Cell и Спутник Лайт).

Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК). МПК выделяли путем наслаивания разведенной в физиологическом растворе периферической крови на градиент плотности Roti-Sep, с последующим центрифугированием в течение 30 мин при 1500 об/мин при 4°C. Далее осадок 2-кратно отмывали в физиологическом растворе (10 мин при 1500 об/мин при 4°C). Концентрацию подсчитывали с использованием гематологического анализатора Micros-60 (ABX, Франция).

Метод криоконсервации МПК. Свежевыделенные МПК разводили в среде для криоконсервации, приготовленной на основе RPMI-1640 (Gibco, Германия) с добавлением 20% DMSO (Fluka, Германия) и 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, Германия), в концентрации 1×10^7 клеток/мл и криоконсервировали в программируемом криозамораживателе, после чего образцы МПК перемещали в криохранилище на -180°C .

Культуральный метод. Для определения SARS-CoV-2-реактивных Т-клеток по оценке экспрессии внутриклеточных и внеклеточных активационных маркеров и цитокинов использовался набор SARS-CoV-2 T Cell Analysis Kit (PBMC), anti-human, REAfinity (Miltenyi Biotec, Германия). В качестве *in vitro* стимулятора использовался PepTivator SARS-CoV-2 Prot_S — research grade (пул лиофилизированных пептидов, охватывающих иммунодоминантные домены последовательности поверхностного (или шиповидного) гликопротеина («S») SARS-CoV-2 (GenBank MN908947.3, белок QHD43416.1) в концентрации 0,6-nmol peptide/mL (Miltenyi Biotec, Германия).

МПК в концентрации 1×10^6 клеток в 100 мкл культивировали в присутствии PepTivator SARS-CoV-2 Prot_S, включая положительный и отрицательные контроли, в течение 4-х часов в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C до последующего окрашивания моноклональными антителами.

Метод проточной цитофлуориметрии. Для определения антиген-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов использовались моноклональные антитела (MAT) в соответствии с набором SARS-CoV-2 T Cell Analysis Kit (PBMC), anti-

human, REAfinity (Miltenyi Biotec, Германия): CD3-APC, CD4-Vio Bright B515, CD8-Vio Green, IFN γ -PE, TNF α -PE-Vio 770, CD154-APC-Vio 770. Регистрацию результатов осуществлялась на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США). Анализ полученных результатов проводился в соответствии с разработанным алгоритмом проведения иммунологических исследований на основе внутриклеточной экспрессии цитокинов и поверхностных активационных маркеров по следующим иммунофенотипам Т-лимфоцитов: CD3⁺154⁺, CD3⁺IFN γ ⁺TNF α ⁺, CD3⁺154⁺IFN γ ⁺, CD3⁺154⁺TNF α ⁺, CD4⁺IFN γ ⁺TNF α ⁺, CD4⁺154⁺IFN γ ⁺, CD8⁺IFN γ ⁺, CD8⁺IFN γ ⁺TNF α ⁺.

Для фенотипирования Т клеток-памяти использовались МАТ: CD27⁺PC5, CD45RO⁺ECD и CCR7⁺PE (Beckman Coulter, США).

Хемилюминесцентный анализ. Определение специфических IgG-антител к S-белку коронавируса проводилось хемилюминесцентным методом на микрочастицах на иммунохимическом анализаторе Architect (Abbott, США) с использованием диагностического набора SARS-CoV-2 IgGII Quant Reagent Kit. Значения < 10 BAU/мл считались отрицательными (Ат отсутствуют или их уровень ниже предела детекции), значения > 10 BAU/мл считались положительными.

Метод статистической обработки данных. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 8.0. Статистически значимые различия определяли при уровне $p < 0,05$. Для характеристики исследуемых групп использовались показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Сравнение групп и определение статистической значимости различий осуществлялась непараметрическим W-критерием Вилкоксона для зависимых

и U-критерием Манна–Уитни для независимых переменных.

Результаты и обсуждение

Динамика уровня специфических IgG-антител к S-белку коронавируса SARS-CoV-2 у пациентов с трансплантированным сердцем

Для определения уровня гуморального поствакцинального иммунитета у пациентов с трансплантированным сердцем проводилась оценка динамики уровня специфических IgG-антител к S-белку (включая рецептор-связывающий домен — receptor domen binding, RDB) коронавируса SARS-CoV-2.

Количество пациентов с бессимптомным течением болезни (отсутствие в анамнезе перенесенной инфекция COVID-19) до вакцинации составило 45,5%, что подтверждалось наличием антител к S-белку до вакцинации, в среднем, 464,6 BAU/ml. Вследствие чего обследуемые пациенты были разделены на 2 группы: I группу составили пациенты, которые до начала вакцинации не болели коронавирусной инфекцией и не определялись специфические IgG-антител к S-белку; II группу составили пациенты, переболевшие коронавирусной инфекцией за 3–6 мес. до начала вакцинации или не болевшие коронавирусной инфекцией, но имевшие положительные значения специфических IgG-антител к S-белку (бессимптомное течение болезни).

Динамика уровня IgG к S белку в исследуемых группах вакцинированных лиц представлена в табл. 1.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что у вакцинированных лиц 1-й исследуемой группы, начиная с 4–6 мес. после 2-й дозы вакцины, наблюдалось увеличение уровня антител к S белку с сохранением статистически

Таблица 1. Динамика уровня IgG к S белку в исследуемых группах вакцинированных пациентов с трансплантированным сердцем, BAU/mL, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$) ‰

Table 1. Dynamics of IgG to S Protein Levels In Heart Transplant Patients After Vaccination, BAU/mL, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$) ‰

Группы Groups	Период наблюдения/Monitoring period					p (W)
	1	2	3	4.1	4.2	
	до вакцинации before vaccination	21–28 день после 1-й дозы вакцины 21–28 days after 1st dose of vaccine	4–6 мес. после 2-й дозы вакцины/бустер 4–6 months after 2nd dose of vaccine/ booster	9–12 мес. после 2-й дозы вакцины/ без бустера 9–12 months after 2nd dose of vaccine/ without booster	9–12 мес. после бустерной вакцинации 9–12 months after booster vaccination	
	1	2	3	4	5	
I 1st (n = 15)	0,0 (0,0–0,07)	0,24 (0,0–0,65)	16,3 (0,60–173,3)	82,0 (18,8–401,4)	61,0 (19,1–275,8)	$p_{1-3} = 0,008$ $p_{1-4} = 0,012$ $p_{1-5} = 0,018$
II 2nd (n = 20)	478,8 (129,0–719,3)	540,3 (217,5–1561,2)	493,6 (318,7–873,7)	1006,6 (72,8–2206,3)	1098,0 (500,9–1894,2)	$p_{1-5} = 0,028$

значимых различий на протяжении 9–12 мес. после вакцинации (вне зависимости с бустерной вакцинацией или без). Однако, концентрация антител оставалась достаточно низкой, что согласуется с данными Ran Zhuo и соавт., 2022, которые сравнивали количественно спайковых антител к SARS-CoV-2 с использованием международных стандартных единиц ВОЗ и показали, что естественная инфекция SARS-CoV-2 вызывала больший ответ антител по сравнению с вакцинами, о чем свидетельствует значительно более высокий титр нейтрализующих антител у непривитых лиц, которые подверглись сероконверсии [13]. При этом 37% пациентов I группы не отвечали на вакцинацию, что подтверждалось отсутствием выработки вирус-специфических антител на протяжении всего периода наблюдения.

У пациентов, имевших в анамнезе коронавирусную инфекцию (II группа), до вакцинации определялся высокий уровень вирус-специфических антител по сравнению с лицами, не имевшими в анамнезе COVID-19 (478,8 (129,0–719,3) и 0,0 (0,0–0,07), $p = 0,000...$ соответственно). При последующей вакцинации 1-й и 2-й дозами вакцины Vero Cell уровень специфических антител оставался стабильным в течение 6 мес. ($p = 0,98$). В отдаленном периоде установлена тенденция к увеличению уровня IgG к S-белку через 9–12 мес. после введения 2-й дозы вакцины Vero Cell со статистически значимым увеличением уровня вирус-специфических антител к 9–12 мес. после проведения бустерной вакцинации Спутник Лайт (табл. 1). При этом количество пациентов, не отвечающих на вакцинацию (первоначальный уровень антител снижался на протяжении периода наблюдения), составило 15%, что значительно ниже по сравнению с I группой исследуемых пациентов ($p = 0,02$). Ряд авторов отмечает низкий серологический ответ на вакцину против инфекции COVID-19 у пациентов с трансплантацией солидных органов: значительная часть реципиентов не достигает достаточного серологического ответа после завершения не только двух серий вакцинации, но и третьей бустерной дозы (третья доза вакцины улучшает данный показатель только до 66%) [11]. По данным Сизякиной с соавт., 2022, коронавирусная инфекция при легком и среднетяжелом вариантах клинического течения приводит к изменениям параметров функционирования иммунной системы, регистрируемых через год после инфицирования. Максимальный спектр изменений затрагивает В-звено адаптивного иммунитета. Авторами показано, что перестройка иммунного реагирования после COVID-19 обеспечивает высокую иммуногенность даже одной дозы вакцины на основе пептидных антигенов SARS-CoV-2 —

«ЭпиВакКорона» [2]. Процесс формирования вторичного ответа сопровождается снижением числа циркулирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов, взаимодействующих с антиген-представляющими клетками при увеличении количества CD40⁺ В-лимфоцитов, ответственных за Т-В-кооперацию, и уменьшении доли циркулирующих непереключенных В-клеток памяти.

При мониторинге иммунологических показателей у пациентов с трансплантированным сердцем, переболевших коронавирусной инфекцией до вакцинации, установлено статистически значимое перераспределение субпопуляций Т-клеток памяти, характеризующееся увеличением центральных Т-клеток памяти (TCM, фенотип CD27⁺45RO⁺CCR7⁺) наряду со снижением «наивных» («naive», фенотип CD27⁺45RO⁻CCR7⁻) и терминально-дифференцированных клеток (TEMRA, фенотип CD27⁻45RO⁻CCR7⁻), $p = 0,01$ и $p = 0,017$ соответственно. Субпопуляции Т-клеток коррелировали с концентрацией антител к SARS-CoV-2-IgG II ($R = 0,9$, $p = 0,007$ «naive» и $R = -0,87$, $p = 0,024$ эффекторные TEM клетки-памяти соответственно). Выявленные изменения не наблюдались в группе пациентов, не имевших в анамнезе коронавирусную инфекцию.

Полученные нами результаты согласуются с данными ряда авторов [2, 7, 13], свидетельствующие о том, что гибридный иммунитет у вакцинированных лиц после перенесенной ранее COVID-19 инфекции характеризуется более выраженным регуляторным и функциональным потенциалом и сопровождается поддержанием высокого уровня вирус-специфических IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в динамике поствакцинального периода со статистически значимым увеличением данного показателя к 9–12 мес. после проведения бустерной вакцинации.

Оценка *in vitro* количество SARS-CoV-2 реактивных Т клеток у пациентов с трансплантированным сердцем в динамике после проведения вакцинации

Ожидалось, что специфические для коронавируса Т-клетки будут присутствовать только у определенных людей. Их частота может быть низкой по сравнению с Т-клетками с другой специфичностью. Уровень напряженности поствакцинального вирус-специфического иммунитета у пациентов основной группы оценивался при стимуляции *in vitro* антиген-специфических Т-клеток спайковым белком, что, в свою очередь, вызывает секрецию эффекторных цитокинов и повышенную регуляцию маркеров активации, которые затем позволяют обнаруживать и выделять антиген-специфические Т-клетки.

Таблиц 2. Количество spike-реактивных Т-лимфоцитов у пациентов с трансплантированным сердцем в динамике после проведения вакцинации, %, Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}) ‰

Table 2. Dynamics of spike-reactive T lymphocytes in heart transplant patients after vaccination, %, Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}) ‰

Период наблюдения Monitoring period	Группы Groups	Фенотип Т-лимфоцитов/T lymphocytes phenotype			
		CD3 ⁺ 154 ⁺	CD3 ⁺ IFNγ ⁺ TNFα ⁺	CD3 ⁺ 154 ⁺ IFNγ ⁺	CD3 ⁺ 154 ⁺ TNFα ⁺
1 до вакцинации before vaccination	I 1st	0,50 (0,22–1,20)	0,12 (0,07–0,30)	0,03 (0,02–0,05)	0,03 (0,01–0,10)
	II 2nd	0,87 (0,55–1,38)	0,18 (0,04–0,44)	0,05 (0,00–0,16)	0,03 (0,00–0,09)
2 21–28 день после 1-й дозы вакцины 21–28 days after 1st dose of vaccine	I 1st	1,00 (0,68–1,32)	0,08 (0,05–0,18)	0,04 (0,03–0,08)	0,03 (0,01–0,03)
	II 2nd	0,83 (0,33–1,07)	0,24 (0,07–0,31)	0,02 (0,01–0,07)	0,01 (0,00–0,04)
3 4–6 мес. после 2-й дозы вакцины/бустер 4–6 months after 2nd dose of vaccine/booster	I 1st	0,53 (0,48–1,16)	0,03 (0,03–0,04)	0,03 (0,00–0,08)	0,02 (0,00–0,08)
	II 2nd	1,81 (0,82–6,06)	0,36 (0,09–0,70)	0,05 (0,02–0,65)	0,04 (0,00–0,66)
4.1 9–12 мес. после 2-й дозы вакцины/без бустера 9–12 months after 2nd dose of vaccine/without booster	I 1st	0,89 (0,11–2,07)	0,29 (0,02–0,53)	0,02 (0,02–0,15)	0,02 (0,01–0,24)
	II 2nd	1,19 (0,69–3,76)	0,12 (0,06–0,26)	0,10 (0,03–0,25)	0,05 (0,02–0,10)
4.2 9–12 мес. после бустерной вакцинации 9–12 months after booster vaccination	I 1st	1,15 (0,29–1,45)	0,04 (0,03–0,05)	0,05 (0,02–0,07)	0,02 (0,01–0,04)
	II 2nd	0,64 (0,27–0,90)	0,11 (0,09–0,56)	0,05 (0,03–0,55)	0,04 (0,02–0,52)
p (U)		3 — 0,05	3 — 0,004 5 — 0,05		

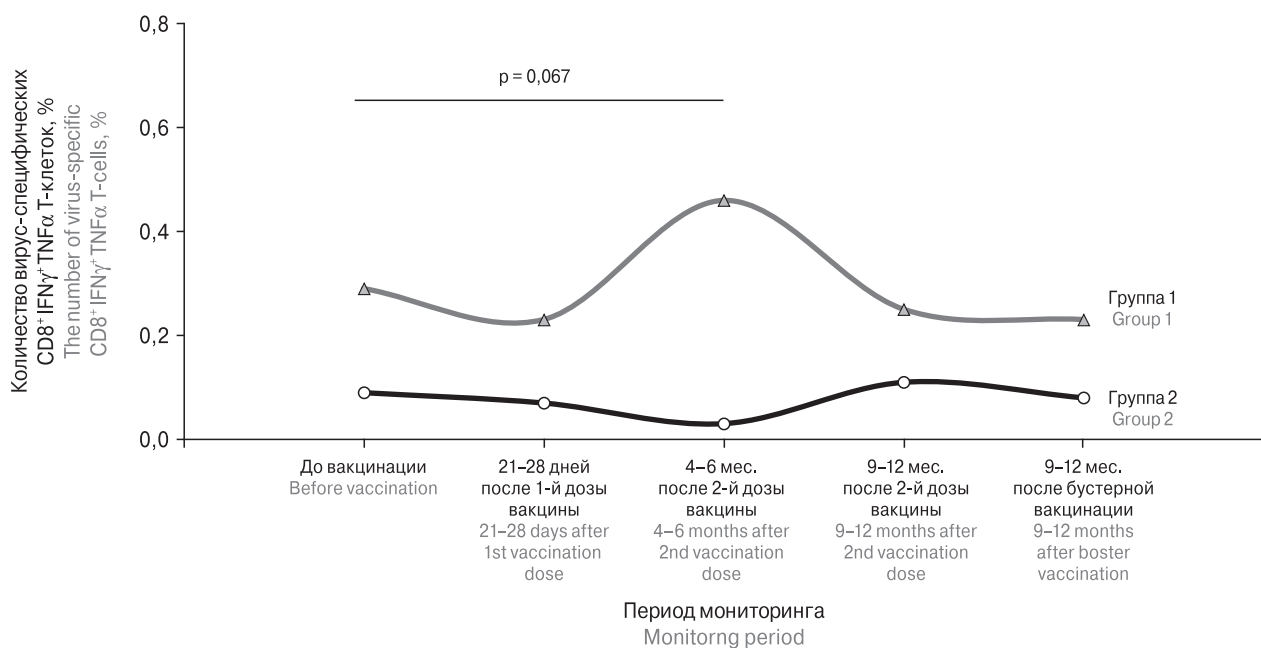


Рисунок. Количество spike-реактивных CD8⁺IFNγ⁺TNFα⁺ Т-лимфоцитов у пациентов с трансплантированным сердцем в динамике поствакцинального периода

Figure. Number of spike-reactive CD8⁺IFNγ⁺TNFα⁺ T lymphocytes in heart transplant patients in the dynamics of the postvaccination period

В табл. 2 представлено количество вирус-специфических Т-лимфоцитов, реагирующих *in vitro* с SARS-CoV-2 Prot_S пептидом.

Как видно из приведенных данных, количество антиген-специфических spike-реактивных Т-лимфоцитов регистрируется в незначительных количествах и отличается у лиц, не болевших до вакцинации коронавирусной инфекцией, по сравнению с пациентами, имевшими в анамнезе COVID-19. У пациентов II группы отмечается статистически значимое увеличение количества CD3⁺154⁺ клеток через 4–6 мес. после 2-й дозы вакцины (перед бустерной вакцинацией) в сочетании с увеличением количества Т-лимфоцитов с внутриклеточной продукцией IFN γ и TNF α (p (W) = 0,048) с последующим снижением данных показателей в течение года.

Аналогичный анализ количества вирус-специфических Т-лимфоцитов проведен и в отношении основных субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих CD4⁺ и CD8⁺ корцепторы (рис.).

Наблюдались различия в динамике количества spike-реактивных CD8⁺IFN γ ⁺TNF α ⁺ Т-лимфоцитов также через 4–6 мес. после 2-й дозы вакцины, что характеризуется тенденцией к увеличению уровня данного показателя у пациентов, имеющих в анамнезе коронавирусную инфекцию (p = 0,067). По данным Braun J. и соавт., spike-реактивные Т-клетки выявляются у 83% пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию [5]. По нашим предварительным результатам spike-реактивные Т-клетки выявлялись у 5–40% пациентов с трансплантированным сердцем в различные периоды наблюдения после вакцинации, преимущественно у пациентов, имевших в анамнезе COVID-19 до начала вакцинации.

Заключение

У вакцинированных лиц с трансплантированным сердцем гуморальный поствакцинальный иммунитет формируется у 63% пациентов, не имевших в анамнезе перенесенную ранее COVID-19 инфекцию и у 85% пациентов, имевших в анамнезе COVID-19 инфекцию. При этом гуморальный ответ у пациентов, которые подверглись сероконверсии до вакцинации, сопровождается поддержанием высокого уровня вирус-специфических IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в динамике поствакцинального периода со статистически значимым увеличением данного показателя к 9–12 мес. после проведения бустерной вакцинации. Специфический клеточный ответ (по оценке уровня CD3⁺154⁺ и CD3⁺IFN γ ⁺TNF α ⁺ клеток) к S-белку вируса SARS-CoV-2 оставался низким на протяжении всего периода наблюдения, регистрировался у 5–40% пациентов с трансплантированным сердцем и статистически значимые изменения в количестве spike-реактивных лимфоцитов наблюдались у пациентов, имевших в анамнезе COVID-19, к 4–6 мес. после введения 2-й дозы вакцины. При этом у данной группы реципиентов сердечного трансплантата, по сравнению с серонегативными пациентами до начала вакцинации регистрировался вирус-специфический ответ, характеризующийся дополнительно не только увеличением количества spike-реактивных CD3⁺154⁺ и CD3⁺IFN γ ⁺TNF α ⁺ клеток, но также и увеличением вирус-специфических CD8⁺IFN γ ⁺TNF α ⁺, что, в совокупности с результатами оценки гуморального ответа, свидетельствует о более выраженном регуляторном и функциональном потенциале поствакцинального иммунитета у пациентов с гибридным иммунитетом.

Список литературы/References

1. Бельская И.В., Амвросьева Т.В., Богуш З.Ф., Поклонская Н.В., Анисько Л.А., Рогачева Т.А. Гуморальный иммунитет к SARS-CoV-2 в условиях доминирования разных вариантов вируса // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2023. Т. 12, № 4. С. 523–535. [Belskaya I.V., Amvroseva T.V., Bogush Z.F., Poklonskaya N.V., Anisko L.A., Rogacheva T.A. Humoral Immunity against Different SARS-CoV-2 Variants. *Laboratornaya Diagnostika. Vostochnaya Evropa = Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*, 2023, vol. 12, no. 4, pp. 523–535. (In Russ.)] doi: 10.34883/PI.2023.12.4.004
2. Сизякина Л.П., Андреева И.И., Харитонов М.В. Механизмы формирования гибридного иммунитета у лиц, переболевших COVID-19 и вакцинированных пептидными антигенами SARS-CoV-2 // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 629–640. [Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Kharitonova M.V. Mechanisms of hybrid immunity formation in people who recovered from COVID-19 and were vaccinated with SARS-CoV-2 peptide antigens. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, vol. 24, no. 3, pp. 629–640. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MOF-2490
3. Aslam S., Adler E., Mekeel K., Little S.J. Clinical effectiveness of COVID-19 vaccination in solid organ transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.*, 2021, vol. 23: e13705. doi: 10.1111/tid.13705.
4. Boyarsky B.J., Werbel W.A., Avery R.K., Tobian A.A.R., Massie A.B., Segev D.L., Garonzik-Wang J.M. Antibody Response to 2-Dose SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Series in Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA*, 2021, vol. 325, no. 21, pp. 2204–2206. doi: 10.1001/jama.2021.7489
5. Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B., Fauchere F., Baysal E., Mangold M., Henze L., Lauster R., Mall M.A., Beyer K., Röhm J., Voigt S., Schmitz J., Miltenyi S., Demuth I., Müller M.A., Hocke A., Witzernath M., Suttrop N., Kern F., Reimer U., Wenschuh H., Drosten C., Corman V.M., Giesecke-Thiel C., Sander L.E., Thiel A. SARS-CoV-2 reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*, 2020, vol. 20, no. 6, pp. 270–274. doi: 10.1038/s41586-020-2598-9

6. Herrera Esposito D., de los Campos G. Age specific rate of severe and critical SARS-CoV-2 infections estimated with multi country seroprevalence studies. *BMC Infect. Dis.*, 2022, vol. 22, no. 311, pp. 1–14.
7. Hsieh L.E., Song J., Grifoni A., Shimizu C., Tremoulet A.H., Dummer K.B., Burns J.C., Sette A., Franco A. T cells in multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) have a predominant CD4+ T Helper response to SARS-CoV-2 peptides and numerous virus-specific CD4-CD8 Double-Negative T cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 13, pp. 1–15. doi: 10.3390/ijms23137219
8. Marion O., Del Bello A., Abravanel F., Couat C., Faguer S., Esposito L., Hebral A.L., Izopet J., Kamar N. Safety and Immunogenicity of Anti-SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccines in Recipients of Solid Organ Transplants. *Ann. Intern. Med.*, 2021, vol. 174, no. 9, pp. 1336–1338. doi: 10.7326/M21-1341
9. McDonagh T.A., Metra M., Adamo M., Gardner R.S., Baumbach A., Böhm M., Burri H., Butler J., Čelutkienė J., Chioncel O., Cleland J.G.F., Coats A.J.S., Crespo-Leiro M.G., Farmakis D., Gilard M., Heymans S., Hoes A.W., Jaarsma T., Jankowska E.A., Lainscak M., Lam C.S.P., Lyon A.R., McMurray J.J.V., Mebazaa A., Mindham R., Muneretto C., Francesco Piepoli M., Price S., Rosano G.M.C., Ruschitzka F., Kathrine Skibelund A.; ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J.*, 2021, vol. 42, no. 36, pp. 3599–3726. doi: 10.1093/eurheartj/ehab368
10. Ravanan R., Mumford L., Ushiro-Lumb I. Two Doses of SARS-CoV-2 Vaccines Reduce Risk of Death Due to COVID-19 in Solid Organ Transplant Recipients: Preliminary Outcomes From a UK Registry Linkage Analysis. *Transplantation*, 2021, vol. 105, no. 11, pp. 263–264.
11. Sakuraba A., Luna A., Micic D. A Systematic Review and Meta-Analysis of Serologic Response following Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Vaccination in Solid Organ Transplant Recipients. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 8, pp. 1–23.
12. Schramm R., Costard-Jäckle A., Rivinius R., Fischer B., Müller B., Boeken U., Haneya A., Provaznik Z., Knabbe C., Gummert J. Poor humoral and T-cell response to two-dose SARS-CoV-2 messenger RNA vaccine BNT162b2 in cardiothoracic transplant recipients. *Clin. Res. Cardiol.*, 2021, vol. 110, no. 8, pp. 1142–1149. doi: 10.1007/s00392-021-01880-5
13. Zhuo R., Charlton C., Plitt S., Thompson L.A., Braun S., Day J., Osiowy C., Tipples G., Kanji J.N. Comparison of SARS-CoV-2 spike antibody quantitative titer reporting using the World Health Organization International Standard Units by four commercial assays. *J. Clin. Virol.*, 2022, vol. 156, 105292. doi: 10.1016/j.jcv.2022.105292

Авторы:

Зафранская М.М., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник НИИ экспериментальной и клинической медицины УО «Белорусский государственный медицинский университет»; зав. кафедрой иммунологии Международного государственного экологического института имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь;

Нижегородова Д.Б., к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник НИИ экспериментальной и клинической медицины УО «Белорусский государственный медицинский университет»; доцент кафедры иммунологии Международного государственного экологического института имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь;

Шатова О.Г., к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории хронической сердечной недостаточности ГУ Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Республика Беларусь;

Русских И.И., врач клинической лабораторной диагностики ГУ Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Республика Беларусь;

Величко А.В., младший научный сотрудник НИИ экспериментальной и клинической медицины УО «Белорусский государственный медицинский университет»; преподаватель кафедры иммунологии Международного государственного экологического института имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь;

Ванслав М.И., научный сотрудник НИИ экспериментальной и клинической медицины УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;

Новицкая С.Ф., старший преподаватель Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;

Денисевич Т.Л., научный сотрудник лаборатории сердечной хронической недостаточности ГУ Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Республика Беларусь;

Колядко М.Г., к.м.н., доцент, зав. клиничко-диагностической лабораторией ГУ Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Республика Беларусь;

Курлянская Е.К., д.м.н., профессор, заместитель директора по терапевтической помощи ГУ Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Республика Беларусь.

Authors:

Zafranskaya M.M., DSc (Medicine), Professor, Chief Researcher, Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University; Head, Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus;

Nizheharodava D.B., PhD (Biology), Leading Researcher, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University; Associate Professor, Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus;

Shatova O.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Researcher, Chronic Heart Failure Laboratory, National Research and Practical Center “Cardiology”, Minsk, Republic of Belarus;

Ruskih I.I., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, National Research and Practical Center “Cardiology”, Minsk, Republic of Belarus;

Velichko A.V., Junior Researcher, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University; Assistant Professor, Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus;

Vanslau M.I., Researcher, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

Novitskaya S.F., Assistant Professor, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

Denisevich T.L., Researcher, National Research and Practical Center “Cardiology”, Minsk, Republic of Belarus;

Kolyadko M.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Clinical Diagnostic Laboratory, National Research and Practical Center “Cardiology”, Minsk, Republic of Belarus;

Kurlyanskaya E.K., DSc (Medicine), Professor, Deputy Director for Therapeutic Care, National Research and Practical Center “Cardiology”, Minsk, Republic of Belarus.

АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ УРОВНЯ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ SARS-CoV-2 И РЕЗУЛЬТАТЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ У НЕВАКЦИНИРОВАННЫХ И ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЛЮДЕЙ, ПЕРЕБОЛЕВШИХ COVID-19

М.С. Бляхер, И.М. Федорова, С.И. Котелева, И.В. Капустин, Е.А. Тульская,
З.К. Рамазанова, Е.Е. Одинцов, С.В. Сандалова, Л.И. Новикова, С.С. Бочкарева

ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора, Москва, Россия

Резюме. Проведено сравнение активности антиген (АГ)-специфических Т-клеток у двух групп пациентов: с ПЦР-подтвержденным диагнозом «COVID-19» в 2021 г. в период циркуляции штамма дельта вируса SARS-CoV-2 (49 человек), и в 2022 г. (26 человек, штамм омикрон). 26 человек после COVID-19, вызванного SARS-CoV-2 (омикрон), являлись частью группы из 41 добровольца, которые в течение 2021–2023 гг. обследовались многократно: в ходе вакцинации, после нее, перед ревакцинацией и впоследствии после заболевания (всего 6–8 раз). Благодаря этому было возможно сравнение показателей специфического гуморального и клеточного иммунитета у одних и тех же пациентов за 1–2 месяца до прорывной инфекции и после нее. Выявление АГ-специфических Т-клеток и оценка их активности по АГ-стимулированной продукции IFN γ , было проведено собственным разработанным ранее методом (Патент RU № 2780369 С1). Для стимуляции Т-эффекторов памяти *in vitro* были применены те же антигены, которые использовались для определения концентрации антител против SARS-CoV-2 методом ИФА. Всего проанализировано около 300 образцов крови здоровых людей и пациентов после COVID-19. Каждый образец протестирован на 3 вариантах антигенов SARS-CoV-2 и в 2 режимах стимуляции. Предложен алгоритм качественной оценки для активности АГ-специфических Т-клеток, который может быть использован для мониторинга состояния клеточного иммунитета в популяции, в которой продолжается циркуляция вируса SARS-CoV-2, и создания представлений о том, какой уровень Т-клеточной активации достаточен для предупреждения или снижения тяжести инфекции SARS-CoV-2. У непривитых лиц, перенесших COVID-19 (SARS-CoV-2, дельта), отсутствовали АГ-специфические Т-клетки к RBD SARS-CoV-2, но специфичность Т-клеток к полноразмерному S-гликопротеину на одном и том же уровне, качественно оцененном как низкий, у 52% группы сохранялась до полугода. У привитых, ранее

Адрес для переписки:

Федорова Ирина Михайловна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (903) 107-60-67. Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: vestnik-07@mail.ru

Contacts:

Irina M. Fedorova
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology
and Microbiology.
Phone: +7 (903) 107-60-67. Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: vestnik-07@mail.ru

Для цитирования:

Бляхер М.С., Федорова И.М., Котелева С.И., Капустин И.В.,
Тульская Е.А., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В.,
Новикова Л.И., Бочкарева С.С. Алгоритм оценки уровня Т-клеточного
иммунного ответа против SARS-CoV-2 и результаты его применения
у невакцинированных и вакцинированных людей, переболевших
COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 451–458.
doi: 10.15789/2220-7619-AFA-16736

Citation:

Blyakher M.S., Fedorova I.M., Koteleva S.I., Kapustin I.V., Tulskeya E.A.,
Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I.,
Bochkareva S.S. Algorithm for assessing the level of T cell immune response
against SARS-CoV-2 and the results of its application in unvaccinated and
vaccinated people who have been infected with COVID-19 // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3,
pp. 451–458. doi: 10.15789/2220-7619-AFA-16736

не болевших COVID-19, такая длительность сохранения АГ-специфических Т-клеток в циркулирующей крови достигается только после ревакцинации. Гибридный иммунитет, прослеженный нами как результат вакцинации после COVID-19 (штамм дельта) или как прорывная инфекция (SARS-CoV-2, омикрон), характеризуются наиболее высокими показателями активности Т-клеток памяти (у 43–46% группы — нормальная активность АГ-специфических клеток, у 30–43% — высокая) ко всем использованным антигенам и наибольшей длительностью сохранения показателей на этом уровне. Дальнейшее исследование уровня противовирусного иммунитета после COVID-19 может быть важным для прогнозирования исходов новых волн инфекции SARS-CoV-2.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, Т-клетки памяти, IFN γ , алгоритм оценки.

ALGORITHM FOR ASSESSING THE LEVEL OF T CELL IMMUNE RESPONSE AGAINST SARS-CoV-2 AND THE RESULTS OF ITS APPLICATION IN UNVACCINATED AND VACCINATED PEOPLE WHO HAVE BEEN INFECTED WITH COVID-19

Blyakher M.S., Fedorova I.M., Koteleva S.I., Kapustin I.V., Tulskaia E.A., Ramazanov Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I., Bochkareva S.S.

G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Antigen (AG)-specific T cell activity was compared in two groups of patients: those who underwent COVID-19 in 2021 during the circulation of the SARS-CoV-2 delta virus strain (43 individuals); and those who underwent COVID-19 in 2022 (Omicron strain, 23 individuals). The diagnosis was confirmed by PCR analysis of nasopharyngeal and oropharyngeal swabs. The 23 individuals following COVID-19 caused by SARS-CoV-2 (omicron) were part of a cohort of 41 volunteers who were examined multiple times during 2021–2023: during vaccination, after vaccination, before revaccination, and subsequently after illness (6–8 times in total). Due to this, it was possible to compare the indices of specific humoral and cellular immunity in the same patients 1–2 months before and after breakthrough infection. Detection of AG-specific T cells and assessment of their activity by AG-stimulated IFN γ production was carried out by our own previously developed method (Patent RU № 2780369 C1). For stimulation of memory T effectors *in vitro*, the same antigens were used to determine the concentration of antibodies against SARS-CoV-2 by ELISA method. A total of about 300 blood samples from healthy subjects and patients after COVID-19 were analyzed. Each sample was tested against 3 SARS-CoV-2 antigens and in 2 stimulation modes. A qualitative assessment algorithm for AG-specific T cell activity has been proposed that can be used to monitor the state of cellular immunity in a population in which SARS-CoV-2 virus continues to circulate and to create insights into what level of T cell activation is sufficient to prevent or reduce the severity of SARS-CoV-2 infection. Unvaccinated COVID-19 (SARS-CoV-2, Delta) survivors lacked AG-specific T cells to RBD SARS-CoV-2, but T cell specificity to full-length S glycoprotein at the same level, qualitatively assessed as low in 52% of the group, persisted for up to six months. In previously unvaccinated COVID-19 vaccinees, this duration of persistence of AG-specific T cells in circulating blood was achieved only after revaccination. Hybrid immunity, which we traced as a result of vaccination after COVID-19 (Delta strain) or as a breakthrough infection (SARS-CoV-2, Omicron), is characterized by the highest indices of memory T cell activity (43–46% of the group — normal activity of AG-specific cells, 30–43% — high activity) to all used antigens and the longest duration of preservation of indices at this level. Further investigation of the level of antiviral immunity after COVID-19 may be important for predicting the outcome of new waves of SARS-CoV-2 infection.

Key words: SARS-CoV-2, T-cell memory, IFN γ , algorithm for assessing.

Введение

В течение 2022–2024 гг. в научной литературе появилось немало оригинальных статей и обзоров с анализом того, способны ли антитела и Т-клетки, выработанные после вакцинации или заболевания, вызванного уханьским, альфа-, бета- или дельта-штаммом SARS-CoV-2, осуществлять защиту против штамма омикрон и более поздних штаммов. Показано, что после COVID-19 (омикрон), повышается активность Т-клеток памяти как к эпитопам омикрон-штамма так и к эпитопам вакцинного штамма [7]. SARS-CoV-2 spike-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, индуцированные пред-

шествующей инфекцией или вакцинацией BNT162b2, обеспечивают обширный иммунный охват против B.1.1.529 (омикрон) [9]. По уровню антиген-стимулированной продукции IFN γ , IL-2 и TNF α показано, что кросс-реактивные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки с одинаковой силой реагируют на штаммы бета, дельта и омикрон [11].

Теперь является уже общепринятым, что гибридный иммунитет, формирующийся после инфекции SARS-CoV-2 и последующей вакцинации или же вакцинации и последующей прорывной инфекции, создает наиболее устойчивый иммунитет против вариантов SARS-CoV-2, демонстрируя при этом широкий ответ на множество белков SARS-CoV-2 [6, 7, 10]. Обзор 26

исследований [8] показал, что гибридный иммунитет генерирует наиболее эффективную и надежную защиту от повторного заражения, госпитализации или тяжелого заболевания, которая сохраняется более чем у 95% пациентов в течение 11 месяцев наблюдения.

При этом для трактовки уровня иммунологических параметров важной становится его оценка как высокого, низкого или нормального. В России начиная с 2022 г., практически все население приобрело поствакцинальный или постинфекционный иммунитет против SARS-CoV-2. Заболевание, вызванное штаммом SARS-CoV-2 омикрон «завершило» этот процесс, сформировав у большей части взрослого населения гибридный иммунитет. Тем не менее приходится учитывать, что уровень иммунного ответа внутри популяции варьирует.

Одной из задач настоящей работы была оценка специфического иммунитета против SARS-CoV-2 в группе пациентов с прорывной инфекцией. Особенностью группы было то, что у ее участников в 2021 г. было прослежено формирование и сохранение Т-клеточного и гуморального иммунитета в ходе вакцинации и ревакцинации вакциной «Спутник V». База данных по показателям этих людей, а также пациентов, переболевших COVID-19 до начала вакцинации на территории России, легла в основу выработки алгоритма для оценки интенсивности специфического иммунного ответа. Алгоритм был использован для сравнения параметров иммунного ответа после заболевания COVID-19 (штамм дельта), при формировании гибридного иммунитета у таких пациентов, и при прорывной инфекции SARS-CoV-2 (штамм омикрон) у ранее не болевших вакцинированных и ревакцинированных людей.

Материалы и методы

Всего обследовано 75 человек обоего пола в возрасте 18–70 лет, перенесших заболевание легкой или средней степени тяжести формы (диагностика и лечение проведены в поликлиниках и клиниках г. Москвы). В том числе 49 пациентов перенесли в 2021 г., COVID-19 в период циркуляции в Московском региона штамма дельта SARS-CoV-2, а другие 26 — в 2022 г. COVID-19 в период доминирования штамма омикрон.

В 2021 г. пациенты обследовались однократно через 1–1,5 месяца после COVID-19 (штамм дельта). 14 человек из них через 6–10 месяцев были привиты вакциной «Спутник V» с последующей оценкой гибридного иммунитета. Пациенты 2022 г. были обследованы многократно. Эти люди по протоколу исследования, одобренному Этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (протоколы

№ 41 от 10.12.20 г. и № 64 от 22.12.21 г.), относились к группе из 41 добровольца, которые принимали обязательство обследоваться до вакцинации, не реже одного раза в 3 месяца в период вакцинации против SARS-CoV-2 и ревакцинации против данной инфекции. К моменту заболевания участники этой группы были обследованы не менее 6 раз. После перенесенного в 2022 г. COVID-19 пациенты были обследованы через 2–4 недели после выздоровления, затем через 3, 6 и 12 месяцев. В случае ОРВИ или иного острого заболевания очередной срок обследования пропускался, и участник исследования должен был предъявить сведения о том, было ли ОРВИ связано с SARS-CoV-2 этиологией.

Антитела (АТ) к SARS-CoV-2 класса IgG и класса IgM определяли в сыворотке крови с помощью тест-систем «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия, № ПЗН 2020/10388 от 18.05.2020 г.) и «SARS-CoV-2-IgM ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия, № ПЗН 2020/10389 от 18.05.2020 г.) соответственно.

Оценка специфического клеточного иммунного ответа на антигены коронавируса (SARS-CoV-2) была проведена скрининговым методом, ранее разработанным нами [1, 3]. Он основан на измерении продукции IFN γ в культуре мононуклеаров из крови пациентов, стимулированной различными антигенами SARS-CoV-2. Мононуклеары выделяли из цельной венозной крови в градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma, США), разводили до концентрации 5×10^6 /мл в полной среде RPMI-1640 (ООО «ПанЭко», Россия) с антибиотиками и 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Biosera, Франция). Доля лимфоцитов среди выделенных мононуклеаров составляла 85–92%.

Стимуляцию лимфоцитов (72 часа при 37°C в атмосфере 5% CO $_2$) проводили в 96-луночных планшетах с вариантами антигенов SARS-CoV-2, сорбированными в лунках планшетов:

- Антиген 1 (АГ1) — цельновиральный инактивированный антиген SARS-CoV-2 (ИФА-набор для выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 пр-ва ФБУН ГИЦ «Вектор», № ПЗН 2020/10017 от 10.04.2020);
- Антиген 2 (АГ2) — рекомбинантный полно-размерный поверхностный тримеризованный гликопротеин S SARS-CoV-2 (ИФА-набор для выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ», № ПЗН 2020/10388 от 18.05.2020);
- Антиген 3 (АГ3) — рекомбинантный рецептор-связывающий домен поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2 (ИФА-набор для выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи», № ПЗН 2020/10393 от 18.05.2020).

В качестве контрольного антигена использовали полистироловые планшеты для выявления IgG-антител к вирусу денге (Vircell S.L., Испания, REF-G1018), с сорбированным вирусом денге (тип 1 — штамм Гавайи, тип 2 — Новая Гвинея, тип 3 — штамм H87 и тип 4 — штамм H241). Спонтанную продукцию IFN γ оценивали в пробах, инкубированных без антигена.

Концентрацию IFN γ в супернатантах определяли методом ИФА с помощью тест-системы (АО «Вектор-Бест», Россия). Результаты учитывали как разницу между АГ-стимулированной и спонтанной продукцией IFN γ и представляли в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Статистический анализ данных проведен с использованием пакета программ STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США). Применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Справедливость проверяемой гипотезы исследования оценивали по величине p-value, критическим значением которой считали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Данные о состоянии специфического Т-клеточного иммунитета у пациентов после COVID-19, вызванного SARS-CoV-2 (штамм дельта), подробно описаны ранее [2], а в настоящей работе использованы в ходе разработки алгоритма. Коротко следует отметить, что через 1–1,5 месяца после COVID-19 (SARS-CoV-2, штамм дельта) *in vitro* стимуляция мононуклеаров крови антигенами вируса (АГ1 или АГ2) вызывала увеличение среди CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток процента активированных (CD69⁺) лимфоцитов и увеличение концентрации IFN γ в культуральном супернатанте. Стимуляция контрольным антигеном таких изменений в культуре мононуклеаров крови не вызывала. В присут-

ствии АГ3 стимуляция Т-клеток не происходила. К моменту вакцинации (через 6–10 месяцев) у переболевших людей активность АГ1 или АГ2-специфических Т-клеток практически не снижалась, а после введения вакцины «Спутник V» увеличивалась.

В отличие от этого у лиц, перенесших COVID-19 в 2021 г., показатели как гуморального, так и клеточного специфического иммунитета через полгода после вакцинации «Спутник V» значительно снизились. Перед ревакцинацией у половины группы (52,1%) отсутствовали в крови Т-клетки, специфичные в отношении АГ3, Т-клетки, распознающие АГ2, отсутствовали у 30,7%, а АГ1 — у 34,6%.

После ревакцинации Т-клетки, активирующиеся в присутствии АГ3, обнаруживались у 82,3%, а отвечающие на стимуляцию АГ1 или АГ2 — у 100% обследуемых. Активность Т-клеток в плане АГ-стимулированной продукции увеличилась в 1,4–3,5 раза. Через 6 месяцев после ревакцинации достигнутые показатели практически не снижались.

Заражение SARS-CoV-2 (штамм омикрон) произошло у пациентов через различные сроки после ревакцинации: от 2 недель до 16 месяцев (Me = 5,5; 4,0–8,0) на фоне высокой активности АГ-специфических Т-клеток и при средней концентрации IgG-антител к АГ2 (полноразмерному spike-белку SARS-CoV-2) 492,0 (167,8–500) BAU/мл. Концентрация IgG-антител менее 150 BAU/мл (порога, выше которого 100% сывороток обладают ярко выраженной вируснейтрализующей активностью) регистрировалась не более чем у 25% группы.

Некоторые из людей в этой группе были ревакцинированы за 3–4 недели до заболевания, и активность Т-клеток памяти в их крови была высока. Поэтому в ранние сроки после выздо-

Таблица 1. Реакция Т-клеток памяти на стимуляцию антигенами вируса SARS-CoV-2 перед заболеванием, связанным со штаммом омикрон, и после него (Me [Q₁–Q₃])

Table 1. Response of memory T cells to stimulation with antigens of the SARS-CoV-2 virus before and after the disease associated with the omicron strain (Me [Q₁–Q₃])

Срок до и после перенесенного заболевания Timing before and after disease		Продукция IFN γ (пг/мл), стимулированная антигенами SARS-CoV-2 IFN γ production (pg/ml) stimulated by SARS-CoV-2 antigens		
		АГ1 AG1	АГ2 AG2	АГ3 AG3
За 1–3 месяца перед заболеванием 1–3 months before disease		301,9 78,5–1237,2	404,8 79,1–1226,1	41,9 14,4–184,1
После выздоровления After reconvalescence	через 2–4 нед. in 2–4 weeks	541,8 138,0–779,2	609,3 93,0–859,2	59,9 24,4–646,1
	через 6 мес. in 6 months	1189,6* 679,0–1775,6	1270,5* 225,8–1874,2	146 43,8–357,5
	через 12 мес. in 12 months	1135,1* 395,1–1795,0	679,0 349,2–1245,1	83,8 35,1–154,3

Примечание. * — значимое отличие от величины параметра до заболевания ($p < 0,05$).

Note. * — significant difference from the parameter value before the disease ($p < 0.05$).

Таблица 2. Вариабельность антиген-стимулированной продукции IFN γ Т-клетками памяти, специфичными к антигенам вируса SARS-CoV-2Table 2. Variability of antigen-stimulated IFN γ production by memory T cells specific to antigens of the SARS-CoV-2 virus

Антиген вируса SARS-CoV-2 Virus antigen SARS-CoV-2	Статистический параметр антиген-стимулированной продукции IFN γ (пг/мл) Statistical parameter of antigen-stimulated IFN γ production (pg/ml)			Нормальный диапазон реакции Normal response range
	Me	Q ₁	Q ₃	
АГ1: цельновирионный инактивированный AG1: whole virion inactivated	343,6	106,5	932,2	100–900
АГ2: рекомбинантный гликопротеин S AG2: recombinant glycoprotein S	404,8	103,5	1031,7	100–1000
АГ3: рекомбинантный RBD-домен гликопротеина S AG3: recombinant RBD domain of glycoprotein S	114,3	52,9	320,7	60–300
Для всех вариантов метода For all method options				70–900

ровления нет значимого отличия средней активности Т-клеток от величин, зарегистрированных до заболевания (табл. 1). Однако через 6 месяцев активность значимо выше и остается высокой до 12 месяцев, по крайней мере, при АГ1-стимуляции.

Повышение активности Т-клеток, специфичных в отношении АГ1 и АГ2, после прорыв-

ной инфекции гораздо более значительно и более длительно сохраняется, чем после ревакцинации. Если после ревакцинации наблюдается 1,5–3,5-кратное увеличение активности специфических Т-клеток, то после прорывной инфекции происходит дополнительное 2–3-кратное увеличение, сохраняющееся 6 месяцев, а у 30–50% пациентов до 12 месяцев.

Таблица 3. Частота встречаемости Т-клеток памяти с разной степенью активации на 72-часовую стимуляцию АГ2 при формировании противовирусного иммунитета к SARS-CoV-2

Table 3. Frequency of occurrence of memory T cells with varying degrees of activation upon 72-hour stimulation with AG-2 during the formation of antiviral immunity to SARS-CoV-2

Вариант состояния The status variants	Стадия формирования противовирусного иммунитета The stage of antiviral immunity formation	Степень антигенной активации Т-клеток Degree of T-cells antigenic activations		
		низкая low	нормальная normal	высокая high
1	После COVID-19 в 2021 г. у непривитых людей (n = 43) Unvaccinated people after COVID-19 in 2021 (n = 43)	52,0%±12,5	28,0%±10,1	20,0%±8,0
2	После вакцинации здоровых людей в 2020–2021 гг. (n = 41) Healthy people vaccinating in 2020–2021 (n = 41)	30,6%±6,1	50,0%±7,8	19,4%±6,7
3	После вакцинации переболевших в 2020–2021 гг. (n = 14) After vaccination of those who did have COVID-19 2020–2021 before (n = 14)	26,1%±4,3*	43,5%±5,5	30,4%±4,7
4	После ревакцинации лиц, не болевших COVID-19 (n = 37) After revaccination of persons who did not have COVID-19 (n = 37)	13,5%±1,9***	67,6%±3,6	18,9%±6,1
5	После COVID-19 (штамм омикрон) прорывная инфекция (n = 63) After breakthrough infection via COVID-19 (omicron strain) (n = 63)	11,1%±1,2	46,0%±3,1**	42,9%±3,1**

Примечание. Серая заливка ячейки — частота встречаемости признака ~ 50%. * — значимое различие между вариантом 1 и вариантом 3 ($p < 0,05$); ** — значимое различие между вариантом 4 и вариантом 5 ($p < 0,05$); *** — значимое различие между вариантом 2 и вариантом 4 ($p < 0,05$).

Note. Cells filled in gray — frequency of occurrence of the trait ~ 50%. * — significant difference between option 1 and option 3 ($p < 0.05$); ** — significant difference between option 4 and option 5 ($p < 0.05$); *** — significant difference between option 2 and option 4 ($p < 0.05$).

Гибридный иммунитет, сформировавшийся после прорывной инфекции SARS-CoV-2 (омикрон), характеризовался большей активностью Т-клеток памяти, чем гибридный иммунитет после вакцинации пациентов, перенесших COVID-19 (SARS-CoV-2, штамм дельта). АГ1-стимуляция мононуклеаров крови через 2–4 недели после выздоровления или вакцинации, соответственно, выражалась продукцией IFN γ на уровне 541,8 и 266,5 пг/мл ($p < 0,05$). В присутствии АГ2 происходила стимуляция продукции IFN γ 609,3 и 381,6 пг/мл соответственно ($p < 0,05$), и только АГ3-стимуляция Т-лимфоцитов была в обеих группах одинаковой: 59,9 и 52,0 пг/мл.

Алгоритм качественной оценки специфического Т-клеточного иммунитета против антигенов вируса SARS-CoV-2 был необходим для понимания биологического значения наблюдаемых изменений в Т-клеточных ответах в ходе вакцинации, ревакцинации, формирования гибридного иммунитета и после прорывной инфекции. Он включал разработку шкалы с разделением величины антигенной активации на низкую, нормальную и высокую. В качестве нормального уровня активации Т-клеток памяти был определен диапазон концентраций IFN γ , продуцируемого при АГ-специфической стимуляции Т-клеток у 50% переболевших COVID-19 или вакцинированных людей, то есть диапазон от $Q_{0,25}$ до $Q_{0,75}$.

Для расчета указанного диапазона использовано 249 образцов мононуклеаров. Не использовались для расчета образцы крови здоровых людей до вакцинации, и тех из них, у которых до введения 2-го компонента вакцины «Спутник V» не проявлялась специфическая Т-клеточная реакция ни при одном из режимов антигенной стимуляции. В табл. 2 приведены статистические показатели по каждому из антигенов, использованных для 72-часовой стимуляции лимфоцитов *in vitro*.

Для удобства практического использования граничные значения концентраций установлены кратными 10. Далее для всех вариантов антигенспецифической стимуляции Т-клеток определили единый нормальный диапазон реакции на уровне 70–900 пг/мл.

Применение этих граничных значений для анализа формирования первичного, вторичного и гибридного иммунитета показано в табл. 3. При первичном ответе на SARS-CoV-2 в ходе заболевания или вакцинации (варианты состояния 1–2) на spike-антигены вируса наблюдалась преимущественно низкая и нормальная реакция Т-клеток памяти, а при вторичном ответе (варианты 3–5) наблюдался сдвиг показателей активации Т-клеток в сторону нормальных и высоких значений.

У непривитых людей, перенесших COVID-19 до появления в России вакцины против SARS-CoV-2, отсутствовали АГ-специфические Т-клетки к RBD SARS-CoV-2 (АГ3), а активность Т-клеток, специфичных к полноразмерному S-гликопротеину (АГ2) у 52% группы была низкой. Вторичный иммунный ответ после вакцинации этих лиц резко меняет ситуацию: 73,9% группы имеют нормальную и высокую активность АГ2-специфических Т-клеток, в том числе, 30,4% — высокую. Прорывная инфекция SARS-CoV-2 (омикрон) дает такой же эффект у ревакцинированных ранее не болевших людей: 88,9% группы имеют нормальную и высокую активность АГ2-специфических Т-клеток, в том числе, 42,9% — высокую. До заболевания COVID-19 вторичный иммунный ответ у здоровых людей (ревакцинация) не приводит к появлению и длительному сохранению в циркулирующей крови АГ2-специфических Т-клеток с высокой активностью.

Иммунный ответ на COVID-19 сложен и сильно варьирует у разных людей, представляя собой различные комбинации интенсивности антителообразования и интенсивности различных показателей специфического Т-клеточного ответа. Так, было обнаружено, что у некоторых пациентов после COVID-19 CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки памяти слабо пролиферируют а присутствии антигенов SARS-CoV-2, однако при этом продуцируют IFN γ и гранзим В (играющие важную роль в ограничении тяжести заболевания и выздоровления при COVID-19) на том же уровне, что и у пациентов, в крови которых содержатся клетки с высоким пролиферативным потенциалом на антигены вируса [12]. Имеют место различия в динамике количества Т-клеток эффекторной и центральной памяти [6, 7].

Тем не менее для понимания биологического значения наблюдаемых изменений в специфическом иммунном ответе введение оценки их интенсивности весьма желательно. Например, в случае увеличения концентрации антител против вируса при исходно низком их уровне можно ожидать сероконверсии, тогда как при исходно высоком уровне антител она может быть не выражена.

Определенные выводы могут быть сделаны, если авторами отдельно рассматриваются подгруппы с исходно низкими показателями Т-клеточной памяти и с относительно высокими. В ряде работ оценка показателя как высокого или низкого базируется на показателях Т-клеточного ответа на антигены SARS-CoV-2 при тяжелом, умеренном и легком течении COVID-19 [12]. В других статьях разделение показателей по их интенсивности проводится, однако его критерии не указаны [4, 5, 13].

Наш подход, при котором нижний квартиль распределения активности Т-клеток памяти (способности к АГ-стимулированной продукции IFN γ) соответствует низкой активности, а верхний квартиль — высокой, позволил нам проанализировать развитие Т-клеточного иммунитета в ходе вакцинации и ревакцинации, а также формирования гибридного иммунитета или прорывной инфекции.

Сложность и многоуровневость Т-клеточной памяти не позволяет по 1–2 показателям пол-

ностью характеризовать защищенность организма от реинфекции, однако мониторинг иммунной структуры населения с разным риском инфицирования необходим, и введение качественной оценки регистрируемых параметров может способствовать как практическим так и перспективным целям этого мониторинга, в том числе, созданию представлений о том, какой уровень активности Т-клеточной памяти достаточен для предупреждения или снижения тяжести инфекции SARS-CoV-2.

Список литературы/References

1. Бляхер М.С., Федорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И. Определение специфического Т-клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19 // Вопросы вирусологии, 2022. Т. 67, № 6. С. 527–537. [Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tulskaia E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I. Assessment of specific T-cell immunity to SARS-CoV-2 virus antigens in COVID-19 reconvalescents. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*, 2022, vol. 67, no. 6, pp. 527–537. (In Russ.)]
2. Бляхер М.С., Федорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И., Алешкин А.В., Бочкарева С.С. Формирование и сохранение специфического Т-клеточного иммунитета после перенесенной SARS-CoV-2 инфекции или вакцинации против нее // Вопросы вирусологии, 2023. Т. 68, № 3. С. 205–214. [Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tulskaia E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I., Aleshkin A.V., Bochkareva S.S. Development and preservation of specific T-cell immunity after a SARS-CoV-2 infection or vaccination against it. *Voprosy Virusologii = Problems of Virology*, 2023, vol. 68, no. 3, pp. 205–214. (In Russ.)]
3. Патент № 2780369 Российская Федерация, МПК G01N 33/68 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01), G01N 33/543 (2006.01), G01N 33/573 (2006.01), G01N 33/531 (2006.01), C12N 5/0786 (2010.01). Способ определения специфического клеточного иммунного ответа на антигены коронавируса (SARS-CoV-2): № 2021139712; заявлено 29.12.2021; опубликовано 21.09.2022 / Бляхер М.С., Капустин И.В., Одинцов Е.Е., Рамазанова З.К., Сандалова С.В., Тульская Е.А., Федорова И.М.; заявитель и патентообладатель ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. 16 с. [Patent No. 2780369 Russian Federation, Int. G01N 33/68 (2006.01), G01N 33/569 (2006.01), G01N 33/543 (2006.01), G01N 33/573 (2006.01), G01N 33/531 (2006.01), C12N 5/0786 (2010.01). Method for determining the specific cellular immune response to coronavirus antigens (SARS-CoV-2). No. 2021139712; application: 29.12.2021; date of publication 21.09.2022 / Blyakher M.S., Kapustin I.V., Odintsov E.E., Ramazanova Z.K., Sandalova S.V., Tulskaia E.A., Fedorova I.M. Proprietors: Federalnoe Byudzhethnoe uchrezhdenie nauki "Moskovskij nauchno-issledovatel'skij institut epidemiologii i mikrobiologii im. G.N. Gabrichevskogo" Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'ej i blagopoluchiya cheloveka. 16 p.]
4. Топтыгина А.П., Афридонова З.Э., Закиров Р.Ш., Семикина Е.Л. Поддержание иммунологической памяти к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии // Инфекция и иммунитет, 2023. Т. 13, № 1. С. 55–66. [Toptygina A.P., Afridonova Z.E., Zakirov R.Sh., Semikina E.L. Maintaining immunological memory to the SARS-CoV-2 virus during COVID-19 pandemic. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 55–66. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MIM-2009.
5. Agallou M., Koutsoni O.S., Michail M., Zisimopoulou P., Tsitsilonis O.E., Karagouni E. Antibody and T-cell subsets analysis unveils an immune profile heterogeneity mediating longterm responses in individuals vaccinated against SARS-CoV-2. *J. Inf. Dis.*, 2023, vol. 227, no. 3, pp. 353–363.
6. Almendro-Vazquez P., Laguna-Goya R. Paz-Artal E. Defending against SARS-CoV-2: the T cell perspective. *Front. Immunol.*, 2023, vol. 14, 1107803. doi: 10.3389/fimmu.2023.1107803.
7. Barros-Martins J., Hammerschmidt S.I., Morillas R.G., Cossmann A., Hetzel L., Odak I., Köhler M., Stankov M.V., Ritter C., Friedrichsen M., Ravens I., Schimrock A., Ristenpart J., Janssen A., Willenzon S., Bernhardt G., Lichtinghagen R., Bošnjak B., Behrens G.M.N., Förster R. Omicron infection-associated Tand B cell immunity in antigen-naive and triple COVID-19 vaccinated individuals. *Front. Immunol.*, 2023, vol. 14, 1166589. doi: 10.3389/fimmu.2023.1166589
8. Bobrovitz N., Ware H., Ma X., Li Z., Hosseini R., Cao C., Selemo A., Whelan M., Premji Z., Issa H., Cheng B., Abu Raddad L.J., Buckeridge D.L., Van Kerkhove M.D., Piechotta V., Higdon M.M., Wilder-Smith A., Bergeri I., Feikin D.R., Arora R.K., Patel M.K., Subissi L. Protective effectiveness of previous SARS-Cov-2 infection and hybrid immunity against the omicron variant and severe disease: a systematic review and meta-regression. *Lancet Infect. Dis.*, 2023, vol. 23, pp. 556–567.
9. Gao Y., Cai C., Grifoni A., Muller T.R., Niessi J., Olofsson A., Humbert M., Hansson L., Österborg A., Bergman P., Chen P., Olsson A., Sandberg J.K., Weiskopf D., Price D.A., Ljunggren H.G., Karlsson A.C., Sette A., Aleman S., Buggert M. Ancestral SARS-CoV-2-specific T cells cross-recognize the Omicron variant. *Nat. Med.*, 2022, vol. 28, no. 3, pp. 472–476.
10. Jacobsen H., Jimenez V.C., Sitaras I., Bar-Zeev N., Cicin-Sain L., Higdon M.M., Deloria-Knoll M. (2022) Postvaccination T cell immunity to omicron. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13, 944713. doi: 10.3389/fimmu.2022.944713.
11. Keeton R., Tincho M.B., Ngomti A., Baguma R., Benede N., Suzuki A., Khan K., Cele S., Bernstein M., Karim F., Madzorera S.V., Moyo-Gwete T., Mennen M., Skelem S., Adriaanse M., Mutithu D., Aremu O., Stek C., du Bruyn E., Van Der Mescht M.A., de Beer Z., de Villiers T.R., Bodenstien A., van den Berg G., Mendes A., Strydom A., Venter M., Giandhari J., Naidoo Y.,

- Pillay S., Tegally H., Grifoni A., Weiskopf D., Sette A., Wilkinson R.J., de Oliveira T., Bekker L.G., Gray G., Ueckermann V., Rossouw T., Boswell M.T., Bhiman J.N., Moore P.L., Sigal A., Ntusi NAB, Burgers W.A., Riou C. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron. *Nature*, 2022, vol. 603, no. 7901, pp. 488–492. doi: 10.1038/s41586-022-04460-3
12. Lin J., Law R., Korosec C.S., Zhou C., Koh W.H., Ghaemi M.S., Samaan P., Ooi H.K., Matveev V., Yue F., Gingras A.C., Estacio A., Buchholz M., Cheatley P.L., Mohammadi A., Kaul R., Pavinski K., Mubareka S., McGeer A.J., Leis J.A., Heffernan J.M., Ostrowski M. Longitudinal assessment of SARS-CoV-2-specific T cell cytokine-producing responses for 1 year reveals persistence of multicytokine proliferative responses, with greater immunity associated with disease severity. *J. Virol.*, 2022, vol. 96, no. 13, e0050922. doi: 10.1128/jvi.00509-22
13. Naranbhai V., Nathan A., Kaseke C., Berrios C., Khatri A., Choi S., Getz M.A., Tano-Menka R., Ofoman O., Gayton A., Senjobe F., Zhao Z., St Denis K.J., Lam E.C., Carrington M., Garcia-Beltran W.F., Balazs A.B., Walker B.D., Iafraite A.J., Gaiha G.D. T cell reactivity to the SARS-CoV-2 Omicron variant is preserved in most but not all individuals. *Cell*, 2022, vol. 185, no. 6, pp. 1041–1051. doi: 10.1016/j.cell.2022.01.029

Авторы:

Бляхер М.С., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Федорова И.М., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Котелева С.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Капустин И.В., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета иммунобиологических препаратов ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Тулская Е.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Рамазанова З.К., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Одинцов Е.Е., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Сандалова С.В., научный сотрудник лаборатории по изучению клеточных и молекулярных основ иммунитета ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Новикова Л.И., к.м.н., руководитель лаборатории иммунобиологических препаратов ФБУН Московский научноисследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Бочкарева С.С., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологических препаратов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Blyakher M.S., DSc (Medicine), Professor, Head, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Fedorova I.M., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Koteleva S.I., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Kapustin I.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Tulskaya E.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Ramazanova Z.K., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Odintsov E.E., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Sandalova S.V., Research Associate, Laboratory for the Study of Cellular and Molecular Bases of Immunity, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Novikova L.I., PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Immunobiological Preparations, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Bochkareva S.S., DSc (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunobiological Preparations, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

БАЛАНС ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА, ПРОШЕДШИХ АКТИВНУЮ ИММУНИЗАЦИЮ ОТ SARS-CoV-2 В ПЕРИОД ПАНДЕМИИ COVID-19

Ю.А. Ли¹, М.Н. Дмитраченко¹, Е.В. Маркелова¹, И.Б. Королев¹, М.П. Костинов^{2,3}, Л.И. Бондарь⁴

¹ ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

⁴ ГБУЗ Краевая клиническая больница № 2, Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Владивосток, Россия

Резюме. В 2019 г. началась пандемия COVID-19, изменившая мир. Коронавирус SARS-CoV-2 стал причиной массовых заболеваний и смертей по всему миру. В связи с этим появилась необходимость в вакцинации, которая является важнейшим инструментом для создания коллективного иммунитета. В исследовании проанализирована динамика про-, противовоспалительных цитокинов и антител к SARS-CoV-2, в сыворотке крови пациентов молодого возраста до и после вакцинации от COVID-19. В исследуемую группу вошли 76 юношей. Определение IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IFN γ , TNF α и антител IgM и IgG к COVID-19 в сыворотках венозной крови проводилось двукратно, методом ИФА с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск. Первый забор крови проведен до вакцинации, второй забор — через 1 месяц после вакцинации от COVID-19. Обработка результатов производилась при помощи STATISTICA 8.0. Наблюдение за вакцинированными осуществлялось в течение 6 месяцев после вакцинации. Уровни показателей до вакцинации: IL-1 β (5,6 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 3,1–14,2)); IL-4 (1,02 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,75–1,28)); IL-6 (27,8 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 7,1–59,9)); IL-8 (29,9 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 19,51–32,14)); IL-10 (4,47 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 1,84–14,75)); IL-17 (7,33 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 6,82–8,58)); IFN γ (0,7 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,4–0,9)); TNF α (3,9 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 2,2–6,4)). Уровни показателей после вакцинации: IL-1 β (1,6 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 1,4–2,2)); IL-4 (0,84 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,59–1,12)); IL-6 (1,2 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,6–1,7)); IL-8 (10,1 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 3,8–28,9)); IL-10 (5,84 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 1–9,99)); IFN γ (0,6 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,3–0,8)); TNF α (0,6 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,3–1,9)). Как до, так и после вакцинации от SARS-CoV-2 выявлены различные распределения уровней цитокинов с тенденцией к снижению, но несмотря на это между многими отмечаются сильные корреляционные взаимосвязи, что свидетельствует об усилении напряженности иммунной системы в ответ на вакцинацию. При расчете коэффициента соотношения про- и противо-

Адрес для переписки:

Ли Юлия Александровна
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 2,
Военно-учебный центр ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России.
Тел.: 8 (914) 976-59-36.
E-mail: julianochka160188@gmail.com

Contacts:

Yulia A. Li
690011, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakova pr., 2,
Military Training Center of the Pacific State Medical University.
Phone: +7 (914) 976-59-36.
E-mail: julianochka160188@gmail.com

Для цитирования:

Ли Ю.А., Дмитраченко М.Н., Маркелова Е.В., Королев И.Б., Костинов М.П., Бондарь Л.И. Баланс про- и противовоспалительных цитокинов у пациентов молодого возраста, прошедших активную иммунизацию от SARS-CoV-2 в период пандемии COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 459–464. doi: 10.15789/2220-7619-BOP-16848

Citation:

Li Yu.A., Dmitrachenko M.N., Markelova E.V., Korolev I.B., Kostinov M.P., Bondar L.I. Balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in young patients who passed active immunization against SARS-CoV-2 during the COVID-19 pandemic // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 459–464. doi: 10.15789/2220-7619-BOP-16848

воспалительных цитокинов «К» выявлено его двукратное снижение, что отражает снижение уровней провоспалительных цитокинов после вакцинации. Уровень антител IgG к COVID-19 превышал защитный — в более чем 14 раз у 98% испытуемых. Дальнейшее исследование воздействия вакцинации от SARS-CoV-2 на врожденный иммунитет позволит пересмотреть нынешнюю стратегию вакцинации и выбрать наилучший подход к предотвращению COVID-19.

Ключевые слова: активная иммунизация, вакцинация, цитокиновый профиль, врожденный иммунитет, COVID-19, SARS-CoV-2.

BALANCE OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN YOUNG PATIENTS WHO PASSED ACTIVE IMMUNIZATION AGAINST SARS-CoV-2 DURING THE COVID-19 PANDEMIC

Li Yu.A.^a, Dmitrachenko M.N.^a, Markelova E.V.^a, Korolev I.B.^a, Kostinov M.P.^{b,c}, Bondar L.I.^d

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^c I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

^d Regional Clinical Hospital No. 2, Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. In 2019, the COVID-19 pandemic began and changed the world. Coronavirus SARS-CoV-2 has caused widespread illness and death around the world. In this regard, vaccination become the most important tool for creating herd immunity. Our study analyzed the dynamics of pro- and anti-inflammatory cytokines and antibodies to SARS-CoV-2 in the blood serum of young patients before and after vaccination against COVID-19. The study group included 76 young men. Determination of IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IFN γ , TNF α and IgM and IgG antibodies to COVID-19 in venous blood sera was carried out twice, by ELISA using the test systems of Vector-Best Company, Novosibirsk. The first blood samples were carried out before vaccination, the second — 1 month after vaccination against COVID-19. The results were processed using STATISTICA 8.0. The vaccinated people were monitored for 6 months after vaccination. Levels of indices before vaccination: IL-1 β (5.6 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 3.1–14.2)); IL-4 (1.02 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 0.75–1.28)); IL-6 (27.8 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 7.1–59.9)); IL-8 (29.9 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 19.51–32.14)); IL-10 (4.47 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 1.84–14.75)); IL-17 (7.33 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 6.82–8.58)); IFN γ (0.7 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 0.4–0.9)); TNF α (3.9 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 2.2–6.4)). Levels of indices after vaccination: IL-1 β (1.6 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 1.4–2.2)); IL-4 (0.84 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 0.59–1.12)); IL-6 (1.2 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 0.6–1.7)); IL-8 (10.1 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 3.8–28.9)); IL-10 (5.84 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 1–9.99)); IFN γ (0.6 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 0.3–0.8)); TNF α (0.6 pg/ml (Q₂₅–Q₇₅ = 0.3–1.9)). Both before and after vaccination against SARS-CoV-2, different distributions of cytokine levels were identified with a downward trend, but despite this, strong correlations were observed between many of them, which indicates an increase in the tension of the immune system in response to vaccination. When calculating the ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines, its two-fold decrease was revealed, which reflects a decrease in the levels of pro-inflammatory cytokines after vaccination. The level of IgG antibodies to COVID-19 exceeded the protective level: more than 14 times in 98% of subjects. Further research into the impact of SARS-CoV-2 vaccination on innate immunity will allow us to reconsider the current vaccination strategy and determine the best approach to preventing COVID-19.

Key words: active immunization, vaccination, cytokine profile, innate immunity, COVID-19, SARS-CoV-2.

Введение

В 2019 г. началась пандемия COVID-19, изменившая мир [7]. Коронавирус SARS-CoV-2 стал причиной массовых заболеваний и смертей по всему миру, вынудив правительства многих стран ввести жесткие ограничения и меры безопасности для контроля его распространения [8]. В свете этого, чтобы предотвратить дальнейшее распространение вируса и защитить население, появилась необходимость в формировании коллективного иммунитета к COVID-19, который можно получить путем инфицирования или активной иммунизации [1]. Вакцинация является важным инструментом для создания коллективного иммунитета. Однако, стоит отметить,

что процесс формирования поствакцинального иммунитета к COVID-19 — является предметом активного изучения, так как существует множество факторов, таких как индивидуальные особенности организма, предшествующие и сопутствующие заболевания, которые могут в значительной степени влиять на реакцию иммунитета и эффективность вакцинации [2]. Исходя из этого, большое количество работ посвящено данной проблематике, но остается ряд нерешенных вопросов. Например, какова роль некоторых патогенетически значимых про- и противовоспалительных цитокинов в формировании поствакцинального иммунитета или реакция иммунитета к вакцинации на фоне пандемии [2, 3].

Материалы и методы

В исследование включены 76 здоровых юношей в возрасте от 18 до 19 лет. Для проведения исследования производился двукратный забор сыворотки венозной крови: 1-й — до вакцинации от SARS-CoV-2; 2-й — через месяц после вакцинации от SARS-CoV-2. Препарат, используемый для вакцинации — «Спутник Лайт». Наблюдение за испытуемыми осуществлялось в течение 6 месяцев после вакцинации.

В сыворотках крови производилось определение уровня цитокинов (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IFN γ , TNF α) и антител IgM и IgG к COVID-19 путем проведения твердофазного ИФА с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск.

Данные, полученные при анализе результатов до вакцинации, сравнивались с референсными значениями, ранее полученными в нашем регионе [4]. Показатели после вакцинации от SARS-CoV-2 сравнивались с исходными показателями до вакцинации, так как исследуемая группа состоит из здоровых молодых людей одного возраста, которые находились в одинаковых эпидемиологических условиях.

Статистическая обработка данных проведена с помощью электронных таблиц EXCEL 2013 и пакета программ STATISTICA 8.0 в операционной системе Windows 10. Нормальность распределения оценивалась по критерию Колмогорова-Смирнова. В случае несоответ-

ствия критериям нормальности для количественных данных вычислялись значения медианы (Me), нижнего (25%) и верхнего (75%) квартиля (Q₂₅–Q₇₅), а для качественных значения абсолютных (n) и относительных (%) частот. Выявления статистической взаимосвязи между переменными происходило с помощью расчета коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

До вакцинации нами определен уровень цитокинов в сыворотке крови и проведено сравнение их количественных значений с показателями контрольной группы людей аналогичного возраста, полученных в исследовании Крыловой Н.В. (2012): IL-1 β (5,6 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 3,1–14,2) — ниже нормы у 82% (n = 62) включенных в исследование; IL-4 (1,02 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,75–1,28) — ниже нормы у 86% (n = 65); IL-6 (27,8 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 7,1–59,9) у 76% (n = 58) — выше нормы, у 19% (n = 19) — в пределах нормы, 5% (n = 4) — ниже нормы; IL-8 (29,9 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 19,51–32,14) и IL-17 (7,33 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 6,82–8,58) — выше нормы у всех пациентов (n = 76 (100%)); IL-10 (4,47 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 1,84–14,75) у 50% (n = 38) — ниже нормы, у 25% (n = 19) — норма и у 25% (n = 19) — выше нормы; IFN γ (0,7 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,4–0,9) — ниже нормы у всех обследованных (n = 76 (100%)); TNF α (3,9 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 2,2–6,4) находился в нор-

Таблица 1. Распределение цитокинов в виде качественных, относительных частот среди условно здоровых людей, включенных в исследование: до вакцинации — по сравнению с группой контроля [4]; после вакцинации — по сравнению с исходными значениями до вакцинации

Table 1. Cytokines distribution in the form of qualitative, relative frequencies among conditionally healthy people included in the study: before vaccination — compared with the control group [4]; after vaccination — compared to initial values before vaccination

Показатели (пг/мл) Indices (pg/ml)	До вакцинации Before vaccination			После вакцинации от SARS-CoV-2 After vaccination against SARS-CoV-2		
	↑	N	↓	↑ исх. значений ↑ ref. values	исх. значения ref. values	↓ исх. значений ↓ ref. values
IL-1 β	5%	13%	82%	0%	5%	95%
IL-4	7%	7%	86%	8%	5%	87%
IL-6	76%	19%	5%	0%	0%	100%
IL-8	100%	0%	0%	0%	0%	100%
IL-10	25%	25%	50%	4%	5%	90%
IL-17	100%	0%	0%	8%	70%	22%
IFN γ	0%	0%	100%	0%	0%	100%
TNF α	17%	7%	76%	0%	0%	100%

Примечание. ↑ — выше нормальных значений; N — нормальные значения; ↓ — ниже нормальных значений; ↑ исх. значений — выше исходных значений; исх. значения — исходные значения; ↓ исх. значений — ниже исходных значений.

Note. ↑ — above normal values; N — normal values; ↓ — below normal values; ↑ Ref. values — higher than the initial values; Ref. values — initial values; ↓ Ref. values — below the initial values.

Таблица 2. Количественные показатели динамики уровней цитокинов (пг/мл) у условно здоровых людей, включенных в исследование, Ме (Q₂₅–Q₇₅)Table 2. Quantitative indices of cytokine levels dynamics (pg/ml) in conditionally healthy people included in the study, Me (Q₂₅–Q₇₅)

Показатели (пг/мл) Indices (pg/ml)	До вакцинации Before vaccination	После вакцинации от SARS-CoV-2 After vaccination against SARS-CoV-2
IL-1β	5,6 (3,1–14,2)	1,6 (1,4–2,2)
IL-4	1,02 (0,75–1,28)	0,84 (0,59–1,12)
IL-6	27,8 (7,1–59,9)	1,2 (0,6–1,7)
IL-8	29,9 (19,51–32,14)	10,1 (3,8–28,9)
IL-10	4,47 (1,84–14,75)	5,84 (1–9,99)
IL-17	7,33 (6,82–8,58)	7,1 (5,82–8,32)
IFNγ	0,7 (0,4–0,9)	0,6 (0,3–0,8)
TNFα	3,9 (2,2–6,4)	0,6 (0,3–1,9)

ме у 92% (n = 70) включенных в исследование, а у 8% (n = 6) — ниже нормы (табл. 1 и 2).

При анализе количественных показателей содержания цитокинов в сыворотке крови через 1 месяц после вакцинации от SARS-CoV-2 наблюдалось снижение уровней большинства про- и противовоспалительных цитокинов, таких как IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-17, IFNγ, TNFα и только IL-10 незначительно повышался у 41% (n = 41) пациентов. Показатели уровней IL-6 (1,2 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,6–1,7), IL-8 (10,1 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 3,8–28,9), IFNγ (0,6 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,3–0,8) и TNFα (0,6 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,3–1,9) находились ниже нормы у всех пациентов (n = 76 (100%)); IL-1β (1,6 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 1,4–2,2) — ниже нормы у 95% (n = 72); IL-10

(5,84 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 1–9,99) — ниже нормы у 91% (n = 69); IL-4 (0,84 пг/мл (Q₂₅–Q₇₅ = 0,59–1,12) — ниже нормы у 87% (n = 66) пациентов (табл. 1 и 2).

При анализе взаимосвязей до вакцинации задокументирована корреляция между ведущими про- и противовоспалительными цитокинами: сильная прямая корреляция между IL-8 и IL-1b; IL-8 и IL-6; IL-8 и TNFα; IL-1b и IL-6; IL-6 и TNFα и значимая обратная корреляционная связь между IL-10 и IL-1b, что согласуется с другими работами [9]. После вакцинации выявлены значимые корреляционные связи между теми же провоспалительными цитокинами, что и до вакцинации. Данные цитокины работают в синергизме и входят в одну группу. Также отмечались следующие корреляционные взаимосвязи — прямая корреляция между IL-10 до и IL-10 после вакцинации и обратная корреляция между TNFα до вакцинации и IL-10 после вакцинации (рис.).

Цитокины как биологически активные вещества влияют на одну из важнейших реакций организма — воспаление. Воспаление — это сложный разнонаправленный процесс, что и было отмечено при анализе динамики уровней про- и противовоспалительных цитокинов. Исходя из этого, был рассчитан коэффициент соотношения про- и противовоспалительных цитокинов «К» = (IL-1β + IL-6 + IL-8 + TNFα + IFNγ) / (IL-4 + IL-10). Значение коэффициента до вакцинации — 10,00 (Q₂₅–Q₇₅ = 5,17; 44,44), после вакцинации от SARS-CoV-2 — 5,18 (Q₂₅–Q₇₅ = 1,02; 11,11). В связи с полученными данными отмечено, что среднее значение коэффициента «К» после вакцинации от SARS-CoV-2 снизилось в 2 раза.

Исходя из полученных данных можно констатировать, что после вакцинации уровни

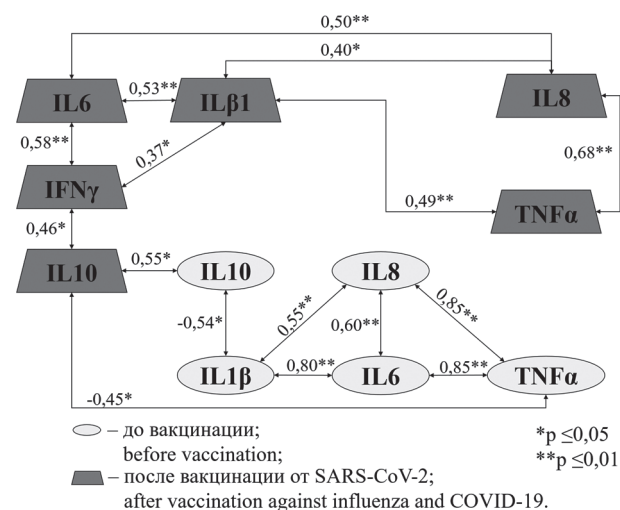
**Рисунок. Взаимосвязь уровней цитокинов до и после вакцинации от SARS-CoV-2**

Figure. Relationship between cytokine levels before and after SARS-CoV-2 vaccination

провоспалительных цитокинов снизились, а на передний план вышли противовоспалительные биологически активные вещества.

До вакцинации от SARS-CoV-2 в исследуемой группе антитела Ig M и IgG к COVID-19 не определялись, что являлось одним из критериев включения в исследование. Через 1 месяц после вакцинации от COVID-19 уровни антител Ig G к SARS-CoV-2 у 98% испытуемых составили > 1000 ВАУ/мл (2096 ВАУ/мл ($Q_{25}-Q_{75} = 154,19-2971,25$), а у отдельных пациентов значения превышали 4000 ВАУ/мл. Как известно, защитный уровень антител после вакцинации препаратом «Спутник Лайт» по данным разработчика — Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи составляет 150 ВАУ/мл. В исследуемой группе полученные значения превышали защитный уровень в 14 раз.

При анализе взаимосвязей антител и цитокинов в динамике была выявлена тенденция к обратной корреляции между антителами IgG к COVID-19 и IL-4 после вакцинации, что может быть связано с индивидуальными особенностями обследованных, их исходным состоянием [2]. Так как в литературных источниках описывают прямую взаимосвязь между повышением IL-4 и активацией иммунитета, что выражается в нарастании титров антител к COVID-19 [5].

В ходе наблюдения за исследуемой группой в течение 6 мес. после вакцинации от SARS-CoV-2 было зафиксировано 69 случаев острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ), что составило — 91%. Из них подтвержденных методом ПЦР случаев COVID-19 выявлено — 17% ($n = 12$). Все заболевания проходили в легкой форме, без осложнений и длились в среднем $2,38 (Q_{25}-Q_{75} = 0,5-3,5)$ дней.

Выводы

До и после вакцинации от SARS-CoV-2 отмечались различные распределения уровней цитокинов с тенденцией к снижению, между большинством провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) были выявлены сильные корреляционные связи на всех этапах исследования, что свидетельствует об усилении напряженности иммунной системы в ответ на вакцинацию. Уровни антител IgG к COVID-19 превышали защитный — в более чем 14 раз у 98% людей, включенных в исследование. При этом IL-4, который считается одним из иммунологических индикаторов эффективности вакцинации [6], достоверно снижался и демонстрировал тенденцию к обратной корреляции с IgG к COVID-19. Коэффициент соотношения про- и противовоспалительных цитокинов «К» через 1 месяц после вакцинации от SARS-CoV-2 снижался в 2 раза.

Список литературы/References

1. Костинов М.П. Иммунопатогенные свойства SARS-CoV-2 как основа для выбора патогенетической терапии // Иммунология. 2020. Т. 41, № 1. С. 83–91. [Kostinov M.P. Immunopathogenic properties of SARS-CoV-2 as a basis for the choice of pathogenetic therapy. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, vol. 41, no. 1, pp. 83–91. (In Russ.)] doi: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-83-91
2. Костинов М.П., Свитич О.А., Маркелова Е.В. Потенциальная иммунопрофилактика COVID-19 у групп высокого риска инфицирования. Временное пособие для врачей. М.: Группа М.Д.В., 2020. 64 с. [Kostinov M.P., Svitich O.A., Markelova E.V. Potential COVID-19 immunization in high-risk groups. Provisional guide for physicians. Moscow: MDV Group, 2020. 64 p. (In Russ.)]
3. Костинов М.П., Хромова Е.А., Костинова А.М. Может ли вакцинация против гриппа быть неспецифической профилактикой SARS-CoV-2 и других респираторных инфекций? // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 3. С. 36–40. [Kostinov M.P., Khromova E.A., Kostinova A.M. Can influenza vaccination be a nonspecific prevention of SARS-CoV-2 and other respiratory infections? *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2020, vol. 9, no. 3, pp. 36–40. (In Russ.)] doi: 10.33029/2305-3496-2020-9-3-36-40
4. Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Павленко Е.В. Особенности цитокинового профиля на ранних стадиях инфицирования вирусом клещевого энцефалита у вакцинированных и невакцинированных людей // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. № 4. С. 78–81. [Krylova N.V., Leonova G.N., Pavlenko E.V. Features of the cytokine profile in the early stages of infection with tick-borne encephalitis virus in vaccinated and unvaccinated people. *Tihookeanskiy medicinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2012, no. 4, pp. 78–81. (In Russ.)]
5. Kaminska D., Deborska-Materkowska D., Koscielska-Kasprzak K., Mazanowska O., Remiorz A., Poznanski P., Durluk M., Krajewska M. Immunity after COVID-19 recovery and vaccination: similarities and differences. *Vaccines*, 2022, vol. 10, no. 7: 1068. doi: 10.3390/vaccines10071068
6. La Sala L., Gandini S., Bruno A., Allevi R., Gallazzi M., Senesi P., Palano M.T., Merigalli P., Longhi E., Sommese C., Luzi L., Trabucchi E. SARS-CoV-2 Immunization Orchestrates the Amplification of IFN γ -Producing T Cell and NK Cell Persistence. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13: 798813. doi: 10.3389/fimmu.2022.798813
7. Pierce J.D., Shen Q., Cintron S.A., Hiebert J.B. Post-COVID-19 Syndrome. *Nurs. Res.*, 2022, vol. 71, no. 2, pp. 164–174. doi: 10.1097/NNR.0000000000000565
8. Principi N., Autore G., Ramundo G., Esposito S. Epidemiology of Respiratory Infections during the COVID-19 Pandemic. *Viruses*, 2023, vol. 15, no. 5: 1160. doi: 10.3390/v15051160

9. Wang Z., Schmidt F., Weisblum Y., Muecksch F., Barnes C.O., Finkin S., Schaefer-Babajew D., Cipolla M., Gaebler C., Lieberman J.A., Oliveira T.Y., Yang Z., Abernathy M.E., Huey-Tubman K.E., Hurley A., Turroja M., West K.A., Gordon K., Millard K.G., Ramos V., Da Silva J., Xu J., Colbert R.A., Patel R., Dizon J., Unson-O'Brien C., Shimeliovich I., Gazumyan A., Caskey M., Bjorkman P.J., Casellas R., Hatzioannou T., Bieniasz P.D., Nussenzweig M.C. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature*, 2021, vol. 592, no. 7855, pp. 616-622. doi: 10.1038/s41586-021-03324-6

Авторы:

Ли Ю.А., к.м.н., врач-инфекционист, майор медицинской службы, преподаватель военного-учебного центра ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия;
Дмитраченко М.Н., студентка лечебного факультета ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия;
Маркелова Е.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Владивосток, Россия;
Королев И.Б., к.м.н., полковник медицинской службы, начальник военного-учебного центра ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия;
Костинов М.П., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; зав. кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия;
Бондарь Л.И., врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Владивосток, Россия.

Authors:

Li Yu.A., PhD (Medicine), Infectious Diseases Doctor, Major of Medical Service, Lecturer of the Military Training Center of the Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;
Dmitrachenko M.N., Student, Medical Faculty, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;
Markelova E.V., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Ministry of Health of Russia, Vladivostok, Russian Federation;
Korolev I.B., PhD (Medicine), Colonel of Medical Service, Head of the Military Training Center of the Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;
Kostinov M.P., RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Head of the Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;
Bondar L.I., Clinical Laboratory Diagnostics Doctor, Regional Clinical Hospital No. 2, Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Vladivostok, Russian Federation.

АВИДНОСТЬ ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ СТИМУЛИРОВАННЫХ *IN VITRO* В-КЛЕТОК ПАМЯТИ ДОНОРОВ, НЕ МЕНЯЕТСЯ ЧЕРЕЗ МЕСЯЦ ПОСЛЕ РЕВАКЦИНАЦИИ СПУТНИКОМ V ИЛИ COMIRNATY

Е.А. Астахова^{1,2}

¹ ФГБУ Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме. Защитные свойства долговременной иммунологической памяти после вакцинации от COVID-19 характеризуются нейтрализующей активностью сывороточных антител и антител, секретируемых В-клетками памяти при повторной встрече с антигеном. Соматические гипермутации, происходящие в генах иммуноглобулинов В-клеток памяти — один из механизмов повышения аффинности антител. В настоящий момент вопрос влияния повторной вакцинации от COVID-19 векторными вакцинами на созревание аффинности антите, секретируемых активированными В-клетками памяти остается малоизученным. Целью настоящей работы было определить, как ревакцинация от COVID-19 влияет на аффинность RBD-специфических IgG-антител, секретируемых В-клетками памяти. *Материалы и методы.* В-лимфоциты были выделены из периферических мононуклеарных клеток крови добровольцев, прошедших ревакцинацию от COVID-19 Спутником V или Comirnaty. В-лимфоциты были стимулированы *in vitro* с помощью CD40L, экспрессированного на поверхности фидерных клеток A549, и IL-21. Образцы супернатантов были сконцентрированы в 8 раз с помощью центрифужных концентраторов. Уровень IgG-антител, специфических к RBD дикого типа, был определен методом иммуноферментного анализа (ИФА). Индекс авидности поликлональных антител от стимулированных В-лимфоцитов *in vitro* был определен методом ИФА в присутствии 7М мочевины. *Результаты.* В полученных супернатантах от стимулированных В-клеток памяти определяли уровень IgG-антител, специфических к RBD дикого типа, методом иммуноферментного анализа (ИФА). Только для 12% образцов был получен сигнал, превосходящий пороговый уровень детекции. В связи с этим, образцы супернатантов были сконцентрированы в 8 раз с помощью центрифужных концентраторов. После концентрирования уровень анти-RBD IgG-антител удалось определить для 82% образцов. Для определения индекса авидности методом ИФА в присутствии мочевины предварительно была подобрана концентрация хаотропного агента. Было выбрано по 3 образца с высоким и низким содержанием специфических антител. Было показано, что индекс

Адрес для переписки:

Астахова Екатерина Андреевна
115522, Россия, Москва, Каширское ш., 24,
ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА.
Тел.: 8 (910) 599-82-70. E-mail: ast_kat@mail.ru

Contacts:

Ekaterina A. Astakhova
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,
Obolensk, State Research Center for Applied Microbiology
and Biotechnology.
Phone: +7 (910) 599-82-70. E-mail: ast_kat@mail.ru

Для цитирования:

Астахова Е.А. Авидность вирус-специфических антител, полученных от стимулированных *in vitro* В-клеток памяти доноров, не меняется через месяц после ревакцинации Спутником V или Comirnaty // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 465–470. doi: 10.15789/2220-7619-TAO-16938

Citation:

Astakhova E.A. The avidity of virus-specific antibodies obtained from *in vitro* stimulated memory B cells does not change one month after booster with Sputnik V or Comirnaty // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 465–470. doi: 10.15789/2220-7619-TAO-16938

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00472).
This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-25-00472).

© Астахова Е.А., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TAO-16938>

авидности антител уменьшается с увеличением концентрации мочевины для образцов с низким содержанием антител, а для образцов с высоким содержанием этот показатель не меняется. Для дальнейшего определения индекса авидности в образцах супернатантов была выбрана концентрация мочевины 7М. Было показано, что несмотря на общее увеличение количества антиген-специфических IgG-антител, полученных от стимулированных В-клеток памяти, изменения авидности этих антител через Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов созревания В-клеток памяти после многократной вакцинации от COVID-19 и могут быть полезны для принятия решения о стратегии повторной вакцинации.

Ключевые слова: авидность антител, RBD-специфические антитела, В-клетки памяти, вакцинация, COVID-19, Спутник V.

THE AVIDITY OF VIRUS-SPECIFIC ANTIBODIES OBTAINED FROM *IN VITRO* STIMULATED MEMORY B CELLS DOES NOT CHANGE ONE MONTH AFTER BOOSTER WITH SPUTNIK V OR COMIRNATY

Astakhova E.A.^{a,b}

^a National Research Center Institute of Immunology, Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The protective properties of long-term immunological memory after vaccination against COVID-19 are characterized by the neutralizing activity of serum antibodies and antibodies secreted by memory B cells upon repeated encounter with the antigen. Somatic hypermutations occurring in the immunoglobulin genes of memory B cells are one of the mechanisms for increasing the affinity of antibodies. At the moment, the effect of booster vaccination against COVID-19 with vector vaccines, on the maturation of memory B cells remains poorly understood. The purpose of this work was to determine how COVID-19 booster affects the affinity of RBD-specific IgG antibodies secreted by memory B cells. B lymphocytes were isolated from peripheral mononuclear blood cells of volunteers who had been revaccinated against COVID-19 with Sputnik V or Comirnaty. B cells were stimulated *in vitro* with CD40L expressed on the surface of A549 feeder cells and IL-21. Supernatants were concentrated 8-fold using centrifugal concentrators. In the obtained supernatants from stimulated memory B cells, the level of IgG antibodies specific to wild-type RBD was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To determine the avidity index, ELISA with 7M urea was provided. It was shown that despite a general increase in the amount of antigen-specific IgG antibodies obtained from stimulated memory B cells, there was no change in the avidity of these antibodies one month after booster in both groups of donors. The obtained results contribute to the understanding of the mechanisms of memory B cell maturation after booster vaccinations against COVID-19 and may be useful for deciding on the strategy of booster vaccination.

Key words: avidity of antibodies, RBD-specific antibodies, memory B cells, vaccination, COVID-19, Sputnik V.

Введение

Во время пандемии COVID-19 долгое время во многих странах применялась стратегия вакцинации с повторным введением одной и той же вакцины, основанной на диком типе SARS-CoV-2. Долговременная иммунная память обеспечивается антителами, которые конститутивно секретируются плазматическими В-клетками [4, 15], а также В-клетками памяти, которые находятся в состоянии покоя до момента повторной встречи с антигеном [10, 11]. Специфические В-клетки памяти циркулируют в организме человека минимум в течение года после вакцинации от COVID-19 [9]. Ранее нами было показано, что В-клетки памяти через полгода после вакцинации Спутником V, при стимуляции *in vitro* сохраняют способность секретировать нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 как дикого типа, так и вариантов Дельта и Омикрон BA.1 [2]. Информации о функциональной активности В-клеток памяти, сформированных после нескольких повторных вакцинаций, к настояще-

му моменту недостаточно для формирования целостного понимания процесса созревания В-клеток памяти.

В-клетки подвергаются соматическим гипермутациям в зародышевых центрах лимфоузлов. В результате этого процесса может повышаться аффинность и нейтрализующая активность секретируемых антител. Кроме того, может изменяться кросс-реактивность антител в отношении вариантов SARS-CoV-2. Соматические гипермутации происходят в течение полугода после перенесенного COVID-19 [14], а также после двукратной вакцинации мРНК-вакцинами, хотя и в меньшей степени, что может быть связано с недостаточным временным интервалом между повторным введением вакцины [5, 12]. Меньше известно о созревании аффинности антител после вакцинации векторными вакцинами, такими как: Спутник V и ChAdOx1.

Авидность сывороточных антител обычно определяют методом иммуноферментного анализа в присутствии хаотропного агента — мочевины. Поскольку сывороточные антитела

имеют поликлональную природу, используют термин авидность, который по сути отражает совокупные взаимодействия специфических антител разной аффинности с целевым антигеном. Ранее с помощью этого метода было показано, что инфекция SARS-CoV-2 и вакцинация против COVID-19 (как мРНКовыми вакцинами, так и Спутником V) индуцируют увеличение авидности сывороточных антител [1, 8, 13].

В настоящей работе мы применили метод определения авидности для RBD-специфических IgG-антител, полученных от стимулированных *in vitro* В-клеток памяти. В отличие от ряда работ, в которых созревание В-клеток памяти оценивают путем секвенирования генов иммуноглобулинов с количественным подсчетом мутаций [7, 14], мы анализировали антитела, непосредственно секретируемые В-клетками памяти при стимуляции *in vitro*. В исследовании приняли участие доноры, прошедшие гомологичную ревакцинацию вакциной Спутник V или гетерологичную вакциной Comirnaty. Мы показали, что через месяц после ревакцинации в крови доноров увеличивается количество В-клеток памяти, которые при стимуляции *in vitro* секретируют RBD-специфический иммуноглобулин G. При увеличении авидности антител не наблюдалось. Это может свидетельствовать об отборе В-клеток памяти, секретирующих антитела с определенной аффинностью, специфичных к RBD дикого типа, а также о том, что процесс созревания В-клеток памяти происходит в течение более длительного промежутка времени.

Материалы и методы

В настоящее исследование вошли 17 человек, которые прошли полный курс вакцинации от COVID-19 Спутником V. Через полгода после вакцинации 12 из них были ревакцинированы Спутником V, а 5 — мРНКовой вакциной Comirnaty (Pfizer/BioNTech). Исследование было выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека в качестве испытуемого». От каждого участника исследования было получено письменное информированное согласие. Протокол исследования рассмотрен и одобрен Этическим комитетом ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (протокол № 12–1, 29 декабря 2020 г.).

Образцы периферических мононуклеарных клеток (PBMC) были собраны до ревакцинации (точка 1) и через месяц после ревакцинации (точка 2). Клетки были выделены из цельной крови, собранной в пробирки с гепарином,

на градиенте фикола и заморожены на -70°C , а затем перенесены на хранение в жидкий азот.

В-лимфоциты были выделены из размороженных PBMC путем негативной магнитной сепарации с помощью набора Dynabeads Untouched human B-cells (Thermo Fisher Scientific, США). В-клетки (5000 на лунку 96-луночного планшета) стимулировали в течение 7 дней в присутствии CD40L, стабильно экспрессированного на клетках A549 (10 000 на лунку) и IL-21 (25 нг/мл, PeproTech, США). Полученные супернатанты собирали, аликвотировали и замораживали на -20°C . Концентрирование супернатантов проводили с помощью центрифужных концентраторов Amicon Ultra 100 kDa (Merck, Millipore, Ирландия). Необходимый объем супернатанта наносили в концентратор и центрифугировали при 3000g. Процедуру повторяли несколько раз до тех пор, пока объем супернатанта не уменьшался в 8 раз.

Определение уровня RBD-специфических IgG-антител проводили с помощью набора анти-SARS-CoV-2-IgG ИФА (Хема, Россия) согласно инструкциям производителя. Определение авидности антител проводили с помощью того же набора, но с дополнительной стадией. Каждый образец супернатанта инкубировали параллельно в двух лунках. После инкубации с образцами лунки отмывали. В одну из лунок наносили 100 мкл мочевины (Sigma-Aldrich, США), разведенной в фосфатно-солевом буфере (PBS), на 30 минут при комнатной температуре, в другую лунку — тот же объем PBS. Индекс авидности рассчитывали по формуле: $(\text{OD (с мочевиной)} - \text{OD (фон)}) / (\text{OD (без мочевины)} - \text{OD (фон)})$.

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism версия 8.4.3 (США). Значимость различий между выборками оценивали с помощью критерия Вилкоксона. Различия сравниваемых параметров считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Данные на гистограммах показывают среднее значение и стандартное отклонение.

Результаты

Супернатанты, полученные от стимулированных В-лимфоцитов *in vitro* с помощью IL-21 и CD40L, тестировали на содержание анти-RBD IgG-антител методом ИФА. Только для 12% образцов (точка 1 и 2) был получен сигнал, превосходящий пороговый уровень детекции. На следующем этапе мы сконцентрировали супернатанты в 8 раз с помощью концентраторов Amicon Ultra. После концентрирования положительный сигнал детектировался в 82% образцов супернатантов.

Уровень анти-RBD IgG-антител до ревакцинации составил 0,87 и 0,98 у.е. в группах ре-

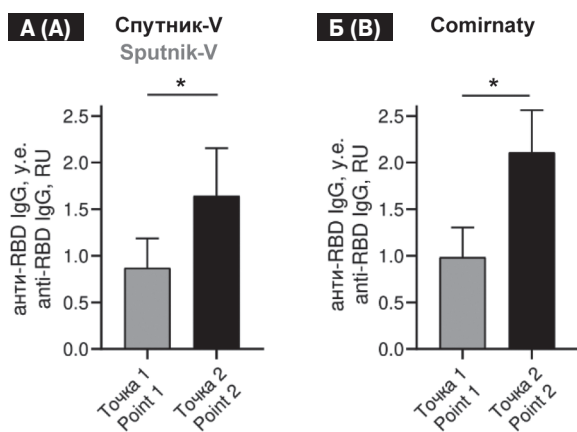


Рисунок 1. Увеличение уровня анти-RBD IgG-антител в супернатантах стимулированных В-лимфоцитов после ревакцинации

Figure 1. Increase in the level of anti-RBD IgG antibodies in the supernatants of stimulated B lymphocytes after revaccination

Примечание. А — уровень анти-RBD IgG-антител в супернатантах стимулированных В-лимфоцитов до (точка 1) и после (точка 2) ревакцинации Спутником V. Б — уровень анти-RBD IgG-антител в супернатантах стимулированных В-лимфоцитов до (точка 1) и после (точка 2) ревакцинации Comirnaty. Результаты представлены как среднее значение (в условных единицах, у.е.) + стандартное отклонение. * — $p < 0,05$ (тест Вилкоксона).

Note. A — level of anti-RBD IgG antibodies in the supernatants obtained from stimulated B-lymphocytes before (point 1) and after (point 2) revaccination with Sputnik V. B — level of anti-RBD IgG antibodies in the supernatants obtained from stimulated B-lymphocytes before (point 1) and after (point 2) revaccination with Comirnaty. Data are shown as mean (in relative units, RU) + SD. * — $p < 0.05$ (Wilcoxon test).

вакцинированных Спутником V и Comirnaty соответственно (рис. 1). Ревакцинация индуцировала увеличение количества анти-RBD IgG-антител в обеих группах доноров. Так, ревакцинация Спутником V индуцировала увеличение количества антител в 1,88 раз, а ревакцинация Comirnaty — в 2,14 раз.

Следующей задачей нашей работы было определение avidности антител, полученных от стимулированных *in vitro* В-лимфоцитов. Индекс avidности определяли методом ИФА в присутствии хаотропного агента — мочевины. На первом этапе необходимо было определить концентрацию мочевины, подходящую для наших образцов. На основе полученных данных о количестве анти-RBD IgG-антител было отобрано по 3 супернатанта с наибольшим и наименьшим содержанием антител. Каждый из 6 отобранных образцов инкубировали в восьми лунках. После инкубации с образцами к четырем лункам добавляли мочевины в концентрациях 3, 5, 7 или 9М, а к остальным четырем лункам — PBS. Были рассчитаны средние индексы avidности для каждой

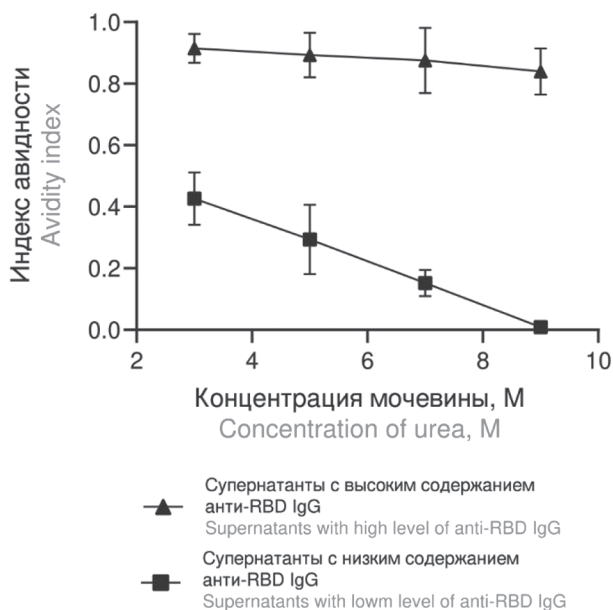


Рисунок 2. Изменение индекса avidности супернатантов в зависимости от концентрации мочевины

Figure 2. Change in avidity index of supernatants depending on urea concentration

Примечание. Данные представлены как среднее значение индекса avidности, полученное от трех супернатантов, ± стандартное отклонение.

Note. Data are shown as the mean of the avidity index obtained from triplicate supernatants ± SD.

концентрации мочевины. На рис. 2 показано, что с увеличением концентрации мочевины индекс avidности у супернатантов с низким содержанием специфических антител снижается (средние значения по 3-м образцам составляют 0,42, 0,29, 0,15, 0 для 3, 5, 7, 9М мочевины соответственно). Для образцов с высоким содержанием антител индекс avidности практически не меняется и составляет 0,91, 0,89, 0,88, 0,84 для 3, 5, 7, 9М мочевины соответственно. Таким образом, наибольшие отличия между образцами с высокой и низкой avidностью обнаруживаются при более высокой концентрации мочевины. Однако при использовании 9М мочевины в лунках с образцами с низким содержанием антител индекс avidности был близок или равен нулю, поэтому для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация мочевины 7М.

Интересно, что несмотря на увеличение количества анти-RBD IgG-антител в супернатантах после ревакцинации обеими вакцинами, не произошло статистически значимого изменения индекса avidности в обеих группах (рис. 3). Изменение этого показателя в группе ревакцинированных Спутником V составило 0,01 ед. (с 0,69 до 0,7), а в группе ревакцинированных Comirnaty — 0,1 ед. (с 0,74 до 0,84).

Обсуждение

Развитие защитного долговременного иммунного ответа при вакцинации от COVID-19 зависит от качества и продолжительности циркуляции антиген-специфических антител, а также от активации и созревания специфических В-клеток памяти. Качество антител характеризуется их аффинностью, способностью к нейтрализации антигена. Процессы созревания аффинности антител после многократной вакцинации остаются в значительной степени неизученными. К настоящему моменту показано, что перенесенная инфекция COVID-19 не в тяжелой форме, а также вакцинация приводят к увеличению авидности сывороточных антител [1, 8, 13]. Вероятно, это обусловлено, в первую очередь плазматическими клетками в костном мозге, которые обычно секретируют более аффинные антитела, чем активированные В-клетки памяти [6]. Ранее было показано, что после мРНК-вакцинации наибольшее увеличение соматических гипермутаций, приводящих к увеличению аффинности секретируемых антител, наблюдается в популяции долгоживущих плазматических клеток костного мозга [7]. Созревание В-клеток памяти и изменение аффинности секретируемых ими антител при стимуляции изучено в меньшей степени.

В настоящей работе было определено, как ревакцинация от Спутником V и Comirnaty влияет на аффинность антител, секретируемых В-клетками памяти. На первом этапе работы мы отметили, что количество антиген-специфических В-клеток памяти, циркулирующих в крови до и после ревакцинации, относительно невелико. Так, уровень RBD-специфических IgG-антител в большинстве образцов супернатантов от стимулированных В-клеток памяти удалось определить только после предварительного концентрирования образцов в 8 раз. Было показано, что после ревакцинации обеими вакцинами увеличивается количество антиген-специфических антител, секретируемых В-клетками памяти при стимуляции *in vitro*, что, по-видимому, связано с увеличением относительного количества этих клеток в общем пуле В-лимфоцитов. Несмотря на увеличение количества специфических антител, их авидность остается неизменной через месяц после ревакцинации Спутником V или Comirnaty.

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что уже после первой полной вакцинации Спутником V достигается максимальный

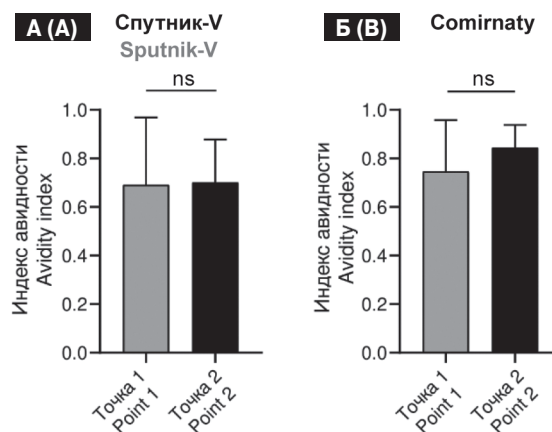


Рисунок 3. Индекс авидности RBD-специфических IgG-антител в супернатантах, полученных от стимулированных *in vitro* В-лимфоцитов

Figure 3. Avidity index of RBD-specific IgG antibodies in the supernatants of *in vitro* stimulated B lymphocytes after revaccination

Примечание. А — индекс авидности антител в супернатантах стимулированных В-лимфоцитов до (точка 1) и после (точка 2) ревакцинации Спутником V. Б — индекс авидности антител в супернатантах стимулированных В-лимфоцитов до (точка 1) и после (точка 2) ревакцинации Comirnaty. Результаты представлены как среднее значение + стандартное отклонение. ns — недостоверные отличия.

Note. A — Avidity index of RBD-specific IgG antibodies in the supernatants obtained from stimulated B-lymphocytes before (point 1) and after (point 2) revaccination with Sputnik V. B — Avidity index of RBD-specific IgG antibodies in the supernatants obtained from stimulated B-lymphocytes before (point 1) and after (point 2) revaccination with Comirnaty. Data are shown as mean + SD. ns — non-significant differences.

порог аффинности антител к RBD дикого типа, которые могут быть секретированы активированными В-клетками памяти. Кроме того, полученные результаты могут свидетельствовать о том, что процесс созревания аффинности происходит в течение более длительного времени, что согласуется с ранее опубликованными данными [3, 7].

Полученные нами данные вносят вклад в представление об эволюции антиген-специфических В-клеток памяти после повторной вакцинации от COVID-19 и могут быть полезными при выборе стратегии вакцинации.

Благодарности

Автор благодарит Филатова А.В. за содействие в работе.

Список литературы/References

1. Топтыгина А.П., Афридонова З.Э., Закиров Р.Ш., Семикина Е.Л. Поддержание иммунологической памяти к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 1. С. 55–66. [Toptygina A.P., Afridonova Z.E., Zakirov R.Sh., Semikina E.L. Maintaining immunological memory to the SARS-CoV-2 virus during COVID-19 pandemic. *Infectsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 55–66. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MIM-2009

2. Astakhova E.A., Byazrova M.G., Yusubaliev G.M., Kulemzin S.V., Kruglova N.A., Prilipov A.G., Baklaushev V.P., Gorchakov A.A., Taranin A.V., Filatov A.V. Functional Profiling of In Vitro Reactivated Memory B cells Following Natural SARS-CoV-2 Infection and Gam-COVID-Vac Vaccination. *Cells*, 2022, vol. 11, no. 13. doi: 10.3390/cells11131991
3. Cho A., Muecksch F., Schaefer-Babajew D., Wang Z., Finkin S., Gaebler C., Ramos V., Cipolla M., Mendoza P., Agudelo M., Bednarski E., DaSilva J., Shimelioovich I., Dizon J., Daga M., Millard K.G., Turroja M., Schmidt F., Zhang F., Tanfous T. Ben, Jankovic M., Oliveria T.Y., Gazumyan A., Caskey M., Bieniasz P.D., Hatziioannou T., Nussenzweig M.C. Anti-SARS-CoV-2 receptor-binding domain antibody evolution after mRNA vaccination. *Nature*, 2021, vol. 600, no. 7889, pp. 517–522. doi: 10.1038/s41586-021-04060-7
4. Gallais F., Gantner P., Bruel T., Velay A., Planas D., Wendling M.J., Bayer S., Solis M., Laugel E., Reix N., Schneider A., Glady L., Panaget B., Collongues N., Partisani M., Lessinger J.M., Fontanet A., Rey D., Hansmann Y., Kling-Pillitteri L., Schwartz O., De Sèze J., Meyer N., Gonzalez M., Schmidt-Mutter C., Fafi-Kremer S. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *EBioMedicine*, 2021, vol. 71: 103561. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103561
5. Goel R.R., Painter M.M., Apostolidis S.A., Mathew D., Meng W., Rosenfeld A.M., Lundgreen K.A., Reynaldi A., Khoury D.S., Pattekar A., Gouma S., Kuri-Cervantes L., Hicks P., Dysinger S., Hicks A., Sharma H., Herring S., Korte S., Baxter A.E., Oldridge D.A., Giles J.R., Weirick M.E., McAllister C.M., Awofolaju M., Tanenbaum N., Drapeau E.M., Dougherty J., Long S., D'Andrea K., Hamilton J.T., McLaughlin M., Williams J.C., Adamski S., Kuthuru O.; UPenn COVID Processing Unit; Frank I., Betts M.R., Vella L.A., Grifoni A., Weiskopf D., Sette A., Hensley S.E., Davenport M.P., Bates P., Luning Prak E.T., Greenplate A.R., Wherry E.J. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science*, 2021, vol. 374, no. 6572: abm0829. doi: 10.1126/science.abm0829
6. Inoue T., Kurosaki T. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2024, vol. 24, no. 1, pp. 5–17. doi: 10.1038/s41577-023-00897-3
7. Kim W., Zhou J.Q., Horvath S.C., Schmitz A.J., Sturtz A.J., Lei T., Liu Z., Kalaidina E., Thapa M., Alsoussi W.B., Haile A., Klebert M.K., Suessen T., Parra-Rodriguez L., Mudd P.A., Whelan S.P.J., Middleton W.D., Teefey S.A., Pusic I., O'Halloran J.A., Presti R.M., Turner J.S., Ellebedy A.H. Germinal centre-driven maturation of B cell response to mRNA vaccination. *Nature*, 2022, vol. 604, no. 7904, pp. 141–145. doi: 10.1038/s41586-022-04527-1
8. Nakagama Y., Candray K., Kaku N., Komase Y., Rodriguez-Funes M.V., Dominguez R., Tsuchida T., Kunishima H., Nagai E., Adachi E., Ngoyi D.M., Yamasue M., Komiya K., Hiramatsu K., Uemura N., Sugiura Y., Yasugi M., Yamagishi Y., Mikamo H., Shiraishi S., Izumo T., Nakagama S., Watanabe C., Nitahara Y., Tshibangu-Kabamba E., Kakeya H., Kido Y. Antibody Avidity Maturation Following Recovery From Infection or the Booster Vaccination Grants Breadth of SARS-CoV-2 Neutralizing Capacity. *J. Infect. Dis.*, 2023, vol. 227, no. 6, pp. 780–787. doi: 10.1093/infdis/jiac492
9. Pušnik J., König J., Mai K., Richter E., Zorn J., Proksch H., Schulte B., Alter G., Streeck H. Persistent Maintenance of Atypical Memory B cells Following SARS-CoV-2 Infection and Vaccination Recall Response. *J. Virology*, 2022, vol. 96, no. 15: e00760-22. doi: 10.2139/ssrn.4072040
10. Röltgen K., Boyd S.D. Antibody and B cell responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell. Host Microbe*, 2021, vol. 29, no. 7, pp. 1063–1075. doi: 10.1016/j.chom.2021.06.009
11. Sette A., Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 2021, vol. 184, no. 4, pp. 861–880. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.007
12. Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines. *Immunol. Rev.*, 2022, vol. 310, no. 1, pp. 27–46. doi: 10.1111/imr.13089
13. Singh G., Abbad A., Tcheou J., Mendu D.R., Firpo-Betancourt A., Gleason C., Srivastava K., Cordon-Cardo C., Simon V., Krammer F., Carreño J.M. Binding and Avidity Signatures of Polyclonal Sera From Individuals With Different Exposure Histories to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection, Vaccination, and Omicron Breakthrough Infections. *J. Infect. Dis.*, 2023, vol. 228, no. 5, pp. 564–575. doi: 10.1093/infdis/jiad116
14. Sokal A., Chappert P., Barba-Spaeth G., Roesser A., Fourati S., Azzaoui I., Vandenberghe A., Fernandez I., Meola A., Bouvier-Alias M., Crickx E., Beldi-Ferchiou A., Hue S., Languille L., Michel M., Baloul S., Noizat-Pirenne F., Luka M., Mégret J., Ménager M., Pawlotsky J.M., Fillatreau S., Rey F.A., Weill J.C., Reynaud C.A., Mahévas M. Maturation and persistence of the anti-SARS-CoV-2 memory B cell response. *Cell*, 2021, vol. 184, no. 5, pp. 1201–1213.e14. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.050
15. Turner J.S., Kim W., Kalaidina E., Goss C.W., Rauseo A.M., Schmitz A.J., Hansen L., Haile A., Klebert M.K., Pusic I., O'Halloran J.A., Presti R.M., Ellebedy A.H. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature*, 2021, vol. 595, no. 7867, pp. 421–425. doi: 10.1038/s41586-021-03647-4

Автор:

Астахова Е.А., младший научный сотрудник ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия; аспирант кафедры иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

Author:

Astakhova E.A., Junior Researcher, National Research Center Institute of Immunology, Moscow, Russian Federation; PhD Student, Department of Immunology, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.04.2024
Принята к печати 05.04.2024

Received 04.04.2024
Accepted 05.04.2024

ПЛАЗМАБЛАСТНЫЙ ОТВЕТ ПРИ ОСТРОЙ SARS-CoV-2-ИНФЕКЦИИ

М.Г. Бязрова^{1,2}, М.М. Сухова^{1,3}, А.А. Михайлов^{1,3}, А.Ф. Романова³,
Г.М. Юсубалиева⁴, А.В. Филатов^{1,3}

¹ ФГБУН ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, Москва, Россия

Резюме. Плазмбласты представляют собой популяцию коротко живущих В-клеток, которые появляются в циркуляции вскоре после вакцинации и в процессе острой инфекции. Плазмбласты образуются из покоящихся В-лимфоцитов, от которых они отличаются способностью секретировать антитела, что делает их похожими на плазматические клетки. От последних они отличаются экспрессией на своей поверхности BCR рецептора. Плазмбластный ответ является показателем успешности вакцинации, а также помогает в прогнозировании уровня антител после выздоровления или вакцинации. Однако определение и классификация плазмбластов сталкивается с большими экспериментальными и теоретическими трудностями. Целью работы являлось определение особенностей плазмбластного ответа при острой SARS-CoV-2-инфекции. В исследование были включены пациенты (n = 28), характеризовавшиеся тяжелой формой COVID-19. Забор крови для исследования проводили однократно на 10–18-е сутки с момента госпитализации. В-клетки выделяли методом иммуномагнитной сепарации. Клетки фенотипировали с помощью проточной цитометрии. Секретию IgM и IgG определяли методом ELISpot. Субпопуляции В-клеток выделяли с помощью проточного сортировщика. У пациентов с COVID-19 по сравнению со здоровыми донорами наблюдалось примерно четырехкратное повышение уровня общих плазмбластов. Еще более выраженное превышение над отрицательным контролем наблюдалось для RBD-специфичных плазмбластов. К этому времени количество RBD-специфичных В-клеток памяти оставалось невысоким. Это свидетельствует том, что на ранней стадии COVID-19 В-клетки памяти еще не успевают сформироваться и гуморальный иммунитет обеспечивался исключительно плазмбластами. По своему составу плазмбласты на треть являлись IgM⁺ клетками. Доля плазмбластов с поверхностным IgG почти в 7 раз была ниже. Такое распределение между изотипами В-клеточных рецепторов BCR соответствовало первичному характеру иммунного ответа при COVID-19. Примерно треть плазмбластов не сла антиген CD138, при этом у 4-х пациентов доля CD138⁺ клеток была выше 50%. Следует отметить, что маркер CD138 характерен для поздней стадии созревания плазмбластов и который также встречается на плазматических клетках. Популяция CD27⁺CD38⁺ была разделена по экспрессии антигена CD138. Методом ELISpot нами было показано, что значительная часть циркулирующих плазмбластов являются антителосекретирующими клетками. Таким образом нами было показано, что при инфекции SARS-CoV-2 формируется выраженный плазмбластный ответ. Среди циркулирующих плазмбластов можно выделить как ранние, так и более

Адрес для переписки:

Бязрова Мария Георгиевна
115522, Россия, Москва, Каширское ш., 24,
ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА.
Тел.: 8 (495) 177-77-65.
E-mail: mbyazrova@list.ru

Contacts:

Maria G. Byazrova
115522, Russian Federation, Moscow, Kashirskoye sh., 24,
National Research Center — Institute of Immunology.
Phone: +7 (495) 177-77-65.
E-mail: mbyazrova@list.ru

Для цитирования:

Бязрова М.Г., Сухова М.М., Михайлов А.А., Романова А.Ф.,
Юсубалиева Г.М., Филатов А.В. Плазмбластный ответ при острой
SARS-CoV-2-инфекции // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3.
С. 471–475. doi: 10.15789/2220-7619-PRD-16670

Citation:

Byazrova M.G., Sukhova M.M., Mikhailov A.A., Romanova A.F.,
Yusubaliev G.M., Filatov A.V. Plasmablast response during acute SARS-
CoV-2 infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 471–475. doi: 10.15789/2220-7619-
PRD-16670

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00486).

The study was financially supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-25-00486).

© Бязрова М.Г. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-PRD-16670>

поздние плазмабласты, которые характеризуются отсутствием поверхностного BCR, но которые несут антиген CD138. Определение того, как плазмабласты соотносятся с другими В-клеточными популяциями имеет первостепенное значение для разработки новых методов лечения COVID-19 и для создания перспективных вакцин против SARS-CoV-2-инфекции.

Ключевые слова: *наивные В-клетки, В-клетки памяти, плазматические клетки, плазмабласты, антителосекретирующие клетки, SARS-CoV-2.*

PLASMABLAST RESPONSE DURING ACUTE SARS-CoV-2 INFECTION

Byazrova M.G.^{a,b}, Sukhova M.M.^{a,c}, Mikhailov A.A.^{a,c}, Romanova A.F.^c, Yusubaliyeva G.M.^d, Filatov A.V.^{a,c}

^a National Research Center — Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

^b Peoples' Friendship University of Russia of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^c Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^d Federal Research and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Abstract. Plasmablasts are a population of short-lived B cells that appear in the circulation shortly after vaccination and during acute infection. Plasmablasts are formed from resting B lymphocytes, from which they differ in their ability to secrete antibodies, making them similar to plasma cells. Plasmablasts are terminally differentiated cells that can form at various nodes and branches of the B cell response. The plasmablast response is an indicator of the success of vaccination and also helps in predicting antibody levels after recovery or vaccination. However, the definition and classification of plasmablasts faces great experimental and theoretical difficulties. The aim of the work was to determine the characteristics of the plasmablast response during acute SARS-CoV-2 infection. The study included patients (n = 28) with a severe form of COVID-19. Blood sampling was carried out once on the 10–18th day from the moment of hospitalization. B cells were isolated by immunomagnetic separation. Cells were phenotyped using flow cytometry. Secretion of IgM and IgG was determined by ELISpot method. B cell subsets were isolated using a cell sorter. Patients with COVID-19 had an approximately fourfold increase in total plasmablast levels compared to healthy donors. An even more pronounced excess over the negative control was observed for RBD-specific plasmablasts. In terms of their composition, plasmablasts were one third IgM⁺ cells. This distribution between B-cell BCR receptor isotypes was consistent with the primary nature of the immune response in COVID-19. Approximately a third of plasmablasts carried the CD138 antigen. CD138 marker is characteristic of the late stage of plasmablast maturation and is also found on plasma cells. The CD27⁺CD38⁺ population was divided according to the expression of the CD138 antigen. Using the ELISpot method, we have shown that a significant portion of circulating plasmablasts are antibody-secreting cells. Among circulating plasmablasts, both early and late plasmablasts can be distinguished, which are characterized by the absence of a surface BCR, but which carry the CD138 antigen. Determining how plasmablasts relate to other B cell populations is of paramount importance for the development of new treatments for COVID-19 and for the creation of promising vaccines against SARS-CoV-2 infection.

Key words: *naive B cells, memory B cells, plasma cells, plasma blasts, antibody secreting cells, SARS-CoV-2.*

Введение

Плазмабласты представляют собой популяцию коротко живущих В-клеток, которые появляются в циркуляции вскоре после вакцинации и в процессе острой инфекции. Плазмабласты образуются из покоящихся В-лимфоцитов, от которых они отличаются способностью секретировать антитела, что делает их похожими на плазматические клетки. От последних они отличаются поверхностной экспрессией BCR рецептора. В отличие от наивных и коммитированных В-клеток, а также плазматических клеток, плазмабласты способны пролиферировать. Плазмабласты представляют собой терминально дифференцированные клетки, которые могут образовываться в различных точках и ветвях В-клеточного ответа [9]. В частности, плазмабласты могут генерироваться как при

фолликулярном, так и экстрафолликулярном пути активации [10]. Плазмабластный ответ является показателем успешности вакцинации, а также помогает в прогнозировании уровня антител после выздоровления или вакцинации [2]. Однако определение и классификация плазмабластов сталкивается с большими экспериментальными и теоретическими трудностями [8]. При острой инфекции SARS-CoV-2 зачастую наблюдается образование большого количества плазмабластов [2], таким образом COVID-19 может являться удобным объектом для изучения плазмабластного ответа.

Материалы и методы

В исследование были включены пациенты (n = 28), получавшие стационарное лечение в ФНКЦ ФМБА России. Всем пациентам был

поставлен диагноз COVID-19 на основании данных ПЦР-анализа. На момент обследования все пациенты находились в реанимационном отделении и характеризовались тяжелой формой COVID-19. Клиническое исследование выполнено в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека». Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был рассмотрен и одобрен Этическим комитетом ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (протокол № 12-1, 29 декабря 2020 г.). Пациенты были в возрасте от 19 до 65 лет (медиана — 45 лет), из них 15 мужчин (53,6%) и 13 женщин (46,4%). В группу сравнения были включены соотносимые по возрасту здоровые доноры ($n = 12$). Забор крови для исследования проводили однократно на 10–18-е сутки с момента госпитализации.

Для окрашивания лимфоцитов использовали антитела CD19-FITC, CD27-PECy5.5, CD38-PECy7, CD138-APC, анти-IgG-FITC, анти-IgM-FITC, а также белок RBD-PE. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Клетки сортировали на проточном сортировщике SH800S (Sony Biotechnology, США). ELISpot проводили как описано ранее [1].

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием программы GraphPad Prism. Значимость различий между выборками оценивали с помощью критерия Манна–Уитни и критерия Уилкоксона.

Различия сравниваемых параметров считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Экспериментальные данные на графиках представляли в виде медианы (столбы) и межквартильного размаха (25-й и 75-й перцентили; усы).

Результаты и обсуждение

Одним из самых ранних проявлений В-клеточного ответа является появление циркулирующих тотальных и антигенспецифических плазмабластов [4]. Мы определяли плазмабласты как CD19⁺ клетки с высокой экспрессией антигенов CD27 и CD38. У здоровых доноров регистрировалось небольшое количество плазмабластов (медиана 1,42%, межквартильный размах от 0,58 до 1,97%). Этот уровень плазмабластов может объясняться фоновой активацией В-лимфоцитов неопределенным кругом антигенов. У пациентов с COVID-19 наблюдалось примерно четырехкратное повышение уровня плазмабластов (медиана 4,03; межквартильный размах от 2,91 до 6,99%; $p < 0,0001$) (рис. 1А). Еще более выраженное превышение над от-

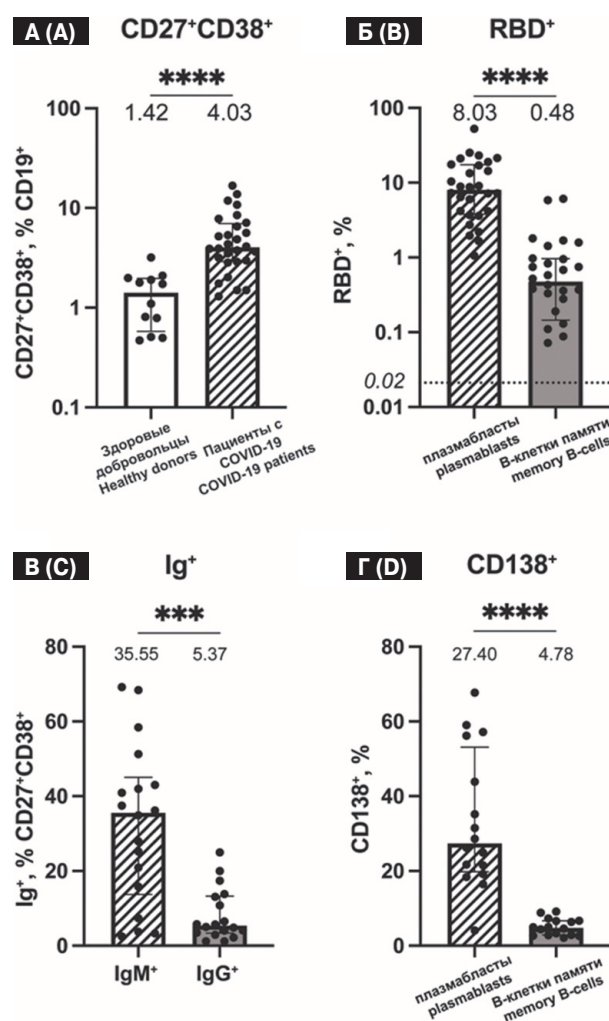


Рисунок 1. Показатели плазмабластного ответа у пациентов страдающих COVID-19

Figure 1. Indicators of plasmablast response in patients with COVID-19

Примечание. А — Доля общих плазмабластов (CD27⁺CD38⁺) в популяции CD19⁺ клеток (справа).

Для сравнения приведены данные из группы здоровых доноров (слева). Б — доля RBD-специфических В-клеток в популяциях плазмабластов (слева) и В-клеток памяти (справа). Пунктирной линией обозначен базовый уровень у здоровых доноров. В — доля клеток, экспрессирующих поверхностный IgM (слева) или IgG (справа), в популяции плазмабластов. Г — доля CD138⁺ клеток в популяциях плазмабластов (слева) и В-клеток памяти (справа). Цифрами указаны медианы% позитивных клеток.

*** — $p < 0,001$, **** — $p < 0,0001$.

Note. A — Proportion of total plasmablasts (CD27⁺CD38⁺) in the population of CD19⁺ cells. For comparison, data from a group of healthy donors are presented. B — proportion of RBD-specific B cells in the populations of plasmablasts (left) and memory B cells (right). The dotted line indicates the baseline level in healthy donors. C — proportion of cells expressing surface IgM (left) or IgG (right) in the plasmablast population. D — proportion of CD138⁺ cells in the populations of plasmablasts (left) and memory B cells (right). The numbers indicate the median% of positive cells. *** — $p < 0.001$, **** — $p < 0.0001$.

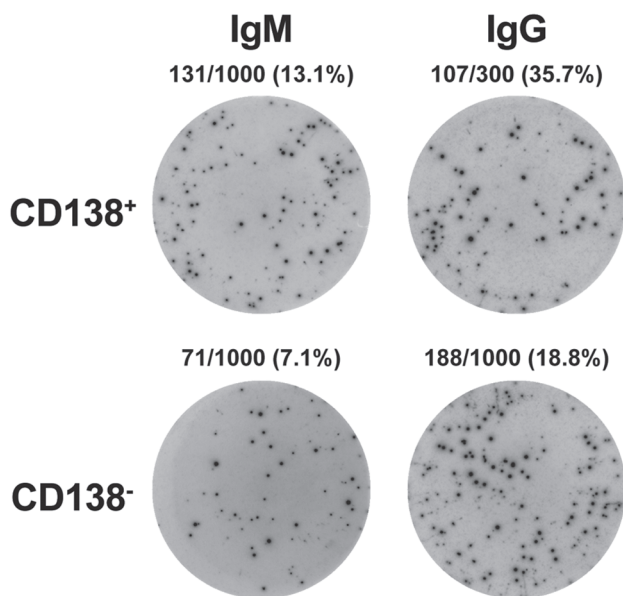


Рисунок 2. Репрезентативный ELISpot, показывающий клетки, секретирующие антитела IgM (слева) или IgG (справа), в популяциях CD138⁺ (верхний ряд) и CD138⁻ (нижний ряд) плазмобластов.

Figure 2. Representative ELISpot showing cells secreting IgM (left) or IgG antibodies (right) in the CD138⁺ (top row) and CD138⁻ (bottom row) plasmablast populations.

Примечание. Цифры, указанные над лунками, указывают количество положительных клеток, общее количество клеток в лунке и процент положительных клеток.

Note. The numbers above the wells indicate the number of positive cells, the total number of cells in the well, and the percentage of positive cells.

рицательным контролем наблюдалось для RBD-специфичных плазмобластов (медиана 8,03; межквартильный размах от 3,81 до 17,38%) (рис. 1Б). При этом доля RBD-специфичных лимфоцитов среди В-клеток памяти находилась на уровне 0,48% (межквартильный размах от 0,15 до 0,97%), что немного превышало базовый уровень у здоровых доноров (0,2%). Это свидетельствует том, что к моменту забора крови (10–18 дни) антигенспецифические В-клетки памяти еще не сформировались и плазмобласты представляли единственный тип В-клеток, которые обеспечивали гуморальный иммунитет у пациентов в острой фазе SARS-CoV-2-инфекции. По своему составу плазмобласты в основном являлись IgM⁺ клетками (медиана 35,55; межквартильный размах от 13,68 до 45,08%). Доля плазмобластов с поверхностным IgG была значительно ниже (медиана 5,37; межквартильный размах от 3,33 до 13,28%; $p < 0,0001$). Такое распределение между изотипами В-клеточных рецепторов BCR соответствует первичному характеру иммунного ответа при COVID-19. Обращает на себя внимание, что сумма долей

IgM⁺ и IgG⁺ клеток равнялось примерно 40%. Ограничением нашего исследования являлось то, что мы не учитывали долю IgA⁺ клеток, однако даже с учетом этих клеток суммарная доля Ig⁺ клеток будет заметно ниже 100%. Мы предполагаем, что в популяции плазмобластов присутствуют как более ранние (sIg⁺), так и более поздние (sIg⁻) клетки. Для того чтобы оценить долю более поздних плазмобластов мы определили количество CD138⁺ клеток. Действительно довольно значительная часть плазмобластов (медиана 27,40; межквартильный размах от 19,78 до 53,13%; рис. 1Г) несла этот маркер поздней стадии созревания плазмобластов, который более характерен для плазматических клеток. При этом следует отметить, что у 4-х пациентов доля CD138⁺ клеток была выше 40%. Среди В-клеток памяти доля CD138⁺ клеток не превышала 5%, что соответствовало порогу детекции этого параметра. Таким образом вполне вероятно, что среди циркулирующих плазмобластов заметную долю составляют поздние плазмобласты, которые характеризуются отсутствием поверхностного BCR, но которые несут антиген CD138. В нескольких случаях популяция CD27⁺CD38⁺ была разделена по экспрессии антигена CD138. На рис. 2А представлены репрезентативные ELISpot данные, которые показывают клетки, секретирующие антитела IgM (слева) или IgG (справа) в популяциях CD138⁺ и CD138⁻ плазмобластов. Судя по полученным данным, заметная доля как среди ранних, так и более поздних плазмобластов являлись антителосекретирующими клетками.

Плазмобласты являются популяцией В-лимфоцитов, которая сочетает в себе функциональные активности, характерные для оппозитных популяций В-лимфоцитов. В силу этого обстоятельства классификация плазмобластов и их позиционирование в общей схеме В-клеточного ответа сталкивается со значительными трудностями. Распространенным мнением является то, что плазмобласты представляют собой терминально дифференцированные клетки и, что они не превращаются ни в В-клетки памяти, ни плазматические клетки [6]. Однако в некоторых случаях, например, при инфекции малярийного плазмодия, было показано, что плазмобласты могут образовываться из В-клеток памяти [7] или быть предшественниками плазматических клеток [5].

В настоящей работе показано, что при SARS-CoV-2-инфекции, протекающей в тяжелой форме, развивается выраженный плазмобластный ответ. Циркулирующие плазмобласты характеризуются экспрессией поверхностных IgM и IgG и секрецией соответствующих антител. Среди плазмобластов можно выделить как ранние, так и более поздние популяции.

Плазмабласты, В-клетки герминативных центров, В-клетки памяти и плазматические клетки представляют собой различные ветви и стадии В-клеточного иммунитета. Определение того, как

эти популяции взаимодействуют между собой, имеет первостепенное значение для разработки методов лечения COVID-19 и для создания перспективных вакцин против SARS-CoV-2-инфекции.

Список литературы/References

1. Бязрова М.Г., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Васильева Ю.В., Прилипов А.Г., Филатов А.В. Стимуляция В-лимфоцитов человека *in vitro* с помощью ИЛ-21/CD40L и их характеристика // Иммунология. 2020. Т. 41, № 1. С. 18–27. [Byazrova M.G., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., Vasileva Yu.V., Prilipov A.G., Filatov A.V. IL-21/CD40L stimulation of human B-lymphocytes *in vitro* and their characteristics. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, vol. 41, no. 1, pp. 18–27. (In Russ.)] doi: 10.33029/0206-4952-2020-41-6-00-00
2. Appanna R., Kg S., Xu M.H., Toh Y.X., Velumani S., Carbajo D., Lee C.Y., Zuest R., Balakrishnan T., Xu W., Lee B., Poidinger M., Zolezzi F., Leo Y.S., Thein T.L., Wang C.I., Fink K. Plasmablasts during acute Dengue infection represent a small subset of a broader virus-specific memory B cell pool. *EBioMedicine*, 2016, vol. 12, pp. 178–188. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.09.003
3. Byazrova M., Yusubaliyeva G., Spiridonova A., Efimov G., Mazurov D., Baranov K., Baklaushev V., Filatov A. Pattern of circulating SARS-CoV-2-specific antibody-secreting and memory B-cell generation in patients with acute COVID-19. *Clin. Transl. Immunology*, 2021, vol. 10, no. 2: e1245. doi: 10.1002/cti2.1245
4. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., Agyekum R.S., Mathew D., Baxter A.E., Vella L.A., Kuthuru O., Apostolidis S.A., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A.R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M.E., Arevalo C.P., Bolton M.J., Goodwin E.C., Anderson E.M., Hensley S.E., Jones T.K., Mangalmurti N.S., Luning Prak E.T., Wherry E.J., Meyer N.J., Betts M.R. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.*, 2020, vol. 5, no. 49: eabd7114. doi: 10.1126/sciimmunol.abd7114
5. Papillion A.M., Kenderes K.J., Yates J.L., Winslow G.M. Early derivation of IgM memory cells and bone marrow plasmablasts. *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 6: e0178853. doi: 10.1371/journal.pone.0178853
6. Pracht K., Meininger J., Daum P., Schulz S.R., Reimer D., Hauke M., Roth E., Mielenz D., Berek C., Côte-Real J., Jäck H.M., Schuh W. A new staining protocol for detection of murine antibody-secreting plasma cell subsets by flow cytometry. *Eur. J. Immunol.*, 2017, vol. 47, no. 8, pp. 1389–1392. doi: 10.1002/eji.201747019
7. Rodda L.B., Pepper M. Metabolic constraints on the B cell response to malaria. *Nat. Immunol.*, 2020, vol. 21, no. 7, pp. 722–724. doi: 10.1038/s41590-020-0718-1
8. Sanz I., Wei C., Jenks S.A., Cashman K.S., Tipton C., Woodruff M.C., Hom J., Lee F.E. Challenges and opportunities for consistent classification of human B cell and plasma cell populations. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10: 2458. doi: 10.3389/fimmu.2019.02458
9. Shlomchik M.J., Weisel F. B cell primary immune responses. *Immunol. Rev.*, 2019, vol. 288, no. 1, pp. 5–9. doi: 10.1111/immr.12756
10. Woodruff M.C., Ramonell R.P., Nguyen D.C., Cashman K.S., Saini A.S., Haddad N.S., Ley A.M., Kyu S., Howell J.C., Ozturk T., Lee S., Suryadevara N., Case J.B., Bugrovsky R., Chen W., Estrada J., Morrison-Porter A., Derrico A., Anam F.A., Sharma M., Wu H.M., Le S.N., Jenks S.A., Tipton C.M., Staitieh B., Daiss J.L., Ghosn E., Diamond M.S., Carnahan R.H., Crowe J.E. Jr., Hu W.T., Lee F.E., Sanz I. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat. Immunol.*, 2020, vol. 21, no. 12, pp. 1506–1516. doi: 10.1038/s41590-020-00814-z

Авторы:

Бязрова М.Г., научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия; ассистент кафедры иммунология ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы (РУДН), Москва, Россия;

Сухова М.М., младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия; аспирант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Михайлов А.А., лаборант лаборатории иммунохимии ФГБУН ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия; студент кафедры иммунология ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Романова А.Ф., младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия;

Юсубалиева Г.М., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, Москва, Россия;

Филатов А.В., профессор, д.б.н., зав. лабораторией иммунохимии, ФГБУН «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА, Москва, Россия.

Authors:

Byazrova M.G., Researcher, Laboratory of Immunochemistry, NRC "Institute of Immunology" FMBA, Moscow, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Immunology, RUDN University, Moscow, Russian Federation;

Sukhova M.M., Junior Researcher, Laboratory of Immunochemistry, NRC "Institute of Immunology" FMBA, Moscow, Russian Federation; PhD Student, Department of Immunology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

Mikhailov A.A., Laboratory Assistant, Laboratory of Immunochemistry, NRC "Institute of Immunology" FMBA, Moscow, Russian Federation; Student, Department of Immunology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

Romanova A.F., Junior Researcher, Laboratory of Immunochemistry, NRC "Institute of Immunology" FMBA, Moscow, Russian Federation;

Yusubaliyeva G.M., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, Federal Scientific and Clinical Center FMBA, Moscow, Russian Federation;

Filatov A.V., DSc (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Immunochemistry, NRC "Institute of Immunology" FMBA, Moscow, Russian Federation.

ПОСТКОВИДНЫЙ СИНДРОМ: К ДИСКУССИИ О СРОКАХ НАСТУПЛЕНИЯ

О.В. Бердюгина

ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. *Введение.* Постковидный синдром (альтернативно: post-COVID-19 syndrome, chronic COVID syndrome, post-acute sequelae of COVID-19, long-haul COVID, long COVID, PASC, CCS) — состояние постоянного или перманентного наличия симптомов патологического процесса после COVID-19. В настоящее время нет единого мнения относительно сроков отсчета начала постковидного синдрома. Целью данного исследования стал анализ появления некоторых постковидных симптомов через 1, 2 и 3 месяца после инфицирования вирусом SARS-CoV-2. *Материалы и методы.* Произведен анализ клинико-лабораторных данных 59 медицинских работников, переболевших легкой или среднетяжелой формой COVID-19. Сформированы три группы: с оценкой постковидных изменений через 1 месяц после начала болезни (группа № 1), с выявлением изменений через 2 месяца (группа № 2), с детекцией нарушений через 3 месяца (группа № 3). Полученные результаты проанализировали с использованием программы STATISTICA v.12.5.192.5. *Результаты и обсуждение.* Установлено, что 57,7% респондентов в первый месяц наблюдения жаловались на утомляемость, слабость, нарушение сна, через 2 месяца частота жалоб снижалась на 42,3%, к 3 месяцам вновь увеличивалась на 15,6%. Оценка влияния болезни на возможность выполнять привычную работу показала снижение трудоспособности через 1, 2 и 3 месяца после инфекции. Через месяц после COVID-19 было зафиксировано несколько случаев, когда сотрудники были не в состоянии выполнять никакую, даже очень легкую, работу, однако к 3 месяцам наблюдения 96,2% обследованных заявили о полном восстановлении работоспособности. Изучение случаев обострения хронических заболеваний, как проявление постковидного синдрома, показало рост числа обращений к 3 месяцу в 2,4 раза. О появлении мышечных, суставных, позвоночных болей заявляли чаще в первый месяц после COVID-19, далее число жалоб снижалось вдвое до 23–25% от общего количества наблюдений. Оценка тяжести перенесенной инфекции среди респондентов трех групп не выявила достоверных отличий между данными в 1, 2 и 3 месяца после COVID-19. *Заключение.* Анализ некоторых постковидных симптомов показал, что при легком и среднетяжелом течении COVID-19 проявления наблюдаются через 1, 2 и 3 месяца после инфицирования вирусом SARS-CoV-2. Выявлена разнонаправленная динамика изменений, чаще сопровождающаяся снижением проявления постковидного синдрома через 2 месяца после коронавирусной инфекции, что может создавать ложное представление об отсутствии признаков post-COVID-19 syndrome в этот период.

Ключевые слова: постковидный синдром, сроки возникновения, новые заболевания, обострение хронических заболеваний, утомляемость, артралгия, тяжесть течения COVID-19.

Адрес для переписки:

Бердюгина Ольга Викторовна
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106,
ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН.
Тел.: 8 (904) 988-43-82.
E-mail: berolga73@rambler.ru

Contacts:

Olga V. Berdiugina
620049, Russian Federation, Ekaterinburg, Pervomayskaya str., 106,
Institute of Immunology and Physiology UrB RAS.
Phone: +7 (904) 988-43-82.
E-mail: berolga73@rambler.ru

Для цитирования:

Бердюгина О.В. Постковидный синдром: к дискуссии о сроках наступления // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 476–482.
doi: 10.15789/2220-7619-PCS-16766

Citation:

Berdiugina O.V. Post-COVID-19 syndrome: a discussion of onset timing // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 476–482. doi: 10.15789/2220-7619-PCS-16766

Работа выполнена по теме Государственного задания НИР ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН № Гос. регистрации 122020900136-4, руководитель — академик РАН А.В. Черешнев.

The work was carried out under the State Research Assignment of "Institute of Immunology and Physiology" of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, State Registration No. 122020900136-4, Head — RAS Full Member A.V. Chereshev.

POST-COVID-19 SYNDROME: A DISCUSSION OF ONSET TIMING

Berdiugina O.V.

Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Post-COVID syndrome (alternatively: chronic COVID syndrome, post-acute sequelae of COVID-19, long-haul COVID, long COVID, PASC, CCS) is a state of permanent or permanent presence of symptoms of a pathological process after COVID-19. Currently, there is no consensus on the timing of the onset of post-COVID-19 syndrome. The purpose of this study was to analyze the appearance of some post-COVID symptoms 1, 2 and 3 months after infection with the SARS-CoV-2 virus. *Materials and methods.* The analysis of clinical and laboratory data of 59 medical workers who had a mild or moderate form of COVID-19 was carried out. Three groups were formed: with the assessment of post-COVID-19 changes 1 month after the onset of the disease; with the detection of changes after 2 months; and with the detection of dysfunctions after 3 months. *Results and discussion.* It was found that 57.7% of respondents complained of fatigue, weakness, sleep disorders in the first month of observation. After 2 months, the frequency of complaints decreased by 42.3%, and by 3 months it increased again by 15.6%. A month after COVID-19, several cases were recorded when employees were unable to perform any, even very light, work. However, by 3 months of follow-up, 96.2% of the surveyed declared full recovery of efficiency. The appearance of muscle, joint, and spinal pain was reported more often in the first month after COVID-19, then the number of complaints decreased by half to 23–25% of the total number of observations. The assessment of the severity of the infection among the respondents of the three groups did not reveal significant differences between the data in 1, 2 and 3 months after COVID-19. *Conclusion.* An analysis of some post-COVID symptoms showed that in mild and moderate COVID-19, manifestations are observed 1, 2 and 3 months after infection with the SARS-CoV-2 virus. Multidirectional change dynamics were revealed, more often accompanied by a decrease in the manifestation of post-COVID syndrome 2 months after coronavirus infection, which may create a false impression of an absence of signs of post-COVID syndrome during this period.

Key words: *post-COVID-19 syndrome, timing of occurrence, new diseases, exacerbation of chronic diseases, fatigue, arthralgia, severity of COVID-19.*

Введение

Постковидный синдром (альтернативно: post-COVID-19 syndrome, chronic COVID syndrome, post-acute sequelae of COVID-19, long-haul COVID, long COVID, PASC, CCS) — состояние постоянного или перманентного наличия симптомов патологического процесса вслед за перенесенной инфекцией, вызванной возбудителем SARS-CoV-2. Наиболее часто ассоциируется с нарушением деятельности сердечно-сосудистой (тахикардия, учащение гипертонических кризов), дыхательной (бронхоспазм, чувство нехватки воздуха), нервной (мигрень, бессонница, депрессивное состояние, панические атаки, синдром хронической усталости, длительная anosmia и дисгевзия, когнитивные и ортостатические нарушения), костной (артралгия), мышечной (миалгия), пищеварительной (диарея, нарушение перистальтики кишечника), покровной (алопеция), выделительной (отеки, воспалительные заболевания), иммунной (длительные, частые вирусные инфекции) систем [3, 7, 10].

В настоящее время нет единого мнения относительно сроков, в которые может быть зафиксировано начало постковидного синдрома. В большинстве случаев авторы полагают, что post-COVID-19 syndrome диагностируется через 2–3 месяца после болезни, ассоциируясь с наличием клинических проявлений [6].

Национальный институт здравоохранения и передового ухода (National Institute for Health

and Care Excellence, NICE, Великобритания) связывает этот момент с «присутствием признаков и симптомов, развивающихся во время или после инфекции COVID-19, сохраняющихся более 4 недель и не имеющих объяснения наличием каких-либо других диагнозов» [3, 5].

В связи с неоднозначным мнением относительно сроков наступления постковидного синдрома, целью данного исследования стал анализ появления некоторых постковидных симптомов через 1, 2 и 3 месяца после инфицирования вирусом SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Проанализированы клиничко-лабораторные данные, отражающие состояние медицинских работников Государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Детская городская клиническая больница № 9» (ГАУЗ СО «ДГКБ № 9», г. Екатеринбург), добровольно присоединившихся к участию в имперсональном научном исследовании, подписав форму информированного согласия [1]. Локальный этический комитет медицинского учреждения, основываясь на принципах Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации и ее последующих редакциях, документах Организации Объединенных Наций, касающихся прав пациента, положениях Приказа МЗ РФ № 266 от 19.06.2003 «Об утверждении Правил клинической практики

в Российской Федерации» одобрил исследование в котором жизнь и здоровье респондентов не подвергались опасности.

Данные аккумулированы с октября по декабрь 2020 г. в период циркуляции дельта-варианта вируса SARS-CoV-2 в Свердловской области, в первую волну коронавирусной инфекции. Все участвовавшие в исследовании респонденты однократно переболели COVID-19, тяжесть инфекции согласно действующей классификации [2] была легкой или среднетяжелой, реанимационные больные отсутствовали. Инфицирование вирусом SARS-CoV-2 подтверждено молекулярно-генетическим методом в ходе полимеразно-цепной реакции с детекцией результатов в реальном времени. Никто из принимавших участие в работе медицинских сотрудников не был вакцинирован, так как специфические иммунопрофилактические средства на момент исследования не были разработаны. Респонденты обеспечивались средствами индивидуальной защиты (одноразовые медицинские маски, перчатки), соблюдали требования биологической безопасности и физико-химического предупреждения инфицирования (обработка рук дезинфицирующими растворами, помещений — ультрафиолетовым освещением). Контакт с вирусным агентом происходил в условиях осуществления профессиональной деятельности — оказания медицинской помощи пациентам, поступавшим в неотложном порядке: больные не были предварительно обследованы на наличие антигенов или рибонуклеиновой кислоты (РНК) вируса SARS-CoV-2 к моменту госпитализации.

Общее количество респондентов составило 59 человек. В связи с тем, что целью исследования стало изучение постковидного синдрома в разные сроки после инфицирования, все участники были дифференцированы на 3 группы: группа № 1 — с оценкой постковидных изменений в сроки до 30 суток после начала болезни (далее по тексту — через 1 месяц), группа № 2 — с выявлением изменений через 60 суток после верификации COVID-19 (далее по тексту — через 2 месяца) и группа № 3 — с детекцией нарушений состояния здоровья через 100 суток после инфицирования (далее по тексту — через 3 месяца).

Количественное соотношение участников в группах составило: 21 человек (35,6% от всех) — группа № 1, 12 человек (20,3% от всех) — группа № 2, 26 человек (44,1% от всех) — группа № 3.

Медианный возраст и межквартильный размах респондентов группы № 1 был 49 (38–53) лет, группы № 2 — 49 (47–51) лет и группы № 3 — 42 (33–47) года.

Гендерное распределение медицинских сотрудников смещалось в сторону женщин, в 1 группе был 1 (4,8% от количества в группе)

мужчина, во второй — 3 (25,0%), в третьей — 5 (19,2%) человек.

Медианный индекс массы тела и межквартильный размах составлял в группе № 1 — 26,8 (22,7–29,7) кг/м², в группе № 2 — 27,3 (24,9–29,8) кг/м² и в группе № 3 — 25,2 (22,9–30,6) кг/м².

Статистически значимых различий по возрасту, полу, индексу массы тела между группами не выявлено.

Среди представителей группы № 1 было 3 (14,3% от общего числа в группе) врача, 12 (57,1%) медицинских сестер, 2 (9,5%) санитарки и 4 (19,1%) человека вспомогательного персонала. Группа № 2 состояла из 3 (25,0%) специалистов с высшим медицинским образованием, 7 (58,3%) — со средним образованием и 2 (16,7%) — представителей иного персонала. В группе № 3 было 12 (46,2%) врачей, столько же медицинских сестер и 2 (7,6%) человека вспомогательного персонала.

Медианный стаж работы в медицинском учреждении, а также межквартильный размах разброса данных составил в группе № 1 — 19,5 (4,5–33,5) лет, в группе № 2 — 20 (8–28,5) лет и в группе № 3 — 16 (4,3–25) лет.

Медицинский статус и стаж работы по специальности не имели значимых различий между сравниваемыми группами.

В процессе исследования были изучены собственноручно заполненные медицинскими работниками анкеты, касающиеся преморбидного статуса (наличия заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной, иммунной систем, имеющих зависимость), характера течения COVID-19 (синдромы, терапия), постморбидных изменений (обострения хронических, возникновения новых заболеваний).

Серологические маркеры перенесенной инфекции определены с использованием реагентов фирмы «Вектор-Бест», Новосибирск: SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-Бест и SARS-CoV-2-IgM-ИФА-Бест на момент оценки постковидного состояния.

Статистические методы представлены базовыми исследованиями, а именно: изучением элементов описательной статистики (Descriptive Statistics) с установлением вида (нормальное/анормальное) распределения данных (Kolmogorov–Smirnov test), непараметрического оценивания (Nonparametric Statistics), включая оценку различий между группами (Kruskal–Wallis test и Median Test). Уровень значимости (p-value) p_{k-w} для Kruskal–Wallis one-way analysis of variance и p_m для Median test считали приемлемым при величине менее 0,05. В исследовании данные представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q_{25} – Q_{75}), в ряде случаев — в виде процента (%) случаев от общего количества человек в группе. Использовано

программное обеспечение: операционная система Windows 10 (Microsoft Corporation, США), статистический пакет STATISTICA v.12.5.192.5 (StatSoft, Inc., США).

Экспертное заключение о возможности открытого опубликования полученных данных утверждено членами экспертной комиссии ФГБУН ИИФ УрО РАН до момента появления сведений в доступных электронных и печатных источниках.

Результаты

Оценка анализируемых переменных произведена с помощью Kolmogorov–Smirnov test, установлен преимущественно аномальный характер распределения данных. Как упоминалось в разделе «Материалы и методы», группы № 1, № 2 и № 3 были сходными по полу, возрасту, антропометрическим данным, стажу и статусу работы в медицинском учреждении. В связи с тем, что когорты были независимыми, для сравнительного анализа результатов использованы Kruskal–Wallis test и Median Test.

Установлено, что постковидные изменения в виде наличия жалоб на нарушение сна, слабость, быструю утомляемость через 1 месяц после болезни предъявляли 57,7% респондентов, через 2 месяца после инфицирования — 33,3% (with № 1: Kruskal–Wallis test: $H = 4,399$, $p_{k-w} = 0,036$), через 3 месяца после развития COVID-19 — 38,5% (with № 1: Kruskal–Wallis test: $H = 4,963$, $p_{k-w} = 0,026$).

Трудоспособность восстановилась полностью через 1 месяц после болезни у 61,9% медицинских работников, через 2 месяца — у 83,3%, через 3 месяца — у 96,2% (with № 1: Kruskal–Wallis test: $H = 8,614$, $p_{k-w} = 0,003$, with № 1: Chi-Square = 8,802, $p_m = 0,003$). Трудоспособность восстановилась частично через 1 месяц после COVID-19 у 28,6% человек, через 2 месяца — у 16,7% медработников, через 3 месяца — у 3,8% респондентов (with № 1: Kruskal–Wallis test: $H = 5,484$, $p_{k-w} = 0,019$). В 9,5% изученных случаев через месяц после болезни были выявлены жалобы на полную неспособность выполнять работу, далее — в сроки 2 и 3 месяца наблюдения таких случаев не зафиксировано.

Об обострении хронических заболеваний через 1 месяц после COVID-19 заявили 4,8% респондентов, в частности, наблюдались нарушения деятельности сердечно-сосудистой системы, через 2 месяца после болезни жалоб на обострение хронических болезней не предъявлялось, через 3 месяца зафиксированы: обострение язвенной болезни, остеохондроза, длительного кашля — в целом, в 11,5% наблюдений.

О появлении новых заболеваний через 1 месяц после болезни заявили 9,5% медицинских ра-

ботников, жалобы предъявлялись на снижение остроты зрения, рассеянное внимание. Через 2 месяца после COVID-19 16,7% обследованных сообщили, что у них впервые появились боли в области сердца, аллергические реакции, ранее не проявлявшиеся, снизилась острота зрения. Спустя 3 месяца после инфицирования вирусом SARS-CoV-2 у 3,8% медицинских работников впервые появились признаки гипертонической болезни сердца, бронхиальной астмы.

Среди других симптомов, отдельно изучали изменения функционирования опорно-двигательного аппарата. На впервые появившиеся боли в мышцах, суставах, позвоночнике через 1 месяц после коронавирусной инфекции обратили внимание 57,1% больных, через 2 месяца такие жалобы встречались реже — до 25,0% случаев (with № 1: Kruskal–Wallis test: $H = 5,674$, $p_{k-w} = 0,045$, with № 1: Chi-Square = 5,814, $p_m = 0,047$), через 3 месяца — еще меньше — до 23,1% (with № 1: Kruskal–Wallis test: $H = 5,584$, $p_{k-w} = 0,018$, with № 1: Chi-Square = 5,705, $p_m = 0,017$).

Концентрация IgM в разные сроки исследования имела особенности: в частности, через 1 месяц после инфицирования ненулевые значения выявлялись в 15,4% случаев, через 2 месяца — в 12,5% случаев, через 3 месяца таких значений не зарегистрировано (with № 1: Kruskal–Wallis test: $H = 11,555$, $p_{k-w} = 0,001$, with № 1: Chi-Square = 11,937, $p_m = 0,001$; with № 2: Kruskal–Wallis test: $H = 9,395$, $p_{k-w} = 0,002$, with № 2: Chi-Square = 9,686, $p_m = 0,002$).

Медианные значения и межквартильный размах концентрации IgG в группе № 1 были 18,8 (18,4–20,3) BAU/мл (binding antibody units), в группе № 2 — 5,6 (5,3–10,3) BAU/мл (with № 1: Kruskal–Wallis test: $H = 22,479$, $p_{k-w} = 0,000$, with № 1: Chi-Square = 15,714, $p_m = 0,000$), в группе № 3 — 5,2 (4,4–17,1) BAU/мл (with № 1: Kruskal–Wallis test: $H = 28,919$, $p_{k-w} = 0,000$, with № 1: Chi-Square = 35,760, $p_m = 0,000$).

Изучение данных в сроки 1, 2 и 3 месяца после верификации COVID-19 позволило установить, что не было различий в проявлении постковидного синдрома в зависимости от тяжести инфекции. В частности, частота случаев тяжелого течения COVID-19 в структуре наблюдений через 1 месяц составила 14,3%, через 2 месяца — 16,7%, через 3 месяца — 15,4%. Как среднетяжелое течение перенесенного заболевания оценили через 1 месяц после инфицирования 52,4% респондентов, через 2 месяца после инфекции — 33,3% участников и через 3 месяца после заражения — 46,2% человек. Частота случаев легкого течения заболевания в структуре исследований через 1 месяц после болезни составила 33,3%, через 2 месяца — 50,0% случаев, через 3 месяца — 26,9% эпизодов. Среди наблюдений в группе № 3 оказалось 3 (11,5% от числа в группе) участников,

которые перенесли инфекцию бессимптомно, из них у одного жалобы на утомляемость после подтвержденного эпизода инфицирования COVID-19 тем не менее присутствовали.

Обсуждение

В настоящее время известно о как минимум четырех основных проблемах унификации сведений о постковидном синдроме. Во-первых, анализируются данные по определению сроков возникновения постковидного синдрома. По некоторым сведениям, это может быть 2–4–12 неделя от начала заболевания при наличии различных клинических проявлений. В частности, по мнению Raveendran A.V., 2020, дифференциация подразумевает: 2 недели — для легких заболеваний, 4 недели — для среднетяжелых и тяжелых заболеваний и более 6 недель — для критически острых заболеваний; при этом, для лиц с бессимптомным течением — 1 неделя после обнаружения антител к возбудителю заболевания или 2 недели после выявления РНК SARS-CoV-2, или установления рентгенологических признаков, или контакта с подозреваемым или подтвержденным случаем COVID-19; сомнительные случаи должны быть дифференцированы вслед за появлением симптомов. Во-вторых — уточнение характеристик постковидного синдрома, который может рассматриваться как непрекращающееся после инфицирования заболевание: «продолжающийся симптоматический COVID-19» с течением в период 4–12 недель и post-COVID-19 syndrome с сохра-

нением симптомов более 12 недель [3]. Вместе с тем известно немало случаев, когда постковидное состояние возникало не как продолжение COVID-19, а как внезапно возникшее нарушение состояния здоровья после перенесенной инфекции и далее спорадически повторяющееся. В-третьих — существуют вопросы относительно диагностических критериев постковидного синдрома. В частности, уже были предприняты некоторые попытки суммирования случаев наблюдения симптоматического и бессимптомного течения с оценкой клинико-рентгенологических и лабораторных сведений (наличия антигенов и РНК вируса), а также анамнестических и эпидемиологических особенностей [11]. В-четвертых — признание того, что факт развития постковидного синдрома может не ассоциироваться с тяжестью течения предшествующего COVID-19. То есть post-COVID-19 syndrome не является прямым следствием тяжелого заболевания и ставит под сомнение предположение о том, что «легкое» заболевание может пройти в течение 2 недель [8].

Анализ полученных данных позволил оценить некоторые проявления постковидного синдрома у больных с легким и среднетяжелым течением COVID-19 в разные сроки после инфицирования SARS-CoV-2 (рис.). В связи с тем, что среди наиболее часто встречающихся проявлений наблюдались изменения функции нервной системы, были оценены жалобы респондентов на наличие утомляемости, слабость, нарушения сна после болезни. Установлено, что больше половины (57,7%) респондентов в первый месяц

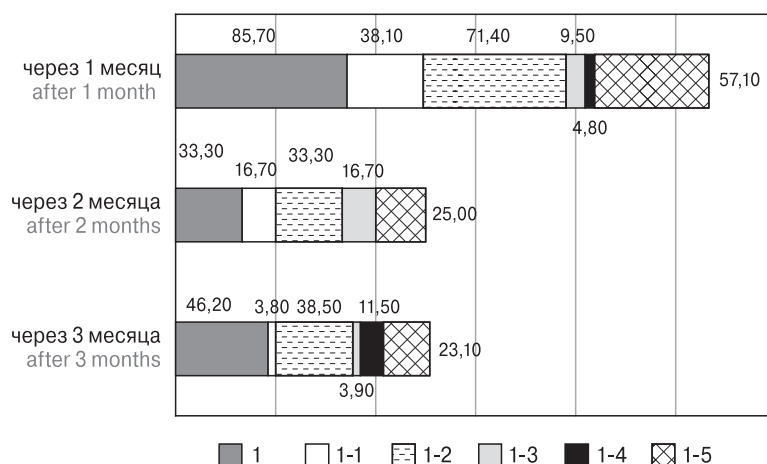


Рисунок. Некоторые проявления постковидного синдрома у больных с легким и среднетяжелым течением COVID-19

Figure. Some manifestations of post-COVID-19 syndrome in patients with mild and moderate COVID-19

Примечание. 1 — хотя бы одно проявление постковидного синдрома,%; 1-1 — трудоспособность не восстановилась, %; 1-2 — утомляемость присутствует, %; 1-3 — появились новые заболевания, %; 1-4 — обострились хронические заболевания, %; 1-5 — появились мышечные, суставные, позвоночные боли, %

Note. 1 — at least one manifestation of the post-COVID-19 syndrome, %; 1-1 — the ability to work has not been restored, %; 1-2 — fatigue is present, %; 1-3 — new diseases have appeared,%; 1-4 — chronic diseases have worsened, %; 1-5 — muscle, joint, and vertebral pains appeared, %

наблюдения имели такие изменения здоровья, через 2 месяца частота проявлений снижалась на 42,3%, к 3 месяцам вновь увеличивалась на 15,6%. Таким образом, изменения деятельности нервной системы к 3 месяцу наблюдения встречались в 38,5% случаев, что согласуется с данными других авторов [9].

Оценка влияния болезни на возможность выполнять привычную работу показала снижение трудоспособности через 1, 2 и 3 месяца после инфекции. Интересно отметить, что через месяц после COVID-19 было зафиксировано несколько случаев, когда сотрудники были не в состоянии выполнять никакую, даже очень легкую, работу, однако к 3 месяцу наблюдения 96,2% обследованных заявили о полном восстановлении работоспособности.

Изучение случаев обострения хронических заболеваний, как проявление постковидного синдрома, показало положительную динамику (увеличение числа случаев) к 3 месяцу наблюдения в 2,4 раза. Количество новых заболеваний, не зарегистрированных до коронавирусной инфекции у отельных индивидуумов, но появившихся после болезни, к 3 месяцу исследования снижалось в 2,5 раза. Вместе с тем стоит обратить внимание на тот факт, что суммарное количество обоих вариантов проявлений постковидного синдрома сохранялось на протяжении всего времени исследования примерно на одном и том же уровне, составляя в 1 месяц 14,3% случаев, во второй — 16,7% и в третий — 15,3%.

В оценке постморбидных изменений изучали влияние перенесенного COVID-19 на функции костно-мышечной системы. О появлении мышечных, суставных, позвоночных болей заявляли чаще в первый месяц наблюдения, далее число жалоб среди медработников снижалось вдвое до 23–25% случаев.

В целях подтверждения реакции на антигены вируса SARS-CoV-2 после перенесенной инфек-

ции определяли концентрацию специфических IgM и IgG. Установлено, что количество IgM снижалось до полного исчезновения к 3 месяцу после болезни, подтверждая отсутствие реинфицирования в период наблюдения. Концентрация IgG уменьшалась в 3,6 раза через 3 месяца после COVID-19, достигая уровня в 5,2 ВАУ/мл.

Оценка тяжести перенесенной инфекции показала, что не было выявлено достоверных отличий между наблюдениями в 1, 2 и 3 месяца после COVID-19, что согласуется с данными других авторов [4].

Ограничением полученных в исследовании данных является небольшая выборка.

Заключение

Анализ некоторых постковидных симптомов показал, что при легком и среднетяжелом течении COVID-19 проявления наблюдаются через 1, 2 и 3 месяца после инфицирования вирусом SARS-CoV-2. Выявлена разнонаправленная динамика изменений, чаще сопровождающаяся снижением проявления постковидного синдрома через 2 месяца после коронавирусной инфекции, что может создавать ложное представление об отсутствии признаков post-COVID-19 syndrome в этот период.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность Министру здравоохранения Свердловской области к.м.н. А.А. Карлову, заведующей эпидемиологическим отделом ГАУЗ СО «ДГКБ № 9» г. Екатеринбурга Т.А. Катунцевой, директору ФГБУН «ИИФ» УрО РАН д.ф.-м.н., профессору О.Э. Соловьевой за помощь в организации данного исследования, а также сотрудникам ГАУЗ СО «ДГКБ № 9», оказавшим содействие в получении сведений о перенесенной инфекции.

Список литературы/References

1. Об утверждении порядка дачи информированного добровольного согласия на медицинское вмешательство и отказа от медицинского вмешательства, формы информированного добровольного согласия на медицинское вмешательство и формы отказа от медицинского вмешательства: Приказ МЗ РФ от 12.11.2021 №1051н. [On approval of the procedure for giving informed voluntary consent to medical intervention and refusal of medical intervention, forms of informed voluntary consent to medical intervention and forms of refusal of medical intervention: Order of the Ministry of Health of the Russian Federation, November 12, 2021 No. 1051n (In Russ.)] URL: <https://base.garant.ru/403111701>
2. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): методические рекомендации. Версия 18 от 26.10.2023. [Prevention, diagnosis, and treatment of new coronavirus infection (COVID-19): guidelines. Version 18 of 26.10.2023. (In Russ.)] URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896
3. Akbarialiabad H., Taghrir M.H., Abdollahi A., Ghahramani N., Kumar M., Paydar S., Razani B., Mwangi J., Asadi-Pooya A.A., Malekmakan L., Bastani B. Long COVID, a comprehensive systematic scoping review. *Infection*, 2021, vol. 49, no. 6, pp. 1163–1186. doi: 10.1007/s15010-021-01666-x
4. Castanares-Zapatero D., Chalon P., Kohn L., Dauvrin M., Detollenaere J., Maertens de Noordhout C., Primus-de Jong C., Cleemput I., Van den Heede K. Pathophysiology and mechanism of long COVID: a comprehensive review. *Ann. Med.*, 2022, vol. 54, no. 1, pp. 1473–1487. doi: 10.1080/07853890.2022.2076901
5. Chippa V., Aleem A., Anjum F. Post-Acute Coronavirus (COVID-19) Syndrome. In: *StatPearls. Treasure Island: StatPearls Publishing*, 2024.

6. Förster C., Colombo M.G., Wetzel A.J., Martus P., Joos S. Persisting Symptoms After COVID-19. *Dtsch Arztebl. Int.*, 2022, vol. 119, no. 10, pp. 167–174. doi: 10.3238/arztebl.m2022.0147
7. Koc H.C., Xiao J., Liu W., Li Y., Chen G. Long COVID and its management. *Int. J. Biol. Sci.*, 2022, vol. 18, no. 12, pp. 4768–4780. doi: 10.7150/ijbs.75056
8. Mahase E. Long covid could be four different syndromes, review suggests. *BMJ*, 2020, vol. 371: m3981. doi: 10.1136/bmj.m3981
9. Monje M., Iwasaki A. The neurobiology of long COVID. *Neuron*, 2022, vol. 110, no. 21, pp. 3484–3496. doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.006
10. Proal A.D., VanElzakker M.B., Aleman S., Bach K., Boribong B.P., Buggert M., Cherry S., Chertow D.S., Davies H.E., Dupont C.L., Deeks S.G., Eimer W., Ely E.W., Fasano A., Freire M., Geng L.N., Griffin D.E., Henrich T.J., Iwasaki A., Izquierdo-Garcia D., Locci M., Mehandru S., Painter M.M., Peluso M.J., Pretorius E., Price D.A., Putrino D., Scheuermann R.H., Tan G.S., Tanzi R.E., VanBrocklin H.F., Yonker L.M., Wherry E.J. SARS-CoV-2 reservoir in post-acute sequelae of COVID-19 (PASC). *Nat. Immunol.*, 2023, vol. 24, no. 10, pp. 1616–1627. doi: 10.1038/s41590-023-01601-2
11. Raveendran A.V. Long COVID-19: Challenges in the diagnosis and proposed diagnostic criteria. *Diabetes Metab. Syndr.*, 2021, vol. 15, no. 1, pp. 145–146. doi: 10.1016/j.dsx.2020.12.025

Автор:

Бердюгина О.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия.

Author:

Berdiugina O.V., DSc (Biology), Leading Researcher, Inflammation Immunology Laboratory, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.03.2024
Принята к печати 01.04.2024

Received 30.03.2024
Accepted 01.04.2024

ПРОДУКЦИЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ КАК ОТРАЖЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ПРИ ПОСТКОВИДНОМ МИОКАРДИТЕ

О.В. Москалец

ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского,
Москва, Россия

Резюме. В настоящее время проблема персистирующего поражения миокарда у больных, перенесших COVID-19, стала одной из наиболее актуальных в практике кардиологов. Основные механизмы патогенеза постковидного миокардита связаны с нарушением иммунорегуляции, обусловленной длительной персистенцией вируса в сердечной мышце и запуском аутоиммунных процессов, которые могут привести к ремоделированию миокарда, формированию миокардиосклероза и развитию сердечной недостаточности или аритмий. Цель данного исследования заключалась в оценке динамики выработки некоторых цитокинов (IFN γ , IL-4, IL-17A), которые могут косвенно отражать активацию различных путей иммунного ответа у больных с постковидным миокардитом в зависимости от сроков заболевания и степени сердечной недостаточности. В исследование было включено 32 пациента с постковидным миокардитом, 36 пациентов с миокардитическим кардиосклерозом и 10 условно здоровых лиц. Установлено, что у всех пациентов с постковидным миокардитом содержание IFN γ , IL-4, IL-17A в сыворотке крови было выше, чем у пациентов с миокардитическим кардиосклерозом ($p < 0,001$; $p < 0,05$; $p < 0,01$, соответственно) и условно здоровых лиц ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,001$, соответственно). По сравнению с группой пациентов с отсутствием или умеренной тяжестью симптомов сердечной недостаточности (0–II функциональный класс), при более тяжелой сердечной недостаточности (III функциональный класс) отмечался более высокий уровень IFN γ ($p < 0,05$). При сравнении полученных результатов с аналогичными показателями у больных с миокардитическим кардиосклерозом, имеющим такую же степень сердечной недостаточности, статистически значимых различий не получено. Максимальное содержание IFN γ при постковидном миокардите наблюдалось на 2-й неделе заболевания ($p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой), затем его уровень постепенно снижался и к концу 2-го месяца достоверных различий уже не было. Противоположная тенденция наблюдалась в отношении содержания IL-4 и IL-17A: в первые две недели статистически значимых различий с контрольной группой не выявлено, но затем их содержание достаточно быстро возрастало ($p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой к концу первого месяца заболевания) и продолжало сохраняться таким же высоким до конца 2-го месяца. Таким образом, мониторинг содержания IFN γ , IL-4, IL-17A в сыворотке крови может в какой-то степени давать представление о последовательности развития иммунного ответа при постковидном миокардите. Повышение уровня IFN γ на ранних сроках заболевания, вероятно, ассоциируется с нарастанием проявлений сердечной недостаточности. Th17-опосредованные механизмы могут участвовать в процессе ремоделирования миокарда с исходом в миокардитический кардиосклероз.

Ключевые слова: миокардит, COVID-19, постковидный синдром, цитокины, сердечная недостаточность, миокардитический кардиосклероз.

Адрес для переписки:

Москалец Оксана Владимировна
129110, Россия, Москва, ул. Щепкина, 61/2,
ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.
Тел.: 8 (495) 681-60-00. E-mail: 6816000@mail.ru

Contacts:

Oxana V. Moskaletc
129110, Russian Federation, Moscow, Shchepkina str., 61/2,
M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute.
Phone: +7 (495) 681-60-00. E-mail: 6816000@mail.ru

Для цитирования:

Москалец О.В. Продукция некоторых цитокинов как отражение различных иммунорегуляторных механизмов при постковидном миокардите // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 483–487. doi: 10.15789/2220-7619-POS-16582

Citation:

Moskaletc O.V. Production of some cytokines as a reflection of various immunoregulatory mechanisms in post-COVID myocarditis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 483–487. doi: 10.15789/2220-7619-POS-16582

PRODUCTION OF SOME CYTOKINES AS A REFLECTION OF VARIOUS IMMUNOREGULATORY MECHANISMS IN POST-COVID MYOCARDITIS

Moskaletc O.V.

Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation

Abstract. Currently, the problem of persistent myocardial damage in patients who have had COVID-19 has become one of the most pressing in the practice of cardiologists. The main mechanisms of the pathogenesis of post-COVID myocarditis are associated with a violation of immunoregulation caused by long-term persistence of the virus in the heart muscle and the launch of autoimmune processes that can lead to myocardial remodeling, the formation of myocardiosclerosis and the development of heart failure or arrhythmia. The purpose of this study was to assess the dynamics of the production of certain cytokines (IFN γ , IL-4, IL-17A), which may indirectly reflect the activation of various immune response pathways in patients with post-COVID myocarditis, depending on the duration of the disease and the degree of heart failure. The study included 32 patients with post-COVID myocarditis, 36 patients with myocardial cardiosclerosis, and 10 apparently healthy individuals. It was found that in all patients with post-COVID myocarditis, the content of IFN γ , IL-4, IL-17A in the blood serum was higher than in patients with myocardial cardiosclerosis ($p < 0.001$; $p < 0.05$; $p < 0.01$, respectively) and conditionally healthy individuals ($p < 0.001$; $p < 0.01$; $p < 0.001$, respectively). Compared with the group of patients with no or moderate severity of symptoms of heart failure (functional class 0–II), those with more severe heart failure (functional class III) had a higher level of interferon gamma ($p < 0.05$). When comparing the results obtained with similar indicators in patients with myocardial cardiosclerosis who have the same degree of heart failure, no statistically significant differences were obtained. The maximum content of IFN γ in post-COVID myocarditis was observed in the 2nd week of the disease ($p < 0.001$ compared with the control group); then its level gradually decreased and by the end of the 2nd month there were no longer any significant differences. The opposite trend was observed in relation to the content of IL-4 and IL-17A: in the first two weeks, no statistically significant differences were detected with the control group, but then their content increased quite quickly ($p < 0.001$ compared with the control group by the end of the first month of the disease) and continued to remain the same high until the end of the 2nd month. Thus, monitoring the content of IFN γ , IL-4, IL-17A in blood serum can to some extent provide an idea of the sequence of development of the immune response in post-COVID myocarditis. An increase in IFN γ levels in the early stages of the disease is probably associated with an increase in the manifestations of heart failure. Th17-mediated mechanisms may be involved in the process of myocardial remodeling resulting in myocardial cardiosclerosis.

Key words: myocarditis, COVID-19, post-COVID syndrome, cytokines, heart failure, post-myocarditis cardiosclerosis.

Введение

Вирусное поражение сердечной мышцы является наиболее частой причиной инфекционных миокардитов [3,8]. Согласно современным взглядам, выделяют несколько вариантов вирусного миокардита: собственно вирусный (преимущественно, острый), вирус-позитивный (обычно, хронический), вирусиндуцированный, в том числе, вирусопосредованный (прямое цитотоксическое действие вируса на миокард) и иммунопосредованный (вирус является триггером) [1, 10]. При неблагоприятном течении исходом миокардита может быть миокардитический кардиосклероз и дилатационная кардиомиопатия с прогрессирующей сердечной недостаточностью (СН) [4, 11].

Как и при многих других вирусных инфекциях, повреждение миокарда и течение заболевания в значительной степени зависят от баланса иммунологических механизмов противовирусной защиты и аутоиммунных реакций [2, 10]. На ранней стадии болезни, как правило, преобладают Th1-регуляторные механизмы, позже баланс смещается в сторону Th2-опосредованных реакций, то есть антительного

ответа, который не всегда бывает эффективным и может способствовать развитию хронического течения патологического процесса. И конечно, важную роль играют Th17-лимфоциты, которые, как известно, имеют непосредственное отношение к индукции аутоиммунных реакций [10, 11]. Показано также, что у больных с миокардитом снижено содержание НКТ-клеток, роль которых может заключаться как в усилении цитотоксического действия CD8⁺ лимфоцитов на кардиомиоциты, так и в ограничении избыточных иммунных реакций и возможности развития аутоиммунного повреждения. В то же время при этом создаются предпосылки для персистенции вируса [4]. Установлено что при вирусных миокардитах, особенно у больных с выраженной СН, увеличивается экспрессия молекул HLA-DR и CD95 на Т-лимфоцитах, что может косвенно указывать на вероятность нарушения механизмов активационного апоптоза [5].

Пандемия SARS-CoV-2 и ее последствия в виде постковидного синдрома подтвердили актуальность дальнейшего изучения механизмов развития воспалительного повреждения сердечной мышцы [1, 6]. Один из таких механиз-

мов может быть связан с хронической воспалительной реакцией, обусловленной длительной персистенцией вируса в миокарде, и сопутствующим ожирением. При этом периваскулярная жировая ткань стимулирует продукцию адипокинов, которые приводят к формированию воспалительной реакции [13]. Вследствие активации Т-лимфоцитов увеличивается секреция хемокинов, что усугубляет эндотелиальную дисфункцию. Итогом такой вялотекущей воспалительной реакции становится фиброз, нарушение перфузии миокарда и снижение его сократительной способности [9]. Другой механизм, вероятно, связан с феноменом молекулярной мимикрии, который запускает аутоиммунную реакцию [12]. Возможность постковидных аутоиммунных осложнений со стороны сердца одними из первых стали обсуждать педиатры, когда столкнулись с мультисистемным воспалительным синдромом [14]. Данную гипотезу подтверждает также факт обнаружения антикардиальных антител у ряда больных с COVID-19 [1,7].

Цель: оценить динамику выработки цитокинов у больных с постковидным миокардитом (ПКМ) в зависимости от сроков заболевания и степени СН.

Материалы и методы

В данном исследовании приняли участие 32 больных ПКМ (18 мужчин, 24 женщины), который развился через 2–5 месяцев после завершения острой фазы COVID-19. В группу сравнения включили 36 пациентов с миокардитическим кардиосклерозом (МКС) (14 мужчин, 22 женщины). В контрольную группу вошло 10 практически здоровых лиц. У всех больных с ПКМ в анамнезе был лабораторно подтвержденный COVID-19 (положительные результаты ПЦР и серологических тестов с сероконверсией) легкого и среднетяжелого течения, не требовавший респираторной поддержки. Средний возраст составил $46 \pm 5,4$ лет у пациентов с ПКМ, $51 \pm 7,8$ лет у пациентов с МКС и $43 \pm 8,1$ лет у лиц из контрольной группы. Время от появления

первых симптомов миокардита до включения в исследование составило от 1 до 8 недель. Для подтверждения диагноза всем больным выполняли МРТ. Оценку размеров полостей сердца и сократительной способности левого желудочка проводили помощью доплер-эхокардиографии. Для оценки диастолической функции сердца анализировали спектр трансмитрального диастолического потока. Степень СН оценивали в соответствии с критериями Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA). Содержание интерферона- γ (IFN γ), IL-4 (IL-4) и интерлейкина-17A (IL-17A) в сыворотке периферической крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Bender Medsystems» (Австрия).

Результаты и обсуждение

Содержание цитокинов в сыворотке крови исследованных лиц представлено в табл. 1.

В настоящее время выделяют Лонг-Ковид (Long-COVID) (если через 4–12 недель от начала заболевания симптомы сохраняются или появляются новые) и Пост-Ковид (Post-COVID) (симптомы появляются через 12 недель и не могут быть объяснены альтернативным диагнозом), хотя в реальной клинической практике эти два состояния не всегда можно четко разграничить. В данном исследовании сроки появления первых симптомов миокардита варьировали, но для удобства употребляется единый термин «ПКМ».

Полученные результаты доказывают, что для ПКМ характерны активация не только Th1- и Th2-субпопуляций лимфоцитов, что подтверждается существенным увеличением концентраций IFN γ и IL-4, но и активное участие Th17-лимфоцитов, на что указывает очень высокий уровень IL-17A (в 7 раз выше, чем в контрольной группе и в 3 раза выше чем при МКС).

Признаки выраженной СН, соответствующие III функциональному классу (ФК III), были выявлены у 17 пациентов с ПКМ, у остальных СН отсутствовала (ФК 0) или была умеренной

Таблица 1. Содержание цитокинов в сыворотке крови больных ПКМ, МКС и практически здоровых лиц
Table 1. The content of cytokines in the blood serum of patients with PCM, MCS and practically healthy individuals

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	ПКМ PCM	МКС MCS	Контрольная группа Controls
IFN γ	108,4 \pm 11,3*	54,2 \pm 9,1#	49,7 \pm 9,6
IL-4	60,2 \pm 7,9**	23,6 \pm 4,7##	13,9 \pm 5,3
IL-17A	78,1 \pm 14,5*	26,8 \pm 9,8**###	9,5 \pm 2,6

Примечание. *p < 0,001 по сравнению с контрольной группой; **p < 0,01 по сравнению с контрольной группой; #p < 0,001 по сравнению с группой больных ПКМ; ##p < 0,05 по сравнению с группой больных ПКМ; ###p < 0,01 по сравнению с группой больных ПКМ.

Note. *p < 0.001 compared to the control group; **p < 0.01 compared to the control group; #p < 0.001 compared with the group of patients with PCM; ##p < 0.05 compared with the group of patients with PCM; ###p < 0.01 compared with the group of patients with PCM.

Таблица 2. Содержание цитокинов в сыворотке крови больных ПКМ в зависимости от сроков заболевания

Table 2. Content of cytokines in the blood serum of patients with PCM depending on the duration of the disease

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	1-я неделя 1 week	2-я неделя 2 week	3–4-я неделя 3–4 week	2-й месяц 2 months
IFNγ	88,3 \pm 4,2**	186,7 \pm 12,7***	74,9 \pm 4,8*	58,0 \pm 5,1
IL-4	19,8 \pm 3,5	22,4 \pm 5,7	80,2 \pm 8,6***	72,3 \pm 11,6**
IL-17A	12,6 \pm 5,7	18,9 \pm 6,1	87,8 \pm 12,8***	96,1 \pm 15,4***

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; *** $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Note. * $p < 0.05$ compared to the control group; ** $p < 0.01$ compared to the control group; *** $p < 0.001$ compared to the control group.

(ФК I–II). При анализе результатов оценки уровня цитокинов было установлено, что при СН ФК III отмечается более высокое содержание IFN γ , чем в контрольной группе (164,2 \pm 8,7 и 64,2 \pm 6,9 пг/мл соответственно, $p < 0,05$), по остальным цитокинам статистически значимых различий не получено, хотя и наблюдалась тенденция к повышению IL-17A.

По сравнению с группой пациентов с отсутствием или умеренной тяжестью симптомов СН (0–II ФК), при более тяжелой СН (ФК III), также отмечался более высокий уровень IFN γ (79,8 \pm 7,3 и 153,6 \pm 10,6 пг/мл соответственно, $p < 0,05$). Кроме того, в этой группе больных отмечалась тенденция к более высокому содержанию IL-17A, но из-за большого разброса индивидуальных показателей различие не оказалось статистически значимым.

У больных с МКС СН отсутствовала (ФК 0) или была минимально выражена (ФК I). При сравнении с аналогичными пациентами с ПКМ достоверных различий по содержанию исследуемых цитокинов не наблюдалось.

Как видно из табл. 2, при ПКМ наиболее высокое содержание IFN γ отмечалось на 2-й неделе заболевания (186,7 \pm 12,7 пг/мл, $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой). В дальнейшем его уровень постепенно снижался и к концу 2-го месяца достоверных различий уже не было. Противоположная тенденция наблюдалась в отношении содержания IL-4: в первые две недели статистически значимых различий с контрольной группой не выявлено, затем его содержание достаточно быстро повы-

шалось и уже к концу первого месяца достигало 80,2 \pm 8,6 пг/мл ($p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой). К концу второго месяца заболевания его уровень существенно не изменился (72,3 \pm 11,6 пг/мл, $p < 0,01$). Сходную динамику продемонстрировал IL-17: к концу 1-го месяца и на 2-м месяце заболевания концентрации составили, соответственно, 87,8 \pm 12,8 пг/мл ($p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой) и 96,1 \pm 15,4 пг/мл ($p < 0,001$).

Заключение

В патогенезе ПКМ принимают участие Th1-, Th2- и Th17-опосредованные механизмы иммунорегуляции. Содержание в сыворотке крови ключевых цитокинов, связанных с каждым из этих механизмов, может в какой-то степени давать представление о последовательности развития событий. Повышение уровня IFN γ на ранних сроках заболевания, вероятно, ассоциируется с нарастанием проявлений СН. Повышение уровня IL-4, отмечающийся в конце 1-го — во 2-м месяце заболевания, может отражать гуморальные иммунопатологические процессы, возникающие при участии Th2- лимфоцитов. Нарастание уровней IL-17A, которое происходит на фоне затухания Th1-опосредованных иммунных реакций, вероятно, связано с функциональным антагонизмом Th1- и Th17-субпопуляций лимфоцитов. Th17-опосредованные механизмы могут участвовать в процессе ремоделирования миокарда с исходом в МКС.

Список литературы/References

1. Благова О.В., Коган Е.А. Миокардит: диагностика и лечение в период пандемии // Consilium Medicum. 2021. Т. 23, № 10. С. 742–749. [Blagova O.V., Kogan E.A. Myocarditis: diagnosis and treatment in a period of pandemic. *Consilium Medicum*, 2021, vol. 23, no. 10, pp. 742–749. (In Russ.)] doi: 10.26442/20751753.2021.10.200668
2. Москалец О.В. Роль инфекций в развитии аутоиммунных заболеваний // Казанский медицинский журнал. 2017. Т. 98, № 4. С. 586–591. [Moskalets O.V. Role of infections in autoimmune disease development. *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2017, vol. 98, no. 4, pp. 586–591. (In Russ.)] doi: 10.17750/KMJ2017-586
3. Палеев Н.Р., Палеев Ф.Н., Санина Н.П. Миокардиты // Альманах клинической медицины. 2004. № 7. С. 118–126. [Paleev N.R., Paleev F.N., Sanina N.P. Myocarditis. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2004, no. 7, pp. 118–126. (In Russ.)]

4. Палеев Н.Р., Палеев Ф.Н., Санина Н.П., Макарьков А.И., Москалец О.В., Островский Е.И., Хишова Н.Н. Сердечная недостаточность при миокардитах и роль иммунных механизмов в ее развитии // Русский медицинский журнал. 2014. Т. 22, № 12. С. 878–882. [Paleev N.R., Paleev F.N., Sanina N.P., Makarkov A.I., Moskalets O.V., Ostrovskiy E.I., Khishona N.N. Heart failure in myocarditis and the role of immune mechanisms in its development. *Russkii meditsinskii zhurnal* = *Russian Medical Journal*, 2014, vol. 22, no. 12, pp. 878–882. (In Russ.)]
5. Палеев Ф.Н., Санина Н.П., Макарьков А.И., Мылов Н.М., Островский Е.И., Хишова Н.Н., Москалец О.В., Палеев Н.Р. Иммунологическая характеристика заболеваний миокарда вирусной этиологии // Альманах клинической медицины. 2014. № 35. С. 12–21. [Paleev F.N., Sanina N.P., Makarkov A.I., Mylov N.M., Ostrovskiy E.I., Khishona N.N., Moskalets O.V., Paleev N.R. Immunological features of inflammatory myocardial diseases due to viral infection. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny* = *Almanac of Clinical Medicine*, 2014, no. 35, pp. 12–21. (In Russ.)]
6. Редькина И.Н., Суплотова Л.А., Бессонова М.И. Постковидный синдром с позиции кардиоваскулярных нарушений // Медицинский совет. 2022. Т. 16, № 18. С. 141–146. [Redkina I.N., Suplotova L.A., Bessonova M.I. Postcovid syndrome, cardiovascular disorders. *Meditsinskiy sovet* = *Medical Council*, 2022, vol. 16, no. 18, pp. 141–146. (In Russ.)] doi: 10.21518/2079-701X-2022-16-18-141-146
7. Blagova O., Varionchik N., Zaidenov V., Savina P., Sarkisova N. Anti-heart antibodies levels and their correlation with clinical symptoms and outcomes in patients with confirmed or suspected diagnosis COVID-19. *Eur. J. Immunol.*, 2021, vol. 51, no. 4, pp. 893–902. doi: 10.1002/eji.202048930
8. Blauwet L.A., Cooper L.T. Myocarditis. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 2010, vol. 52, no. 4, pp. 274–288. doi: 10.1016/j.pcad.2009.11.006
9. Kim H.W., de Chantemèle E.J.B., Weintraub N.L. Perivascular adipocytes in vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2019, vol. 39, no. 11, pp. 2220–2227. doi: 10.1161/atvbaha.119.312304
10. Lasrado N., Reddy J. An overview of the immune mechanisms of viral myocarditis. *Rev. Med. Virol.*, 2020, vol. 30, no. 6, pp. 1–14. doi: 10.1002/rmv.2131
11. Martens C.R., Accornero F. Virus in the heart: direct and indirect routes to myocarditis and heart failure. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 10: 1924. doi: 10.3390/v13101924
12. Matsumori A. Myocarditis and autoimmunity. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, 2023, vol. 21, no. 6, pp. 437–451. doi: 10.1080/14779072.2023.2219895
13. Pollack A., Kontorovich A.R., Fuster V., Dec G.W. Viral myocarditis — diagnosis, treatment options, and current controversies. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2015, vol. 12, no. 11, pp. 670–680. doi: 10.1038/nrcardio.2015.108
14. Vasichkina E., Alekseeva D., Kudryavtsev I., Glushkova A., Starshinova A.Y., Malkova A., Kudlay D., Starshinova A. COVID-19 heart lesions in children: clinical, diagnostic and immunological changes. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, no. 2: 1147. doi: 10.3390/ijms24021147

Автор:

Москалец О.В., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биомедицинских методов исследования ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт (МОНКИ) им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия.

Author:

Moskalets O.V., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Biomedical Research Methods, Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI), Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 01.03.2024
Принята к печати 17.03.2024

Received 01.03.2024
Accepted 17.03.2024

ВАРИАТИВНОСТЬ ИЗМЕНЕНИЙ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ НА ФОНЕ ДЕФИЦИТА $IFN\alpha$ И $IFN\gamma$ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ, АССОЦИИРОВАННЫМ С АКТИВАЦИЕЙ ХРОНИЧЕСКИХ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

М.Г. Атажахова^{1, 2}, Г.А. Чудилова², Л.В. Ломтатидзе², Е.А. Поезжаев²

¹ ФГБОУ ВО Майкопский государственный технологический университет, г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

² ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Резюме. Постковидный синдром (ПКС) характеризуется долгосрочными осложнениями и состояниями, сопровождающимися нейроиммуновоспалением, и включает в себя синдром хронической усталости (СХУ) и когнитивные расстройства (КР), которые зачастую ассоциированы с активацией хронических герпесвирусных инфекций (ГВИ). Своевременное выявление симптомов и иммунодиагностика ПКС являются приоритетными и представляют несомненный интерес. Цель: уточнить уровни сывороточных про- и противовоспалительных цитокинов, интерферонов альфа и гамма у пациентов с постковидным синдромом, ассоциированным с подтвержденной активацией хронических герпесвирусных инфекций. Исследованы 60 пациентов в возрасте от 18 до 65 лет с жалобами на проявления ПКС, ассоциированного с ГВИ — группа исследования (ГИ). Проведено анкетирование по модифицированной шкале-опроснику для оценки выраженности симптомов ПКС в баллах от 0 до 4, ПЦР реального времени ГВИ (ВЭБ, ВПГ1/2, ВЧГ6, ВЧГ8, ЦМВ) в слюне и соскобе с миндалин, определение уровня $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, про- ($TNF\alpha$, $IL-18$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-17A$, $IL-8$) и противовоспалительных ($IL-4$ и $IL-10$) цитокинов в сыворотке крови. Группа сравнения (ГС) — 60 условно здоровых лиц. Пациенты ГИ, имеющие микст-ГВИ с доминированием ВЭБ, отмечали наиболее выраженные и стойкие клинические проявления ПКС, среди которых лидирующее место занимали длительные ощущения СХУ и КР. Была выявлена сохраняющаяся мультисистемная воспалительная реакция, подтверждающаяся повышенным уровнем $IL-6$ и $IL-17A$, что обуславливало тяжелое течение ПКС. В постковидном периоде детектирована гиперпродукция $IL-1\beta$, которая сопровождалась клиническими проявлениями стойкого нейроиммуновоспаления. При этом, выявленный дефицит $IFN\alpha$, $IFN\gamma$ и дисрегуляторные нарушения в противовирусной защите иммунной системы у пациентов с ПКС способствовали активации ГВИ. Получены данные о дисбалансе про- и противовоспалительных цитокинов в ГИ, что подтверждает наличие сохраняющейся мультисистемной воспалительной реакции с доминированием стойкого нейроиммуновоспаления, что обу-

Адрес для переписки:

Атажахова Маргарита Галимовна
385009, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Ветеранов, 61,
ФГБОУ ВО Майкопский государственный технологический
университет.
Тел.: 8 (928) 460-34-42,
E-mail: doctor_atazhachova@mail.ru

Contacts:

Margarita G. Atazhakhova
385009, Russian Federation, Republic of Adygea, Maikop,
Veteranov str., 61, Maikop State Technological University.
Phone: +7 (928) 460-34-42.
E-mail: doctor_atazhachova@mail.ru

Для цитирования:

Атажахова М.Г., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Поезжаев Е.А.
Вариативность изменений про- и противовоспалительных цитокинов
на фоне дефицита $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ у пациентов с постковидным синдромом,
ассоциированным с активацией хронических герпесвирусных
инфекций // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 488–494.
doi: 10.15789/2220-7619-VOC-16749

Citation:

Atazhakhova M.G., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Poyezhaev E.A.
Variability of changes in proand antiinflammatory cytokines due to $IFN\alpha$
and $IFN\gamma$ deficiency in patients with post-COVID syndrome associated with
activation of chronic herpes viral infections // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 488–494.
doi: 10.15789/2220-7619-VOC-16749

славливает тяжелое течение ПКС. Дисбаланс системы цитокинов на фоне дефицита IFN α и IFN γ , сопряженный с активацией хронических ГВИ с доминированием ВЭБ в постковидном периоде, способствует развитию нейроиммуновоспаления, что сопровождается ведущими клиническими признаками ПКС: СХУ и КР.

Ключевые слова: постковидный синдром, герпесвирусная инфекция, интерфероны, цитокины, синдром хронической усталости, когнитивные расстройства.

VARIABILITY OF CHANGES IN PROAND ANTIINFLAMMATORY CYTOKINES DUE TO IFN α AND IFN γ DEFICIENCY IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME ASSOCIATED WITH ACTIVATION OF CHRONIC HERPES VIRAL INFECTIONS

Atazhakhova M.G.^{a,b}, Chudilova G.A.^b, Lomtadidze L.V.^b, Poezhaev E.A.^b

^a Maikop State Technological University, Maikop, Republic of Adygea, Russian Federation

^b Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. Post-COVID syndrome (PCS) is characterized by long-term complications and conditions accompanied by neuroimmunoinflammation, and includes chronic fatigue syndrome (CFS) and cognitive disorders (CD), which are often associated with activation of chronic herpesvirus infections (HVI). Timely detection of symptoms and immunodiagnosis of PCS are a priority and are of undoubted interest. Objective: to clarify the levels of serum proand anti-inflammatory cytokines, alpha and gamma interferons in patients with post-COVID syndrome associated with confirmed activation of chronic herpesvirus infections. Patients (n = 60) aged from 18 to 65 years with complaints of manifestations of PCS associated with HVI were studied — the study group (SG). A survey was conducted using a modified scale-questionnaire to assess the severity of PCS symptoms in points from 0 to 4, real-time PCR of HVI (EBV, HSV1/2, VCH6, VCH8, CMV) in saliva and scrapings from the tonsils, determination of the level of IFN α and IFN γ , pro- (TNF α , IL-18, IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-8) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokines in blood serum. Comparison group (CG) — 60 apparently healthy individuals. SG patients with mixed HVI with EBV dominance noted the most pronounced and persistent clinical manifestations of PCS, among which the leading place was occupied by longterm sensations of CFS and CD. A persistent multisystem inflammatory response was identified, confirmed by elevated levels of IL-6 and IL-17A, which caused severe PCS. In post-COVID period, hyperproduction of IL-1 β was detected, which was accompanied by clinical manifestations of persistent neuroimmunoinflammation. At the same time, the identified deficiency of IFN α , IFN γ and dysregulatory disorders in the antiviral defense of the immune system in patients with PCS contributed to the activation of HVI. Data on the imbalance of proand anti-inflammatory cytokines in the SG were obtained, which confirms the presence of a persistent multisystem inflammatory reaction with dominance of persistent neuroimmunoinflammation, which causes severe PCS. An imbalance of the cytokine system with IFN α and IFN γ deficiency, associated with the activation of chronic HVI with EBV dominance in the post-COVID period, contributes to the development of neuroimmunoinflammation, which is accompanied by the leading clinical signs of PCS: CFS and CD.

Key words: post-COVID syndrome, herpesvirus infection, interferons, cytokines, chronic fatigue syndrome, cognitive disorders.

Введение

Многогранный характер постковидного синдрома (ПКС) обуславливает ряд сложных иммунопатофизиологических механизмов, таких как: иммунная дисрегуляция, синдром системного воспалительного ответа, повреждение сосудов микроциркуляторного русла, аутоиммунные процессы, вегетативная и нервная дисфункции, прямое цитотоксическое действие вируса на клетки и его длительная персистенция [10].

При COVID-19 задействовано большое количество одновременно действующих факторов, которые индуцируются неадекватным уровнем про- и противовоспалительных цитокинов и в конечном итоге определяют исход COVID-19. При этом иммунная система может перейти как в стадию длительной активации врожденного и адаптивного иммунитета, так и в стадию иммуносупрессии. Эти дисрегу-

ляторные процессы поддерживают синдром стойкого мультисистемного воспаления, часто наблюдаемого после перенесенного тяжелого инфекционного процесса, и являются одной из предполагаемых причин стойкого постковидного синдрома (ПКС) [11]. Появление симптомов нейроиммуновоспаления предположительно состоит в том, что SARS-CoV-2 избирательно заражает нейроны и, перейдя в латентное состояние с низкой репликативной активностью, может поддерживать состояние, характерное для ПКС. Пациенты с ПКС часто подвержены коинфекциям, например, герпесвирусным, которые могут часто реактивироваться, в том числе при стрессовой ситуации, и дополнительно негативно влиять на иммунную систему [9].

При ПКС включается множество иммунопатофизиологических механизмов, ведущих к мультисистемному поражению органов и тканей: синдром хронической усталости (СХУ),

когнитивные расстройства (КР), миалгический энцефаломиелит (МЭ). На фоне гиперактивации иммунной системы развиваются иммунотромбозы и коагулопатии с участием нейтрофилов, формирующих NET, и активированных тромбоцитов [8, 12].

Характерной особенностью ПКС является его затяжной, волнообразный и часто рецидивирующий характер, что существенно ухудшает физическую активность и качество жизни пациентов. Астения различной степени тяжести, характеризующаяся постоянным ощущением усталости, не проходящей после отдыха, повышенная утомляемость даже при незначительных нагрузках и снижение работоспособности являются наиболее частыми жалобами пациентов с ПКС. КР проявляются затруднениями с запоминанием и освоением новой информации, снижением концентрации внимания, ухудшением умственной работоспособности, ощущением «тумана в голове» [2].

Разнообразные проявления ПКС непредсказуемы и опасны, поэтому крайне важно оценить у таких пациентов развитие симптоматики, часто сопровождающей течение тяжелых вирусных инфекций с развитием СХУ и КР [5].

При ПКС дисрегуляторные нарушения в противовирусной иммунной защите могут проявляться истощением и функциональной неполноценностью клеток врожденного и адаптивного иммунитета с последующим прогрессированием нарушений молекулярных механизмов, связанных с продукцией интерферона (IFN). При этом, у пациентов в остром периоде COVID-19 и на этапе выздоровления наблюдаются блокада продукции IFN α и IFN γ , повышение уровня нейтрофил-ассоциированных цитокинов, изменение содержания и фенотипа субпопуляций НГ, нарушение их функций [3]. Многочисленные исследования показали, что SARS-CoV-2 индуцирует реактивацию герпесвирусов — вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), цитомегаловируса (ЦМВ), вируса герпеса человека 6 типа (ВЧГ6) [14]. Коинфекция SARS-CoV-2 и герпесвирусов может утяжелять течение каждого из вызываемых данными вирусами заболеваний [13]. Кроме того, у пациентов с хроническими активными герпесвирусными инфекциями с локальными и системными проявлениями присутствуют различные дисрегуляторные нарушения в противовирусной иммунной защите и системе IFN, усугубляющие состояние иммунокомпрометированности у пациентов с ПКС [4].

Диагностика ПКС основывается на характерных симптомах и данных анамнеза, а также проведении дифференциальной диагностики для исключения других возможных причин данного состояния. Лечение ПКС направлено

на облегчение симптомов и улучшение качества жизни пациентов, оно может включать в себя медикаментозную терапию, иммунотерапию и когнитивную реабилитацию. Важно отметить, что ПКС может иметь значительное влияние на повседневную жизнь пациентов, снижая их социальную активность, трудоспособность и общее благополучие.

Цель — уточнить уровни сывороточных про- и противовоспалительных цитокинов, интерферонов альфа и гамма у пациентов с постковидным синдромом, ассоциированным с подтвержденной активацией хронических герпесвирусных инфекций.

Материалы и методы

В группу исследования (ГИ) вошли 60 пациентов (28 женщин, 32 мужчин) в возрасте от 18 до 65 лет, испытывающих различные симптомы и проявления ПКС, ассоциированного с ГВИ, спустя 12 и более недель после перенесенной SARS-CoV-2 инфекции. Анамнестически установлено, что вирус SARS-CoV-2 в остром периоде COVID-19 был идентифицирован в 100% случаев ПЦР-тестом. Сформирована группа сравнения (ГС), состоящая из 60 условно-здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту.

У пациентов ГИ был собран подробный анамнез жизни и заболевания, применялись методы физикального обследования, а также проводилось анкетирование по модифицированной шкале-опроснику для оценки тяжести симптомов ПКС в баллах от 0 до 4 [4].

Для выявления реактивации хронических ГВИ (ВЭБ, ВПГ1/2, ВЧГ6, ВЧГ8, ЦМВ) с целью их детекции проводили ПЦР реального времени (ПЦР-РВ) в слюне и соскобе с миндалин набором «АмплиПрайм» с помощью амплификатора детектирующего QuantStudio 5. Для оценки состояния иммунного ответа на реактивацию ГВИ, выявления интерферонового статуса и цитокинового профиля у пациентов с ПКС, ассоциированным с ГВИ, определяли уровень IFN I и II типов, а также нейтрофил-ассоциированных про- (TNF α , IL-18, IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL-8) и противовоспалительных (IL-4 и IL-10) цитокинов в сыворотке крови наборами «Вектор-Бест» методом твердофазного ИФА с помощью анализатора StatFax 4200 (Awareness Technology, США).

Результаты и обсуждение

В ходе анкетирования было показано, что клинические проявления СХУ и КР различной степени выраженности выявлялись у 100% исследуемых пациентов ГИ. Согласно модифицированной нами 5-балльной шкале (0 баллов —

отсутствие симптомов; 1 балл — минимальные симптомы; 2 балла — средняя выраженность симптомов; 3 балла — тяжелая степень; 4 балла — очень тяжелая степень), общее количество баллов в ГИ составило 17,0 (15,25–19,75) баллов, что в 17 раз больше, чем в ГС — 1,0 балл (0,5–2,0) ($p < 0,05$) (табл. 1).

Наиболее навязчивыми жалобами у пациентов ГИ являлись: снижение работоспособности, повышенная утомляемость, снижение толерантности к физическим нагрузкам, стойкое ощущение хронической усталости. Также все пациенты предъявляли жалобы разной степени выраженности на нарушение когнитивных функций в виде снижения процессов запоминания, трудностей с концентрацией внимания, ощущение «тумана в голове», артралгии, миалгии.

При комплексном исследовании пациентов, прошедших анкетирование, были отобраны 38 человек, предъявляющих наиболее выраженные жалобы на симптомы ПКС и набрав-

шие наибольшее количество баллов согласно опроснику, среди них 20 пациентов отмечали клинические проявления ВПГ-инфекции орорифациальной локализации. Для определения этиологической структуры ГВИ использовали молекулярно-биологические и серологические методы диагностики. С целью детекции ДНК герпесвирусов ВЭБ, ВПГ1/2, ВЧГ6, ВЧГ8, ЦМВ в соскобе с миндалин и слюне использовался метод ПЦР-РВ. Для определения наличия и уровня гуморального иммунного ответа на герпесвирусные инфекции применялся метод ИФА-диагностики: ВЭБ (IgG VCA, IgG EBNA), ВПГ1/2 (IgG HSV 1/2), ВЧГ6 (IgG HHV6), ВЧГ8 (IgG HHV8), ЦМВ (IgG CMV). Сопоставление полученных данных способствовало адекватной полноценной диагностике, подтверждающей реактивацию хронических ГВИ.

Анализ полученных данных позволил выявить варианты микст-герпесвирусной инфекции (микст-ГВИ) с доминированием ВЭБ, при которых частота встречаемости была следую-

Таблица 1. Выраженность клинических проявлений постковидного синдрома у пациентов, перенесших COVID-19 (в баллах) (Me (Q₁; Q₃))

Table 1. Severity of clinical manifestations of postcovid syndrome in patients who underwent COVID-19 (in points) (Me (Q₁; Q₃))

Симптомы Symptoms	Группа сравнения (ГС) Comparison Group n = 60	Группа исследования (ГИ) Study Group n = 60
	Me (Q ₁ ; Q ₃)	Me (Q ₁ ; Q ₃)
Синдром хронической усталости, непереносимость физической нагрузки, снижение работоспособности, повышенная утомляемость Chronic fatigue syndrome, exercise intolerance, decreased performance, increased fatigue	0,5 (0,1; 1,0)	3,0 (2,0; 3,0)*
Снижение процессов запоминания, трудности с концентрацией внимания, ощущение «тумана в голове» Reduced memorization processes, difficulty concentrating, "brain fog"	0,0 (0,0; 0,0)	3,0 (2,0; 3,0)*
Головная боль, головокружение, мигрень Headache, dizziness, migraine	0,5 (0,1; 1,0)	2,0 (2,0; 3,0)*
Артралгии, миалгии Arthralgia, myalgia	0,0 (0,0; 0,0)	2,0 (1,0; 3,0)*
Панические атаки, расстройства настроения, эмоциональная лабильность, психогенная депрессия Panic attacks, mood disorders, emotional lability, psychogenic depression	0,0 (0,0; 0,0)	2,0 (2,0; 2,0)*
Нарушения засыпания и сна Falling asleep and sleep disorders	0,0 (0,0; 0,0)	2,0 (2,0; 2,0)*
Повышенная потливость, субфебрилитет Excessive sweating, subfebrility	0,0 (0,0; 0,0)	1,0 (1,0; 2,0)*
Кашель и одышка Cough and shortness of breath	0,0 (0,0; 0,0)	1,0 (0,0; 1,0)
Клинические проявления герпесвирусных инфекций Clinical manifestations of herpesvirus infections	0,0 (0,0; 0,0)	1,0 (0,0; 2,0)*
Общее количество баллов Total number of points	1,0 (0,5; 2,0)	17,0 (15,25; 19,75)*

Примечание. * — значимость отличий от показателей группы сравнения, $p < 0,05$.

Note. * — the significance of differences from the indicators of the comparison group, $p < 0,05$.

шей: ВЭБ + ВЧГ6 — 5%; ВЭБ + ВПГ1/2 — 28,4%; ВЭБ + ВЧГ6 + ВПГ1/2 — 33,3%; ВЭБ + ВЧГ6 + ВЧГ8 + ВПГ1/2 — 33,3%.

Стоит отметить, что у пациентов с микст-герпесвирусной инфекцией, имеющих детекцию 3 и более вирусов герпеса, с доминированием во всех группах ВЭБ, наблюдались наиболее выраженные и стойкие клинические проявления ПКС, среди которых лидирующее место занимали длительные ощущения СХУ и КР, а выраженность симптомов, согласно опроснику, составила 19 (17–21) баллов. Следует подчеркнуть наиболее важную особенность ГВИ — при динамическом наблюдении у большинства пациентов отмечалась активная репликация ВПГ1/2, ВЭБ, ЦМВ, ВЧГ6, ВЧГ8 даже в период отсутствия некоторых клинических проявлений инфекционного процесса.

Оценка интерферонового статуса позволила выявить снижение уровней $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, что

Таблица 2. Цитокиновый профиль пациентов с ПКС, ассоциированным с активацией герпесвирусных инфекций (Me (Q₁; Q₃))

Table 2. Cytokine profile in patients with PACS, associated with activation of herpesvirus infections (Me (Q₁; Q₃))

Показатели Parameter Me (Q ₁ ; Q ₃)	Группа сравнения (ГС) Comparison Group (n = 60)	Группа исследования (ГИ) Study Group (n = 60)
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/ml	0,1 (0,01; 0,1)	3,95* (1,6; 5,6)
TNFα, пг/мл TNFα, pg/ml	4,43 (2,6; 4,9)	4,15 (2,1; 5,8)
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	12,3 (1,9; 13,1)	1,7 (1,2; 2,8) n = 56
		307,7* (197,2; 357,1) n = 4
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	5,3 (3,5; 5,7)	10,7* (6,4; 16,8)
IL-18, пг/мл IL-18, pg/ml	322,51 (185,5; 381,7)	183 (156,8; 232,9)
IL-17A, пг/мл IL-17A, pg/ml	13,6 (7,7; 21,8)	0,03* (0,01; 0,02) n = 56
		460,95* (374,1; 461,0) n = 4
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	3 (2,5; 3,3)	3,1 (2,0; 4,9), n = 51 15,6* (12,1; 18,2), n = 9
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	2,7 (2,2; 2,9)	3,4 (1,7; 4,95), n = 42 20,0* (18,2; 23,3), n = 18
IFNα, пг/мл IFNα, pg/ml	17,4 (16,2; 25,7)	1,4* (1,0; 3,9)
IFNγ, пг/мл IFNγ, pg/ml	5,7 (5,3; 13,9)	2,3* (1,6; 3,35)

Примечание. * — значимость отличий от показателей группы сравнения, $p < 0,05$.

Note. * — the significance of differences from the indicators of the comparison group, $p < 0,05$.

подтверждает слабую противовирусную защиту у пациентов с ПКС, что сопровождается активацией ГВИ. Уровень $IFN\alpha$ в ГИ оказался значительно ниже (в 12,4 раза) — 1,4 (1,0–3,9) пг/мл по сравнению с ГС — 17,4 (16,2–25,7) пг/мл ($p < 0,05$), при этом, показатели $IFN\gamma$ были ниже в 2,5 раза — 2,3 (1,6–3,35) пг/мл, чем в ГС — 5,7 (5,3–13,9) пг/мл ($p < 0,05$) (табл. 2).

Анализ результатов исследования цитокинового профиля позволил выявить следующие тенденции: концентрация $TNF\alpha$ в исследуемой группе — 4,15 (2,1–5,8) пг/мл не отличалась от значений ГС — 4,43 (2,6–4,9) пг/мл ($p > 0,05$) также, как и уровень IL-18 у пациентов ГИ не показал статистически значимой разницы — 183 (156,8–232,9) пг/мл по сравнению с показателями ГС 322,51 (185,5–381,7) пг/мл ($p > 0,05$). В то же время уровень провоспалительного цитокина IL-1β в ГИ оказался повышенным в 39,5 раз до 3,95 (1,6–5,6) пг/мл против 0,1 (0,01–0,1) пг/мл ($p < 0,05$) в ГС. Повышение концентрации IL-1β имеет тесную связь с активацией иммунного ответа по Th1-пути, что может приводить к воспалительным и деструктивным процессам и являться неблагоприятным фактором для развития нейроиммуновоспаления, лежащего в основе КР [6].

Анализ уровня системного провоспалительного цитокина IL-6 выявил неоднозначный характер изменений: у 56 пациентов ГИ концентрация IL-6 регистрировалась на уровне 1,7 (1,2–2,8) пг/мл и не отличалась от данных ГС ($p > 0,05$), в то же время у 4 пациентов было выявлено значительное повышение уровня IL-6 в 25 раз — 307,7 (197,2–357,1) пг/мл против ГС 12,3 (1,9–13,1) пг/мл ($p < 0,05$). Стоит отметить, что высокое содержание уровня IL-6 в периферической крови регистрировалось у пациентов, перенесших тяжелую форму COVID-19 с последующим развитием тяжелого течения ПКС и предъявляющих наиболее выраженные и стойкие жалобы согласно шкале-опроснику — 19 (17–21) баллов, что в 19 раз больше, чем в ГС — 1,0 балл (0,5–2,0) ($p < 0,05$), и было ассоциировано с микст-ГВИ с доминированием ВЭБ, подтвержденными лабораторными исследованиями.

Исследование IL-17A в ГИ выявило также неоднозначные данные: так, у 56 пациентов было отмечено снижение уровня IL-17A до 0,03 (0,01–0,02) пг/мл, и, напротив, у 4 пациентов с микст-ГВИ регистрировалось повышение IL-17A в 34 раза [460,95 (374,1–461,0)] пг/мл по сравнению с ГС [13,6 (7,7–21,8)] пг/мл ($p < 0,05$).

Уровень концентрации IL-8 в ГИ был повышен в 2 раза — 10,7 (6,4–16,8) пг/мл по сравнению с ГС 5,3 (3,5–5,7) пг/мл ($p < 0,05$).

Анализ уровня противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 также выявил изменения

их концентрации в сыворотке крови. Так, было отмечено повышение уровня IL-4 у 42 пациентов ГИ в 1,3 раза — 3,4 (1,7–4,95) пг/мл, а у 18 пациентов в 7,5 раз — 20,0 (18,2–23,3) пг/мл против ГС 2,7 (2,2–2,9) пг/мл ($p_{1,2} < 0,05$). В то же время показатели IL-10 у 51 пациента составили 3,1 (2,0–4,9) пг/мл и не отличались от ГС ($p_1 > 0,05$), а у 9 пациентов были повышены в 5,2 раза — 15,6 (12,1–18,2) пг/мл против ГС 3 (2,5–3,3) пг/мл ($p < 0,05$). Пациенты с повышенным уровнем IL-4 и IL-10 предъявляли различные жалобы на симптомы ПКС среднего и тяжелого вариантов течения, также у данных пациентов отмечалась активация микст-ГВИ с доминированием ВЭБ.

Заключение

Чрезмерные воспалительные реакции, которые являются следствием воздействия SARS-CoV-2, зависят также от наличия или отсутствия сопутствующих заболеваний и характеризуются повышенным высвобождением провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, на фоне недостаточной продукции IFN α и IFN γ , что приводит к формированию «цитокинового шторма», коагулопатии, тромбоемболии [7, 15].

Ранее нами были показаны данные о дефекте фагоцитарной и микробицидной функциях НГ, что, по нашему мнению, сопряжено с уменьшением уровня IL-17A в сыворотке кро-

ви, выявленном в настоящем исследовании [1]. В то же время сохраняющаяся мультисистемная воспалительная реакция подтверждается повышенным уровнем IL-6 и IL-17A, что обуславливает тяжелое течение ПКС. Детектированная гиперпродукция IL-1 β сопровождалась клиническими проявлениями стойкого нейроиммуновоспаления в постковидном периоде.

Выявленный дефицит IFN α и IFN γ обуславливает дисрегуляторные нарушения в противовирусной иммунной защите, что способствует активации ГВИ у пациентов с ПКС и, по-видимому, способствует дефектному функционированию НГ у пациентов с ПКС [1]. Позитивная регуляторная роль рекомбинантного IFN α 2b на дефектно функционирующие НГ с уменьшением их агрессивного действия у пациентов с ПКС и реактивацией ГВИ была подтверждена нашими экспериментальными исследованиями в системе *in vitro* [1].

Таким образом, выявленный нами у пациентов в постковидном периоде дисбаланс цитокинов на фоне дефицита IFN α и IFN γ косвенно свидетельствует о развитии нейроиммуновоспаления не только после перенесенного COVID-19, но и при ПКС, ассоциированным с активацией хронических ГВИ с доминированием ВЭБ, что сопровождается такими ведущими клиническими признаками ПКС, как СХУ и КР, нарушающими качество жизни пациентов.

Список литературы/References

- Атажахова М.Г., Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Матушкина В.А., Ковалева С.В., Чапурина В.Н. Позитивные эффекты рекомбинантного интерферона α 2b на фенотип субпопуляции CD16⁺IFN α / β RI⁺CD119⁺, CD16⁺IFN α / β RI⁺CD119 нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с постковидным синдромом и герпесвирусными инфекциями // Российский иммунологический журнал. 2023. Т. 26, № 4. С. 647–656. [Atazhakhova M.G., Nesterova I.V., Chudilova G.A., Matushkina V.A., Kovaleva S.V., Chapurina V.N. Positive effects of recombinant interferon α 2b on the phenotype of the CD16⁺IFN α / β RI⁺CD119⁺, CD16⁺IFN α / β RI⁺CD119 neutrophil granulocytes subpopulation in patients with postcovid syndrome and herpesvirus infections. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, vol. 26, no. 4. pp. 647–656. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028–7221-13908-PEO.
- Ковальчук В.В., Дроздова М.С., Чепель Ю.А., Нестерин К.В. Постковидный синдром. Мифы и реалии // Эффективная фармакотерапия. 2022. Т. 18, № 23. С. 20–26. [Kovalchuk V.V., Drozdova M.S., Chepel Yu.A., Nesterin K.V. Postcovid syndrome. Myths and realities. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, vol. 18, no. 23, pp. 20–26. (In Russ.)]
- Нестерова И.В., Горodin В.Н., Матушкина В.А., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Халтурина Е.О., Тетерин Ю.В., Ломтатидзе Л.В., Пирогова А.И. Неоднозначная роль нейтрофильных гранулоцитов в иммунопатогенезе COVID-19: взаимосвязь с дисбалансом провоспалительных нейтрофил-ассоциированных цитокинов и дефицитом интерферона- α // Инфекционные болезни. 2022. Т. 20, № 4. С. 12–24. [Nesterova I.V., Gorodin V.N., Matushkina V.A., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Khalturina E.O., Teterin Yu.V., Lomtadze L.V., Pirogova A.I. The ambiguous role of neutrophil granulocytes in the immunopathogenesis of COVID-19: the relationship with the imbalance of pro-inflammatory neutrophil-associated cytokines and interferon- α deficiency. *Infektsionnyye bolezni = Infectious Diseases*, 2022, vol. 20, no. 4, pp. 12–24. (In Russ.)]
- Нестерова И.В., Халтурина Е.О., Малиновская В.В. Клинико-иммунологическая эффективность интеграционной программы реабилитации иммунной системы у пациентов с атипичной хронической активной герпесвирусной инфекцией до и во время COVID-19, а также в постковидном периоде // Эффективная фармакотерапия. 2022. Т. 18, № 37. С. 30–41. [Nesterova I.V., Khalturina E.O., Malinovskaya V.V. Clinical and immunological effectiveness of the integration program for the rehabilitation of the immune system in patients with atypical chronic active herpesvirus coinfection before and during COVID-19, as well as in the postcovid period. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, vol. 18, no. 37, pp. 30–41. (In Russ.)]
- Хасанова Д.Р., Житкова Ю.В., Васкаева Г.Р. Постковидный синдром: обзор знаний о патогенезе, нейропсихиатрических проявлениях и перспективах лечения // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2021. Т. 13, № 3. С. 93–98.

- [Khasanova D.R., Zhitkova Yu.In, Maskaeva G.R. Postcovid syndrome: a review of knowledge about pathogenesis, neuropsychiatric manifestations and treatment prospects. *Nevrologiya, neyropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*, 2021, vol. 13, no. 3, pp. 93–98. (In Russ.)]
6. Coperchini F., Chiovato L., Croce L., Magri F., Rotondi M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2020, vol. 53, pp. 25–32.
 7. Costela-Ruiz V.J., Illescas-Montes R., Puerta-Puerta J.M., Ruiz C., Melguizo-Rodriguez L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2020, vol. 54, pp. 62–75.
 8. Davis H.E., McCorkell L., Vogel J.M., Topol E.J. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2023, vol. 21, no. 3, pp. 133–146.
 9. Gedefaw L., Ullah S., Leung P.H.M., Cai Y., Yip S.P., Huang C.L. Inflammasome Activation-Induced Hypercoagulopathy: Impact on Cardiovascular Dysfunction Triggered in COVID-19 Patients. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 4, 916. doi: 10.3390/cells10040916.
 10. Inoue S., Hatakeyama J., Kondo Y., Hifumi T., Sakuramoto H., Kawasaki T., Taito S., Nakamura K., Unoki T., Kawai Y., Kenmotsu Y., Saito M., Yamakawa K., Nishida O. Post-intensive care syndrome: its pathophysiology, prevention, and future directions. *Acute Med. Surg.*, 2019, vol. 6, no. 3, pp. 233–246.
 11. Oronsky B., Larson C., Hammond T.C., Oronsky A., Kesari S., Lybeck M., Reid T.R. A Review of Persistent Post-COVID Syndrome (PPCS). *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2023, vol. 64, no. 1, pp. 66–74.
 12. Ouwendijk W.J.D., Raadsen M.P., van Kampen J.J.A., Verdijk R.M., von der Thusen J.H., Guo L., Hoek R.A.S., van den Akker J.P.C., Endeman H., Langerak T., Molenkamp R., Gommers D., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Verjans G.M.G.M., Haagmans B.L. High Levels of Neutrophil Extracellular Traps Persist in the Lower Respiratory Tract of Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *J. Infect. Dis.*, 2021, vol. 223, no. 9, pp. 1512–1521.
 13. Saade A., Moratelli G., Azoulay E., Darmon M. Herpesvirus reactivation during severe COVID-19 and high rate of immune defect. *Infect. Dis. Now.*, 2021, vol. 51, no. 8, pp. 676–679.
 14. Simonnet A., Engelmann I., Moreau A.S., Garcia B., Sixa S., Kalioubie A.E., Robriquet L., Hober D., Jourdain M. High incidence of Epstein–Barr virus, cytomegalovirus, and human-herpes virus-6 reactivations in critically ill patients with COVID-19. *Infect. Dis.*, 2021, vol. 51, no. 3, pp. 296–299.
 15. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult in patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10229, pp. 1054–1062.

Авторы:

Атажахова М.Г., старший преподаватель кафедры физиологии и общей патологии ФГБОУ ВО Майкопский государственный технологический университет, г. Майкоп, Республика Адыгея; аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия;

Чудилова Г.А., д.б.н., доцент, зав. отделом клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия;

Ломтатидзе Л.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия;

Поезжаев Е.А., студент 6 курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия.

Authors:

Atazhakhova M.G., Senior Lecturer, Department of Physiology and General Pathology, Maikop State Technological University, Maikop, Republic of Adygea; Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation;

Chudilova G.A., DSc (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory, Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation;

Lomtatidze L.V., PhD (Biology), Senior Research Associate of the Department of Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory, Associate Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation;

Poezhaev E.A., 6th year Student of Pediatric Faculty, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation.

БРОНХООБСТРУКТИВНЫЙ СИНДРОМ И ФЕРМЕНТЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ

Н.И. Косякова¹, М.В. Акуленко²

¹ ФГБАУЗ Больница Пушчинского научного центра РАН, г. Пушкино, Россия

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пушкино, Россия

Резюме. Бронхообструктивный синдром (БОС) после перенесенной коронавирусной инфекции характеризуется длительным, сухим, мучительным кашлем, трудным для лечения, существенно снижающим качество жизни пациентов. Цель: изучить особенности клинических проявлений впервые диагностированного БОС у пациентов разных возрастных групп в постковидном периоде и оценить степень митохондриальной дисфункции по дисбалансу ферментов энергетического обмена клеток. *Материалы и методы.* Наблюдались в динамике, в течение 2-х лет, 298 пациентов с впервые диагностированным бронхообструктивным синдромом, в возрасте 18–78 лет. Проводилось стандартное клинико-лабораторное и функциональное обследование, для оценки качества жизни использовался опросник святого Георгия (SGRQ). Митохондриальную дисфункцию определяли по соотношению ферментов энергетического обмена в лимфоцитах периферической крови — лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ). Для статистического анализа использовали программное обеспечение STATISTICA 10.1. *Результаты.* Продолжительность и тяжесть проявления БОС возрастала с возрастом и была наиболее выраженной в возрастной группе 60 лет и старше. Диагноз бронхиальной астмы впервые был установлен у 85 пациентов, преимущественно в возрасте 18–25 лет. Коэффициент SGRQ более 50% был у всех пациентов с БОС, коморбидность была установлена у 82,4%. В группе 60 лет и старше (n = 86) отмечена самая длительная продолжительность БОС (49,4±3,5 дней). Соотношение ЛДГ/СДГ снизилось с 6 до 4,8–5,2 усл.ед. во всех возрастных группах. Такие изменения важно учитывать у пациентов молодого возраста. *Заключение.* Установленные низкие показатели соотношения ЛДГ/СДГ ранее в доступной литературе не встречались, что указывает на вторичную митохондриальную дисфункцию в постковидном периоде, как у молодых, так и у лиц старших возрастных групп, особенно у пациентов с более тяжелым течением БОС. Оценка этого показателя позволяет получить персонализированную характеристику для каждого пациента, что важно для оценки эффективности и продолжительности проводимой антиоксидантной терапии.

Ключевые слова: постковидный синдром, бронхообструктивный синдром, ферменты энергетического обмена клеток.

BRONCHO-OBSTRUCTIVE SYNDROME AND THE ENZYMES OF CELLULAR ENERGY METABOLISM AFTER CORONAVIRUS INFECTION

Kosyakova N.I.^a, Akulenko M.V.^b

^a Hospital of the Pushchinsky Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

^b Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

Abstract. Broncho-obstructive syndrome (BOS) after coronavirus infection is characterized by long-term, dry and painful cough which is hard for treatment, significantly reducing the quality of life of the patients. The goal of the

Адрес для переписки:

Косякова Нинель Ивановна
142290, Россия, Московская область, г. Пушкино,
ул. Институтская, 1, ФГБАУЗ Больница Пушчинского
научного центра РАН.
Тел.: 8 (916) 469-69-19. E-mail: nelia_kosyakova@mail.ru

Contacts:

Ninel I. Kosyakova
142290, Russian Federation, Moscow Region, Pushchino,
Institutskaya str., 1, Hospital of the Pushchinsky Scientific Center.
Phone: +7 (916) 469-69-19. E-mail: nelia_kosyakova@mail.ru

Для цитирования:

Косякова Н.И., Акуленко М.В. Бронхообструктивный синдром и ферменты энергетического обмена в постковидном периоде // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 495–499. doi: 10.15789/2220-7619-BSA-16895

Citation:

Kosyakova N.I., Akulenko M.V. Broncho-obstructive syndrome and the enzymes of cellular energy metabolism after coronavirus infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 495–499. doi: 10.15789/2220-7619-BSA-16895

© Косякова Н.И., Акуленко М.В., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-BSA-16895>

study: to investigate the specific features of clinical manifestations of BOS diagnosed for the first time in patients belonging to different age groups in post-COVID-19 period and to estimate the degree of mitochondrial dysfunction by the imbalance of the enzymes of cellular energy metabolism. *Materials and methods.* 298 patients with BOS (age 18–78) were observed continuously for 2 years. Standard clinical, biochemical and functional examination was carried out, Saint George's Respiratory Questionnaire (SGRQ) was used. Mitochondrial dysfunction was determined by the ratio of levels of two enzymes, lactate dehydrogenase (LDH) and succinate dehydrogenase (SDH), in peripheral blood lymphocytes. Statistical data processing was performed in STATISTICA 10.1 program package. *Results.* The duration and severity of BOS manifestations increased with age, they were the most prominent in the age group older than 60 y/o. Bronchial asthma was diagnosed for the first time in 85 patients, most of them belonging to the group 18–25 y/o. In all the patients with BOS, the SGRQ coefficient was above 50, and comorbidity was established in 82.4% of the patients. The longest duration of BOS (49.4 ± 3.5 days) was established in the group older than 60 y/o ($n = 86$). LDH/SDH ratio decreased from 6 to 4.8–5.2 a.u. in all the age groups. Such changes should be taken into account in the patients from young age groups. *Conclusion.* The revealed low values of LDH/SDH ratio have not been shown in the available literature earlier. These values demonstrate the development of secondary mitochondrial dysfunction in post-COVID-19 period in both younger and older age groups, particularly, in patients with more severe progression of BOS. Estimation of this parameter would allow to reveal the personified characteristics for each patients, which is important for quantifying the efficacy and duration of the required antioxidant therapy.

Key words: *post-COVID-19 syndrome, broncho-obstructive syndrome, enzymes of cellular energy metabolism.*

Введение

В постковидном периоде у переболевших возникают проблемы с органами дыхания, сердечно-сосудистой, эндокринной, нервной системами, метаболические нарушения и другие осложнения [4]. Все чаще стал регистрироваться бронхообструктивный синдром (БОС), в основе которого лежит бронхиальная гиперреактивность на фоне диффузного повреждения эпителия и повышенной чувствительности кашлевых рецепторов трахеобронхиального дерева [11, 12]. В патологический процесс вовлекается эндотелий сосудов, запускается воспалительный каскад, развивается коагулопатия с микротромбообразованием, ангиопатия и гипоксия тканей [8]. Вирус повреждает так же внутреннюю мембрану митохондрий, нарушается функция ферментов дыхательной цепи, повышается выработка активных форм кислорода со вторичным повреждением митохондриальных мембран, гиперстимуляцией иммунного ответа [5, 6, 10]. Известно, что митохондриальная дисфункция так же приводит к продукции и накоплению активных форм кислорода (АФК), которые оказывают влияние на процессы, происходящие в клетке. Кроме того, в митохондриях NO-синтазой продуцируется оксид азота, который, вместе с АФК, повреждает сами митохондрии и другие клеточные структуры [14]. Наиболее информативным ферментом, определяющим функциональную активность митохондрий, является сукцинатдегидрогеназа (СДГ), которая участвует в формировании электронно-транспортной цепи и цикле Кребса, прочно связана с внутренней мембраной митохондрий [15]. В энергетическом обмене клеток участвует также и лактатдегидрогеназа (ЛДГ), которая катализирует

окисление молочной кислоты в пируват и содержится практически во всех клетках организма. При заболеваниях, сопровождающихся повреждением тканей и разрушением клеток, уровень ЛДГ в крови повышается, что дает основание считать ЛДГ важным маркером тканевой деструкции [9]. Дальнейшее изучение звеньев патогенеза постковидного синдрома позволит более дифференцированно проводить иммунореабилитацию в постковидном периоде. Цель: изучить особенности клинических проявлений впервые диагностированного БОС у пациентов разных возрастных групп в постковидном периоде, ранее не имевших заболеваний респираторного тракта, и оценить степень митохондриальной дисфункции по дисбалансу ферментов энергетического обмена клеток (ЛДГ и СДГ).

Материалы и методы

Наблюдались в динамике, в течение 2-х лет, 298 пациентов с клиническими проявлениями БОС, ранее не имевших заболевания респираторного тракта, в возрасте 18–78 лет. Все пациенты подписывали информированное согласие. Исследование было одобрено ЛЭК БПНЦ РАН, протокол № 24 от 30.11.2021 г. Работа выполнялась в рамках Госзадания FNSZ-2023-006. Пациенты с клиническими признаками постковидного синдрома для продолжения курса реабилитации поступали в отделение иммунологии и аллергологии Б ПНЦ РАН через 3 месяца после острых проявлений вирусной инфекции SARS-CoV-2, с 3-кратным отрицательным результатом ПЦР ДНК(–). Для оценки клинических проявлений БОС в возрастных группах пациенты были распределены на 3 группы: 1 группа в возрасте 18–39 лет ($n = 46$),

2 группа в возрасте 40–59 лет ($n = 121$) и в возрасте 60 лет и старше ($n = 131$). Во всех возрастных группах преобладали лица женского пола: мужчин — 30%, женщин — 70%. Проводилось стандартное клинико-лабораторное и функциональное обследование, в динамике КТ исследование органов грудной клетки, использовался опросник святого Георгия (SGRQ) [1]. Митохондриальную дисфункцию определяли по соотношению ферментов энергетического обмена в лимфоцитах периферической крови: ЛДГ/СДГ [3].

Для статистического анализа использовали программное обеспечение Statistica 10.1.

Результаты и обсуждение

БОС как у молодых, так и у пожилых пациентов, характеризовался длительным сухим, мучительным кашлем, торпидным к стандартной терапии. Продолжительность и тяжесть проявления БОС возрастала с возрастом и была наиболее выраженная в возрастной группе 60 лет и старше ($49,4 \pm 3,5$ дней). Диагноз бронхиальной астмы впервые установлен у 85 пациентов, преимущественно в возрасте 18–25 лет. Показатели ОФВ₁ у пациентов 1 группы были снижены незначительно ($78 \pm 4\%D$), в этой же группе был выше процент курящих — 68% по сравнению с группой 2 — 54% и 3 группы — 46%. Во 2 группе ОФВ₁ был ниже — $69 \pm 9\%D$ и в 3 группе — $54 \pm 7\%D$. Несмотря на то, что у большинства пациентов клиническая картина острого периода коронавирусной инфекции была осложнена изменениями в легких (86%), половина обследуемых перенесли заболевание в легкой форме (49%) и лечились амбулаторно. Обращает на себя внимание высокая распространенность сопутствующей патологии у пациентов старше 40 лет: артериальная гипертензия — АГ (81%), ожирение — 70%, сахарный диабет 2-го типа — СД₂ (26%), ишемическая болезнь сердца — ИБС (23%), что соответствует данным различных исследований о высокой частоте сопутствующей патологией у лиц разных возрастных групп [2, 7]. Клинически у пациентов с БОС в постковидном периоде так же отмечается учащенное дыхание (тахипноэ) после малейшей нагрузки (21%), дискомфорт или боли в грудной клетке (16%), апноэ сна (8%) и угроза развития легочного фиброза (5%) [13]. Общий балл качества жизни по опроснику святого Георгия (SG RQ) на момент поступления был более 50 у всех пациентов с БОС. Через год в 1 группе наблюдения показатель снизился на $21 \pm 6,4$, во 2 группе — на $16 \pm 7,9$ и в 3 группе на $11,3 \pm 4,4$, что указывало на сохраняющееся воспаление в респираторном тракте. Наиболее низкие показатели физического компонента

здоровья зарегистрированы у пациентов 3 группы. У пациентов 2 и 1 групп наблюдения низкие показатели физического компонента здоровья оказывались сниженными соответственно у 68 и 52%. Более 50% пациентов старше 40 лет испытывали определенные трудности в выполнении ежедневных задач, в отличие от более молодых пациентов. У 46,2% пациентов в анализах крови наблюдалась лейкопения ($2,5 \pm 0,9$ г/л) и стойкая лимфоцитопения ($0,93 \pm 1,02$ кл/мкл), у 12,6% отмечена умеренно выраженная анемия ($106 \pm 12,9$ г/л). Выявлялись повышенными значения СРБ — $5,82 \pm 1,02$ мг/дл и АЛТ/АСТ — $48,63 \pm 9,6/37 \pm 6,4$ мМоль/л. Активность ферментов в лимфоцитах крови пациентов и группы контроля, измеряли разработанным авторами ЦБХ методом путем определения количества продукта реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ). В качестве биомаркеров процессов переключения путей окисления в клетке использовали два фермента: сукцинатдегидрогеназа (СДГ) — как показатель активности митохондриального дыхания, лактатдегидрогеназа (ЛДГ) — как показатель одного из восстановительных путей поддержания биосинтезов — гликолиза и его динамического фонда взаимопревращений молочнокислой и пировиноградной кислот. Одновременное определение активности СДГ и ЛДГ дает большую полноту картины окислительного обмена в клетке, которая недоступна в исследованиях выделенных митохондрий [3]. Группу контроля составили 22 условно здоровых пациентов без клинико-лабораторного подтверждения патологии со стороны респираторного тракта и тяжелых сердечно-сосудистых и эндокринных заболеваний.

Результаты измерения активностей сукцинатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы у вышеперечисленных групп пациентов представлены на рис. 1.

В 1 группе активности СДГ и ЛДГ практически не изменились и имели близкие значения при обследовании в 2023 и в 2024 гг., кроме того, их активность приближена к ранее установленному диапазону, характерному для контрольных групп условно здоровых людей. Гиперактивация активности СДГ, которая наблюдалась у пациентов 2 группы в течение 2023 г., показала в 2024 г. тенденцию к снижению (на 18%), но статистически не достоверную. Сниженные значения активности ЛДГ, наблюдаемые в 2023 г в этой группе возросли статистически достоверно в 2024 г. на 29%, что настораживает и требует более тщательного наблюдения и контрольного КТ органов дыхания. В группе 3 у пациентов 60 лет и старше, наблюдаемое в 2023 г. значительное снижение активностей как СДГ, так и ЛДГ, в течение года

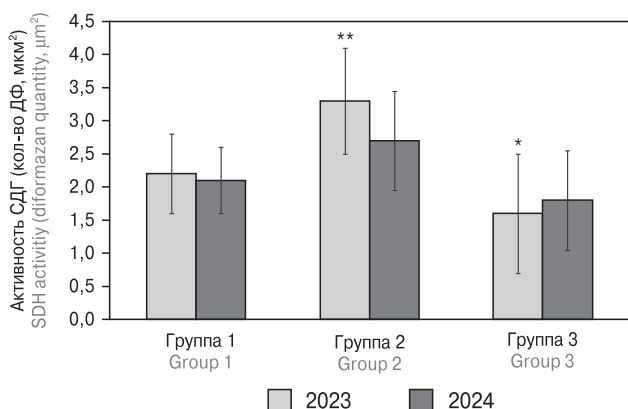


Рисунок 1. Средние значения активностей СДГ в обследуемых группах в 2023 и 2024 гг.

Figure 1. The average values of SDH and LDH activities in the surveyed groups in 2023 and 2024

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm SD$, * — отличия достоверны от группы № 1 $p < 0,05$, ** — отличия достоверны от группы № 1 $p < 0,005$

Note. The data are presented in the form of $M \pm SD$, * — the differences are significant from group No. 1 $p < 0.05$, ** — the differences are significant from group No. 1 $p < 0.005$.

увеличились лишь на 13 и 10% соответственно и статистически эти изменения не достоверны. Сохранение такого дефицита внутриклеточной энергии в организме требует дополнительного внимания.

Заключение

Бронхообструктивный синдром в постковидном периоде регистрируется более чем у 30% пациентов и протекает длительно, сопровождается мучительным, сухим кашлем. У пациентов старших возрастных групп БОС имеет тенденцию к более тяжелому течению, сопровождается снижением функции дыхания. Качества жизни и показатели ОФВ1 в постковидном периоде у пациентов всех возрастных групп существенно снижаются и медленно возвращаются к исходным показателям через 4–8 недель. Особенно важно это учитывать у лиц молодого возраста. Анализ ферментов энергетического

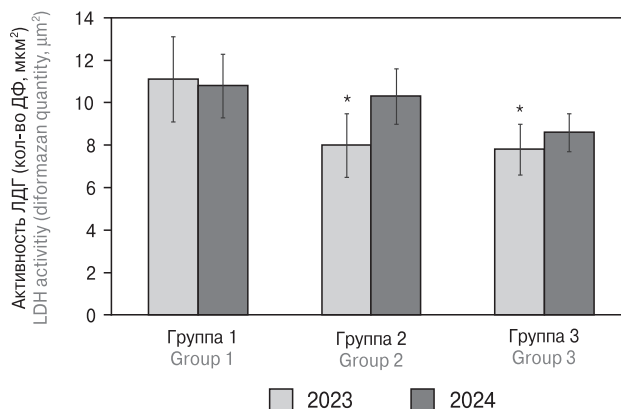


Рисунок 2. Средние значения активностей ЛДГ в обследуемых группах в 2023 и 2024 гг.

Figure 2. The average values of SDH and LDH activities in the surveyed groups in 2023 and 2024

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm SD$, * — отличия достоверны от группы № 1 $p < 0,05$, ** — отличия достоверны от группы № 1 $p < 0,005$.

Note. The data are presented in the form of $M \pm SD$, * — the differences are significant from group No. 1 $p < 0.05$, ** — the differences are significant from group No. 1 $p < 0.005$.

обмена клеток показал, что снижение гиперактивной СДГ и снятие ее ингибирования на фоне проводимой терапии можно считать благоприятным показателем. Нормализация процессов гликолиза (активность ЛДГ), отвечающего за поддержание восстановительных процессов и являющегося маркером destruction тканей, является залогом восстановления механизмов энергообеспечения в организме. Выявленные нарушения в балансе ферментов энергетического обеспечения клеток указывает на вторичную митохондриальную дисфункцию в постковидном периоде, как у молодых, так и у лиц старших возрастных групп, особенно у пациентов с более тяжелым течением БОС. Оценка этих показателей позволяет получить персонализированную характеристику для каждого пациента, что важно для оценки эффективности и продолжительности проводимой терапии, комплекса реабилитационных мероприятий и выбора антиоксидантной терапии.

Список литературы/References

- Бурячковская Л.И., Мелькумянц А.М., Ломакин Н.В., Антонова О.А., Ермишкин В.В. Повреждение сосудистого эндотелия и эритроцитов у больных COVID-19 // *Consilium Medicum*. 2021. Т. 23, № 6. С. 469–476. [Buryachkovskaya L.I., Melkumyants A.M., Lomakin N.V., Antonova O.A., Ermishkin V.V. Damage to vascular endothelium and erythrocytes in patients with COVID-19. *Consilium Medicum*, 2021, vol. 23, no 6, pp. 469–476. (In Russ.)] doi: 10.26442/20751753.2021.6.200939
- Косякова Н.И., Захарченко М.В., Шварцбург П.М., Кондрашова М.Н., Исследование ферментов лимфоцитов крови с целью разработки чувствительного метода диагностики и коррекции патологии энергетического обмена при хронической обструктивной болезни легких у пожилых больных // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2018. № 11 (часть 2). С. 277–282. [Kosyakova N.I., Zakharchenko M.V., Shvartsburg P.M., Kondrashova M.N., Study of blood lymphocyte enzymes in order to develop a sensitive method for diagnosing and correcting the pathology of energy metabolism in chronic obstructive pulmonary disease in elderly patients. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2018, no. 11 (part 2), pp. 277–282. (In Russ.)] doi: 10.17513/mjpf.12490

3. Никифорова О.Л., Галиновская Н.В., Воропаев Е.В. Оценка качества жизни пациентов, перенесших инфекцию COVID-19 в легкой и среднетяжелой формах // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. 2023. № 1. С. 75–81. [Nikiforova O.L., Galinovskaya N.V., Voropaev E.V. Assessment of the quality of life of patients who have suffered from COVID-19 infection in mild and moderate forms. *Mediko-biologicheskie problemy zhiznedeyatel'nosti = Medical and Biological Problems of Vital Activity*, 2023, no. 1, pp. 75–81. (In Russ.)] doi: 10.58708/2074-2088.2023-1(29)-75-81
4. Новиков В.Е., Левченкова О.С., Пожилова Е.В. Митохондриальная синтаза оксида азота и ее роль в механизмах адаптации клетки к гипоксии // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2016. Т. 14, № 2. С. 38–46. [Novikov V.E., Levchenkova O.S., Pozhilova E.V. Mitochondrial nitric oxide synthase and its role in the mechanisms of cell adaptation to hypoxia. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii = Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2016, vol. 14, no. 2, pp. 38–46. (In Russ.)] doi: 10.17816/RCF14238-46
5. Северин С.Е. Биологическая химия с упражнениями и задачами / Под ред. С.Е. Северина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 624 с. [Severin S.E. Biological chemistry with exercises and tasks / Ed. S.E. Severi. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 624 p. (In Russ.)]
6. Burtcher J., Cappellano G., Omori A., Koshiba T., Millet G.P. Mitochondria: In the Cross Fire of SARS-CoV-2 and Immunity. *iScience*, 2020, vol. 23, no. 10: 101631. doi: 10.1016/j.isci.2020.101631
7. Gibellini L., De Biasi S., Paolini A., Borella R., Boraldi F., Mattioli M., Lo Tartaro D., Fidanza L., Caro-Maldonado A., Meschiari M., Iadisernia V., Vacca E., Riva G., Cicchetti L., Quaglino D., Guaraldi G., Busani S., Girardis M., Mussini C., Cossarizza A. Altered bioenergetics and mitochondrial dysfunction of monocytes in patients with COVID-19 pneumonia. *EMBO Mol. Med.*, 2020, vol. 12, no. 12: e13001. doi: 10.15252/emmm.202013001
8. Gao Y.D., Ding M., Dong X., Zhang J.J., Kursat Azkur A., Azkur D., Gan H., Sun Y.L., Fu W., Li W., Liang H.L., Cao Y.Y., Yan Q., Cao C., Gao H.Y., Brüggem M.C., van de Veen W., Sokolowska M., Akdis M., Akdis C.A. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: a review. *Allergy*, 2021, vol. 76, no. 2, pp. 428–455. doi: 10.1111/all.14657
9. Lopez-Leon S., Wegman-Ostrosky T., Perelman C., Sepulveda R., Rebolledo P.A., Cuapio A., Villapol S. More than 50 Long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *medRxiv [Preprint]*, 2021: 2021.01.27.21250617. doi: 10.1101/2021.01.27.21250617
10. Salivonchik D., Salivonchik E. Energy COVID-19 collapse: new diagnostic markers, treatment aspects. *Journal of Cardiorespiratory Research*, 2021, vol. 2, iss. 2, pp. 68–76. doi: 10.26739/2181-0974-2021-2-12
11. Shi H., Han X., Jiang N., Cao Y., Alwalid O., Gu J., Fan Y., Zheng C. Radiological findings from 81 patients with COVID-19 pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 4, pp. 425–434. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30086-4
12. Song W.J., Hui C.K.M., Hull J.H., Birring S.S., McGarvey L., Mazzone S.B., Chung K.F. Confronting COVID-19-associated cough and the post-COVID syndrome: role of viral neurotropism, neuroinflammation, and neuroimmune responses. *Lancet Respir. Med.*, 2021, vol. 9, no. 5, pp. 533–544. doi: 10.1016/S2213-2660(21)00125-9
13. Woodruff P.G., Fahy J.V. Asthma: prevalence, pathogenesis, and prospects for novel therapies. *JAMA*, 2001, vol. 286, no. 4, pp. 395–398. doi: 10.1001/jama.286.4.395
14. Wood E., Hall K.H., Tate W. Role of mitochondria, oxidative stress and the response to antioxidants in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: a possible approach to SARS-CoV-2 “long-haulers”? *Chronic Dis. Transl. Med.*, 2021, vol. 7, no. 1, pp. 14–26. doi: 10.1016/j.cdtm.2020.11.002
15. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 13, pp. 1239–1242. doi: 10.1001/jama.2020.2648

Авторы:

Косякова Н.И., д.м.н., зам. главного врача по науке, зав. отделением иммунологии и аллергологии ФГБАУЗ Больница Пушкинского научного центра РАН, г. Пушкино, Россия;
Акуленко М.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пушкино, Россия

Authors:

Kosyakova N.I., DSc (Medicine), Deputy Chief Medical Officer for Science, Head of the Department of Immunology and Allergology, Hospital of the Pushchinsky Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation;
Akulenko M.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation.

Поступила в редакцию 03.04.2024
 Принята к печати 05.04.2024

Received 03.04.2024
 Accepted 05.04.2024

ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ МИКРОГЛИИ У МЫШЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ВПГ-1

И.Д. Булгакова^{1,2}, В.В. Зверев^{1,2}, Е.О. Кравцова², Г.Н. Усатова², Д.А. Шойхет²,
Е.А. Задворных², А.А. Шумкина²

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

²ФГАУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Резюме. Введение. На сегодняшний день неуклонно растет количество людей с нейродегенеративной патологией. За последние годы появляется все больше информации о роли микроглии в развитии этих заболеваний. Исследования на животных показывают, что периферические воспалительные стимулы могут активировать микроглию в головном мозге, что указывает на важную роль этих клеток в развитии нейродегенерации. Под действием разных факторов микроглия может изменять свой фенотип и участвовать как в репарации, так и в повреждении клеток головного мозга. Еще одним известным фактором развития различных нейродегенеративных патологий является хроническая герпесвирусная инфекция, вызванная ВПГ-1 (вирусом простого герпеса 1 типа), однако точные патогенетические механизмы до сих пор неизвестны, тем не менее изучение влияния этого вируса на микроглию имеет большой потенциал. В связи с этим целью этой работы стала оценка влияния ВПГ-1 на изменение фенотипов микроглии у линии мышей, обладающих обычной восприимчивостью к данному вирусу, и у линии, более устойчивой к действию ВПГ-1, путем определения цитокинового профиля. Также нами было проведено сравнение межлинейных различий экспрессии генов цитокинов в контрольных группах. **Материалы и методы.** В исследовании проводилось заражение мышей линий C57BL/6 и BALB/c вирусом простого герпеса 1 типа, микроглию получали с использованием прерывистого градиента плотности, цитокиновый профиль оценивали по уровням экспрессии генов с использованием ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией, подсчет осуществлялся по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$, статистическую значимость определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни. **Результаты.** Межлинейных различий экспрессии генов цитокинов в контрольных группах разных линий мышей не было обнаружено. При этом экспрессия генов отличалась в экспериментальных группах: у мышей линии BALB/c увеличивалась экспрессия генов как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, у мышей линии C57BL/6 наблюдалось незначительное увеличение экспрессии генов IL-1 β . **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о формировании различных фенотипов микроглии после перенесенной ВПГ-1 инфекции у разных линий мышей. По всей видимости, у мышей линии BALB/c происходит переключение с провоспалительного M1-фенотипа микроглии на противовоспалительный M2-фенотип, в то время как у мышей линии C57BL/6 затухание инфекционного процесса происходит через возвращение к исходному M0-фенотипу.

Ключевые слова: IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF α , TGF- β , цитокины, экспрессия генов, ВПГ-1, микроглия, нейродегенерация.

Адрес для переписки:

Булгакова Ирина Дмитриевна
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
E-mail: bulgakova_i_d@staff.sechenov.ru

Contacts:

Irina D. Bulgakova
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a,
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
E-mail: bulgakova_i_d@staff.sechenov.ru

Для цитирования:

Булгакова И.Д., Зверев В.В., Кравцова Е.О., Усатова Г.Н., Шойхет Д.А.,
Задворных Е.А., Шумкина А.А. Изменение цитокинового профиля
микроглии у мышей под действием ВПГ-1 // Инфекция и иммунитет.
2024. Т. 14, № 3. С. 500–504. doi: 10.15789/2220-7619-MMC-16772

Citation:

Bulgakova I.D., Zverev V.V., Kravtsova E.O., Usatova G.N., Shoichet D.A.,
Zadvornyykh E.A., Shumkina A.A. Mice microglia cytokine profile changes
under the influence of HSV-1 // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 500–504. doi: 10.15789/2220-
7619-MMC-16772

MICE MICROGLIA CYTOKINE PROFILE CHANGES UNDER THE INFLUENCE OF HSV-1

Bulgakova I.D.^{a,b}, Zverev V.V.^{a,b}, Kravtsova E.O.^b, Usatova G.N.^b, Shoichet D.A.^b, Zadvornyykh E.A.^b, Shumkina A.A.^b

^a I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. *Introduction.* Today, prevalence of neurodegenerative diseases increases. In recent years, more studies have revealed a new knowledge about the role of microglia in the development of these diseases. Animal experiments showed that peripheral inflammation causes activation of microglia in brain. All this points to the essential role of the cells in the development of neurodegeneration. Under the influence of various factors, microglia can change the phenotype and participate in both repair and damage to brain cells. Chronic herpesvirus infection caused by HSV-1 is another known factor in the development of neurodegenerative pathology. However, the exact pathogenetic mechanisms are still unknown, nevertheless, studying the virus effect on microglia has great potential. The goal of our study in this connection was to assess the effect of HSV-1 on microglia polarization in mouse strain with normal susceptibility to this virus and in strain which is more resistant to the action of HSV-1. For this purpose, changes in the cytokine profile were detected. A comparison of interstrain differences in the expression of cytokine genes was also compared in control groups. *Materials and methods.* The study involved infecting C57BL/6 and BALB/c mice with herpes simplex virus type 1, an isolation of microglia was based on separation steps using a discontinuous gradient density, the cytokine profile was assessed by gene expression levels using a real-time reverse transcription PCR. To calculate the relative fold gene expression of samples the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used. Statistical significance was determined using the Mann–Whitney U-test. *Results.* There were found no interstrain differences in cytokine gene expression in control groups of different mouse strains. At the same time, gene expression differed in the experimental groups: in BALB/c mice, the expression of genes for both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines increased; in C57BL/6 mice, a slight increase in the expression of IL-1 β genes was observed. *Conclusion.* The data indicate the formation of different microglial phenotypes after HSV-1 infection in different mouse strains. Apparently, in BALB/c mice there is a switch from the pro-inflammatory M1 phenotype of microglia to the anti-inflammatory M2 phenotype, while in C57BL/6 mice the attenuation of the infectious process occurs through a return to the original M0 phenotype.

Key words: IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF α , TGF- β , cytokines, gene expression, HSV-1, microglia, neurodegeneration.

Введение

Микроглия представляет собой мононуклеарные клетки ЦНС мезодермального происхождения. Это резидентные иммунные клетки в ЦНС, которые различаются по морфологической структуре и функциональным особенностям. Микроглия выполняет ряд жизненно важных функций: участие в нейропластичности, взаимодействие с другими клетками ЦНС, формирование и развитие нервной системы, поддержание гомеостаза, репарация, защита от инфекций, привлечение периферических иммунных клеток, регуляция иммунного ответа, старение и повреждение [2].

В физиологических условиях в головном мозге находятся следующие типы микроглии: «покоящаяся» или малоактивная, M0-фенотипа, и два типа активированной микроглии — M1 и M2. «Покоящаяся» микроглия характеризуется минимальным высвобождением хемокинов и цитокинов, низкой экспрессией антигенов на клеточной поверхности. M1-фенотип характеризуется продукцией провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода и азота и других факторов, вызывающих сильный воспалительный ответ. Этот тип микроглии участвует в элиминации патогена, активации клеток адаптивного иммунитета и повреждении нейронов, что может становиться пусковым механизмом развития

нейродегенерации. M2-фенотип характеризуется синтезом противовоспалительных цитокинов, участвует в очистке тканей от клеточного детрита, активирует ангиогенез, ремоделирует и репарирует ткани [3, 7].

Еще одним важным фактором, связанным с развитием нейродегенеративной патологии, является инфицирование ВПГ-1, однако конкретные патогенетические механизмы до сих пор остаются неизвестными. Тем не менее известно, что линия мышей C57BL/6 является более устойчивой к действию ВПГ-1, кроме того, вирус быстрее элиминируется из клеток мозга мышей этой линии, а сами поражения носят локальный характер, в то время как инфицирование мышей линии BALB/c тем же титром ВПГ-1 приводит к развитию энцефалита, серьезных поражений ЦНС, гибели мышей или длительной элиминации вируса, который поражает все отделы мозга [5].

Нами было выдвинуто предположение, что возможной причиной поражения ЦНС после перенесенной герпетической инфекции является нарушение переключения клеток микроглии с провоспалительного M1-фенотипа. Для проверки данной гипотезы были получены клетки микроглии от мышей этих двух линий после предварительного инфицирования ВПГ-1 с целью определения цитокинового профиля этих клеток.

Материалы и методы

В работе использовался эталонный штамм ВПГ-1 (из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова). Культивирование и определение титра вируса проводилось на культуре клеток Vero. Титр вируса оценивали в \lg ТЦД₅₀/мл.

Культуру клеток Vero выращивали в питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS (Gibco, США)), бензилпенициллина (ПанЭко, Россия) 100 ЕД/мл, стрептомицина (ПанЭко, Россия) в концентрации 100 мкг/мл. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в течение 24 ч.

В работе использовались 8-месячные мыши линий BALB/c и C57BL/6. Мышей получали из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА (Столбовая, Россия). Все процедуры проводились строго в соответствии с требованиями, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных за № 755 от 12.08.1977». Инфекционный материал вводили интраназально под наркозом. В экспериментальную группу были включены мыши, перенесшие герпесвирусную инфекцию, в крови и ЦНС которых не обнаруживалась ДНК ВПГ-1.

Перед извлечением мозга под наркозом была проведена транскардиальная перфузия раствором Рингера (Гематек, Россия), затем от мышей получали головной мозг, а клетки микроглии выделяли с использованием прерывистого градиента плотности [6]. Эксперимент воспроизводился по 3 раза для каждой линии мышей как инфицированных, так и контрольных групп.

Для обнаружения ВПГ-1 в мозге использовали набор для выделения ДНК — ДНК-СОРБ-АМ (АмплиСенс, Россия), с последующей постановкой ПЦР-РВ с помощью набора HSV I, II-FL (АмплиСенс) в соответствии с инструкциями производителя.

Для определения экспрессии генов IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF α , TGF- β получали клеточную РНК при помощи набора «Рибо-Сорб» (Синтол, Россия) с последующей постановкой ОТ-ПЦР-РВ с использованием набора «ОТ-1» для обратной транскрипции (Синтол) и набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (Синтол). Подбор праймеров проводился на основании данных литературы.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартных пакетов прикладных программ Excel (Microsoft Office, 2019), GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Holdings, США). При обработке результатов пользовались стандартными статистическими методами. Для статистической обработки полученных

данных использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Результаты, соответствующие значениям пороговых циклов (Ct) > 40, были признаны отрицательными. Для описания данных использовали средние величины (M) и стандартное отклонение (St Dev). Поскольку было замечено, что распределение ненормальное, то статистическую значимость полученных результатов определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Микроглия экспрессирует различные рецепторы врожденного иммунитета, такие как TLRs (Toll-like receptors) и NLRs (NOD-like receptors), результатом активации которых является продукция цитокинов. В зависимости от активирующих сигналов из M0-фенотипа формируется M1- или M2-фенотип, которые характеризуются синтезом определенных цитокинов. В исследовании были включены цитокины, характерные для каждого фенотипа, а затем были отобраны цитокины, чья роль в развитии нейродегенерации играет наиболее важное значение [7]. Таким образом, была проведена оценка уровня экспрессии генов цитокинов, синтезируемых M1-фенотипом — IL-1 β , IL-6, TNF α , и M2-фенотипом — IL-10, TGF- β .

Экспрессию генов цитокинов сравнивали у двух линий мышей, перенесших герпетическую инфекцию, а также в контрольных группах. Экспрессия генов цитокинов (значение $2^{-\Delta\Delta Ct}$, отн. ед.) и степень достоверности (p) представлены в табл.

Была проведена оценка межлинейных различий в экспрессии генов клеток микроглии у здоровы мышей линий BALB/c и C57BL/6. Полученные данные свидетельствуют в пользу отсутствия этих различий. Затем, было проведено сравнение цитокинового профиля микроглии после перенесенной инфекции, вызванной ВПГ-1, с цитокиновым профилем здоровых мышей той же линии. В результате у линии BALB/c достоверно увеличивалась экспрессия генов как провоспалительных (IL-1 β , IL-6, TNF α) цитокинов, так и противовоспалительного цитокина TGF- β , в то время как у линии C57BL/6 достоверно была увеличена экспрессия только IL-1 β , но не на таком высоком уровне, как у BALB/c.

Несмотря на то, что экспериментальные группы мышей обеих линий перенесли герпесвирусную инфекцию, межлинейные изменения в цитокиновом профиле микроглии этих мышей существенно отличался. У мышей линии BALB/c значительное увеличение количества как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов можно объяснить переходом M1-фенотипа микроглии в M2-фенотип,

Таблица. Экспрессия генов цитокинов (значение $2^{-\Delta\Delta Ct}$, отн. ед.) и степень достоверности (p) для пар групп 1/2, 3/4, 1/3 и 2/4Table. Cytokine gene expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method) and P-value for groups 1/2, 3/4, 1/3 and 2/4

	BALB/c		C57BL/6		Значение P P-value
	Контрольная группа Control group	После инфицирования ВПГ-1 Mice infected with HSV-1	Контрольная группа Control group	После инфицирования ВПГ-1 Mice infected with HSV-1	
IL-1β	1,02 (0,72–1,35)	12706,98* ** (11856,03–13619,0)	0,96 (0,68–1,55)	2,90* (1,66–4,10)	P _{1/2} < 0,05 P _{3/4} < 0,05 P _{1/3} — ns P _{2/4} < 0,05
IL-6	1,32 (0,57–1,32)	18,38* (13,93–24,25)	–	–	P _{1/2} < 0,05 P _{3/4} — ns
TNFα	1,02 (0,72–1,35)	1702,38* ** (1290,16–2246,30)	1,0 (0,54–1,87)	1,07 (0,62–1,07)	P _{1/2} < 0,05 P _{3/4} — ns P _{1/3} — ns P _{2/4} < 0,05
TGF-β	1,29 (0,46–1,70)	1824,560575* (1382,76–1955,52)	–	–	P _{1/2} < 0,05 P _{3/4} — ns

Примечание. * — обозначены группы с достоверно повышенным значением экспрессии генов цитокинов в сравнении с контрольной группой той же линии. ** — обозначены межлинейные группы с достоверно повышенной экспрессией генов в сравнении с экспрессией тех же генов другой линии мышей; «–» — результаты, соответствующие значениям пороговых циклов (Ct) > 40, были признаны отрицательными.

Note. * — groups with significantly increased expression of cytokine genes in comparison with the control group of the same line; ** — groups with significantly increased gene expression in comparison with the expression of the same genes of another mouse strain; «–» — results corresponding to cycle threshold (Ct) values > 40 were considered negative.

что обычно и происходит после завершения инфекционного процесса. Однако у мышей линии C57BL/6 мы получили совершенно другие результаты. После перенесенной герпетической инфекции наблюдалось менее выраженное увеличение экспрессии генов провоспалительного цитокина IL-1 β , при том, что достоверных изменений в экспрессии генов других цитокинов не наблюдалось. Данные результаты могут свидетельствовать о переходе M1-фенотипа в M0-фенотип без формирования M2-микроглии. По всей вероятности, затухание инфекционного процесса через возвращение к исходному фенотипу M0 оказывает меньшее повреждающее действие на нейроны, что может быть связано, например, с усилением фагоцитарной активности M2-клеток.

Заключение

В данном исследовании были описаны изменения цитокинового профиля после инфицирования ВПГ-1 у двух линий мышей с разной восприимчивостью к данному вирусу. Возможно, формирование различных фенотипов микроглии можно объяснить различной

экспрессией рецепторов врожденного иммунитета, участвующих в активации внутриклеточных каскадных путей и изменении экспрессии генов цитокинов. Микроглия играет ключевую роль в развитии нейродегенерации. Более детальное изучение фенотипов этих клеток, механизмов переключения и их функций, а также определение взаимосвязи с другими факторами развития нейродегенерации позволит приблизиться к пониманию патогенеза деменций и других нейропатологий. Отдельное внимание заслуживает изучение лигандов рецепторов врожденного иммунитета, под действием которых происходит активация микроглии, а также изучение синтеза антимикробных пептидов, который регулируется активацией тех же рецепторов врожденного иммунитета [1, 4].

Благодарности

Авторы выражают благодарность НИИВС им. И.И. Мечникова и кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Сеченовского университета, на базе которых были проведены данные исследования.

Список литературы/References

1. Булгакова И.Д., Свитич О.А., Зверев В.В. Механизмы формирования толерантности Toll-подобных рецепторов под действием микробных лигандов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2022. Т. 99, № 6. С. 708–721. [Bulgakova I.D., Svitich O.A., Zverev V.V. Mechanisms of Toll-like receptor tolerance induced by microbial ligands. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology*, 2022, vol. 99, iss. 6: 708. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-323

2. Deczkowska A., Keren-Shaul H., Weiner A., Colonna M., Schwartz M., Amit I. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*, 2018, vol. 173, no. 5, pp. 1073–1081. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.003
3. Guo S., Wang H., Yin Y. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Front. Aging Neurosci.*, 2022, no. 14: 815347. doi: 10.3389/fnagi.2022.815347
4. Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Gankovskaya O.A., Lavrov V.F. Herpes simplex virus: treatment with antimicrobial peptides. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007, vol. 601, pp. 369–376. doi: 10.1007/978-0-387-72005-0_39
5. Lopez C. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature*, 1975, vol. 258, no. 5531, pp. 152–153. doi: 10.1038/258152a0
6. Moussaud S., Draheim H.J. A new method to isolate microglia from adult mice and culture them for an extended period of time. *J. Neurosci. Methods.*, 2010, vol. 187, no. 2, pp. 243–253. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.01.017
7. Orihuela R., McPherson C.A., Harry G.J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.*, 2016, vol. 173, pp. 649–665. doi: 10.1111/bph.1313

Авторы:

Булгакова И.Д., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; аспирант и ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Зверев В.В., академик РАН, д.б.н., профессор, научный руководитель ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Кравцова Е.О., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Усатова Г.Н., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Шойхет Д.А., аспирант и ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. акад. А.А. Воробьева института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Задворных Е.А., студентка ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

Шумкина А.А., студентка ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия.

Authors:

Bulgakova I.D., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; PhD Student and Assistant Professor, Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erisman Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Zverev V.V., RAS Full Member, DSc (Biology), Professor, Scientific Director of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Head of the Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erisman Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Kravtsova E.O., PhD (Medicine), Associate Professor, Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erisman Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Usatova G.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erisman Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Shoichet D.A., PhD Student and Assistant Professor, Vorobiev Department of Microbiology, Virology and Immunology, Erisman Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Zadvornyykh E.A., Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

Shumkina A.A., Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ КАК МАРКЕРЫ ИНФЕКЦИОННОГО И АСЕПТИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

А.Н. Казимирский, Ж.М. Салмаси, Г.В. Порядин, М.И. Панина, А.Э. Ким, Л.С. Рогожина

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

Резюме. Одной из важных проблем медицины является поиск новых достоверных и объективных маркеров воспаления, которые позволили бы определить природу флогогенного фактора и тип воспалительного процесса для выбора правильной тактики лечения, оценки эффективности противовоспалительной терапии, обоснования необходимости хирургического вмешательства, определения прогноза заболевания. Цель исследования — определение специфических маркеров инфекционного и асептического воспаления на основе анализа морфологических вариантов нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ). В исследование включены 26 больных с различными нозологическими формами воспалительного процесса в брюшной полости (12 — с острым аппендицитом, 8 — с острым холециститом, 6 — с диагнозом «панкреатит/панкреонекроз») после хирургического вмешательства. В исследование включены также 20 больных с постковидом и группа из 10 волонтеров, без клинических проявлений заболевания, но при этом имевших контакты с заболевшими гриппом. Нейтрофилы выделяли, используя градиентное центрифугирование. Для подсчета НЭЛ использовали флуоресцентную микроскопию с красителем SYBR Green (ЗАО «Евроген», Россия), специфично взаимодействующего с двухцепочечной ДНК. НЭЛ в морфологической форме нейтрофильных сетей обнаружены нами в крови у хирургических больных с диагнозом «острый аппендицит», имеющих благоприятное течение послеоперационного периода. В группе волонтеров, контактных по гриппу, но без симптоматики инфекционного заболевания, нами также были обнаружены нейтрофильные сети. У всех больных с абдоминальным воспалением, осложненным абсцессом брюшной полости, помимо нейтрофильных сетей регистрировали аномальные формы НЭЛ, в частности НЭЛ в форме одиночных нитей. В группе больных с постковидным синдромом, выбранной в настоящем исследовании как группа сравнения, выявлено абсолютное отсутствие нейтрофильных сетей. У всех больных с постковидом обнаруживаются НЭЛ только в форме одиночных нитей. В экспериментах *in vitro* по клеточному культивированию нейтрофилов здоровых доноров с фибробластами мы обнаружили формирование НЭЛ в виде одиночных нитей, выходящих из ядра нейтрофилов. Результаты последующих экспериментов показали, что индукторами формирования НЭЛ в форме одиночных нитей являются пептиды коллагена. Обнаружение в крови больных нейтрофильных сетей — признак инфекционного воспалительного процесса. НЭЛ в морфологической форме одиночных нитей являются маркерами асептического воспаления, а также признаком поражения эндотелия.

Ключевые слова: маркеры воспаления, инфекционное воспаление, асептическое воспаление, нейтрофильные экстраклеточные ловушки, НЭЛ, нейтрофильные сети, одиночные нити.

Адрес для переписки:

Казимирский Александр Николаевич
117513, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1,
ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова МЗ РФ.
E-mail: alnica10@mail.ru

Contacts:

Alexander N. Kazimirskii
117513, Russian Federation, Moscow, Ostrovityanov str., 1,
Pirogov Russian National Research Medical University.
E-mail: alnica10@mail.ru

Для цитирования:

Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ким А.Э., Рогожина Л.С. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки как маркеры инфекционного и асептического воспаления // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 505–510. doi: 10.15789/2220-7619-NET-16602

Citation:

Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Kim A.E., Rogozhina L.S. Neutrophil extracellular traps as markers of infectious and aseptic inflammation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 505–510. doi: 10.15789/2220-7619-NET-16602

NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS AS MARKERS OF INFECTIOUS AND ASEPTIC INFLAMMATION**Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Kim A.E., Rogozhina L.S.***Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation*

Abstract. One of the important problems of medicine is the search for new reliable markers of inflammation that would allow us to determine the type of inflammatory process. The aim of the study was to identify specific markers of infectious and aseptic inflammation based on the analysis of morphological variants of neutrophil extracellular traps (NETs). The study included 26 patients with various nosological forms of inflammation in the abdominal cavity (12 with acute appendicitis, 8 with acute cholecystitis, 6 with a diagnosis of pancreatitis/ pancreonecrosis) after surgery. The study also included 20 patients with post-COVID and a group of 10 volunteers no clinical manifestations of the disease, but at the same time had contacts with flu patients. Neutrophils were isolated using gradient centrifugation. Fluorescence microscopies with the dye SYBR Green (JSC “Evrogen”, Russia) were used for NET visualization and counting. NETs in the morphological form of neutrophils web structure were found in the blood of surgical patients with acute appendicitis who had a favorable course of the postoperative period. In a group of volunteers who were exposed to influenza but did not have symptoms of an infectious disease, we also found neutrophils web structure. In all patients with abdominal inflammation complicated by abdominal abscess, in addition to neutrophil web structure, abnormal forms of NETs were recorded, in particular, NETs in the form of single filaments. In the post-COVID patients an absolute absence of neutrophils web structure was revealed. In all post-COVID patients, NETs are found only in the form of single filaments. The results of subsequent experiments showed that collagen peptides are inducers of the formation of NETs in the form of single filaments. The detection of neutrophils web structure is a sign of an infectious inflammatory process. NETs in the morphological form of single filaments are markers of aseptic inflammation, as well as a sign of endothelial damage.

Key words: *markers of inflammation, infectious inflammation, aseptic inflammation, neutrophil extracellular traps, NETs, neutrophil web-like structures, single filaments.*

Введение

В настоящее время одной из важных проблем медицины является поиск новых объективных и достоверных, но при этом легко выявляемых маркеров воспаления, которые бы позволили определить природу флогогенного фактора и тип воспалительного процесса для выбора правильной тактики лечения, оценки эффективности противовоспалительной терапии, обоснования необходимости хирургического вмешательства, определения прогноза заболевания.

Надежность обнаружения маркера воспаления может определяться его вовлеченностью в ключевые процессы запуска защитных реакций врожденного иммунитета. Таким наиболее ранним и принципиальным процессом является реакция нейтрофилов на поступающие в организм патогены или на повреждение собственных тканей.

Нейтрофилы формируют нейтрофильные экстраклеточные ловушки (НЭЛ, NETs) при поступлении в организм патогенов различной природы, в первую очередь инфекционных (бактерий, вирусов), а также в ответ на поврежденные структуры собственного организма.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных НЭЛ, морфологические варианты этих внеклеточных структур нейтрофилов еще не охарактеризованы. В наших исследованиях описаны несколько вариантов НЭЛ, которые могут быть связаны с типом воспалительного процесса.

Цель — определение специфических маркеров инфекционного и асептического воспаления на основе анализа морфологических вариантов нейтрофильных экстраклеточных ловушек.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование включены 26 больных, находящихся на лечении в 51 ГКБ г. Москвы с различными нозологическими формами воспалительного процесса в брюшной полости (12 больных с острым аппендицитом, 8 больных с острым холециститом, 6 больных с диагнозом «панкреатит/панкреонекроз») после проведенного хирургического вмешательства. В исследование были включены также 20 больных с пост ковидом и группа из 10 волонтеров, считавших себя здоровыми, но при этом имевших контакты с заболевшими гриппом.

Методы

Получение клеточных фракций нейтрофилов. Для взятия проб крови использовали вакуутайнер с ЭДТА для предотвращения свертывания. Выделение нейтрофилов из венозной крови, обработанной ЭДТА, проводили традиционным методом с помощью градиентного центрифугирования. Для этого кровь разводили в 4 раза натрий-фосфатным буферным раствором 50 мМ, рН 7,4 и наслаивали на двойной градиент плотности фиколла-верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляет 1,077 г/см³, а ниж-

него — 1,190 г/см³. После центрифугирования (1600 об/мин, 30 мин) на границе между градиентами возникает скопление нейтрофилов с чистотой 98–100%. Нейтрофилы дважды отмывали от примесей фикола натрий-фосфатным буферным раствором (50 мМ, рН 7,4). Осаждение клеток крови проводили при центрифугировании (1200 об/мин, 15 мин). Выделенные нейтрофилы в среде RPMI-1640 использовали в экспериментах по кратковременному культивированию. Жизнеспособность выделенных нейтрофилов составляла не менее 95% (тест с 0,1%-ным раствором трипанового синего).

Иммунофлуоресцентное определение нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Для обнаружения и подсчета нейтрофильных экстраклеточных ловушек использовали флуоресцентную микроскопию [2]. Выявление нейтрофильных экстраклеточных ловушек осуществляли с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green (ЗАО «Евроген», Россия), специфично взаимодействующего с двухцепочечной ДНК. Микроскопирование, подсчет и фоторегистрацию клеток и экстраклеточных структур проводили при увеличении $\times 1000$. Результаты выражали в процентах, в виде отношения количества экстраклеточных ловушек к общему числу клеток в поле зрения.

Статистическая обработка. Полученные результаты обрабатывали в программе Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США). Данные представлены в виде среднего значения (M) \pm стандартная ошибка среднего (m). Сравнение количественных признаков проводили по ранговому U-критерию Манна–Уитни и данным дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Маркеры инфекционного воспаления

Качественный анализ НЭЛ у больных с воспалительными заболеваниями дает возможность выявить характерные морфологические признаки НЭЛ при воспалении инфекционного генеза.

В настоящее время морфологические формы нейтрофильных экстраклеточных ловушек и их функциональная активность при воспалительных заболеваниях практически не исследованы. В наших исследованиях мы определили 4 главные морфологические формы нейтрофильных ловушек — нейтрофильные сети, одиночные нити, волокна и вуали, из которых функционально активной, то есть способной захватывать и связывать патогены, обладает только одна экстраклеточная структура — сетевидная. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных сетей нами были обнаружены в крови у хирургических больных с диагнозом «острый аппендицит», имеющих благоприятный характер течения заболевания и послеоперационного периода. Причем обследованные больные никаких других аномальных форм (нитей, волокон и вуалей) нейтрофильных экстраклеточных ловушек не имели.

В группе волонтеров, не имеющих никаких клинических проявлений заболевания гриппом, но находящимся в постоянном контакте с заболевшими, нами также были обнаружены нейтрофильные сети при полном отсутствии аномальных форм НЭЛ. Найденные морфологические формы НЭЛ у больных из отделения абдоминальной хирургии и у не заболевших гриппом волонтеров суммированы в табл. 1.

Таблица 1. Количество и морфологические формы нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) у больных с острым аппендицитом с благоприятным течением и инфицированных вирусом гриппа волонтеров, но без клинической симптоматики

Table 1. Morphological forms of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with acute appendicitis with a favorable course and infected with influenza virus volunteers, but without obvious symptoms

Группы пациентов Groups of patients	Количество НЭЛ, % The number of NETs, %	Морфологические формы НЭЛ Morphological forms of NETs			
		Сети Web-like structures	Одиночные нити Single filaments	Волокна Fibers	Вуали Clouds
Острый аппендицит, неосложненный Acute appendicitis, uncomplicated (n = 6)	10,19 \pm 0,73	++++	–	–	–
Инфицированные вирусом гриппа, но не заболевшие волонтеры Infected with the flu virus, but not sick volunteers (n = 10)	8,58 \pm 0,51	++++	–	–	–

Примечание. ++++ — значительное количество нейтрофильных экстраклеточных структур; + — минимальное (менее 10% от общего количества) нейтрофильных экстраклеточных структур.

Note. ++++ — a significant number of neutrophil extracellular structures; + — minimum (less than 10% of the total) neutrophil extracellular structures.

Необходимо отметить, что нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных сетей, найденные у этих двух групп обследованных хирургических больных и инфицированных волонтеров, обладали чрезвычайно высокой функциональной активностью нейтрофильных сетей.

Сопоставление этих результатов показывает, что нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных сетей могут быть маркерами инфекционного воспаления.

Данные других исследователей подтверждают наши наблюдения о том, что нейтрофильные сети характерны для острого инфекционного процесса в организме [6, 10].

Осложненные формы абдоминального воспаления — разнообразие морфологических типов НЭЛ

Исследование нейтрофильных экстраклеточных ловушек у больных с различными нозологическими формами воспалительного процесса показывает, что помимо нейтрофильных сетей у части хирургических больных обнаруживаются НЭЛ в морфологической форме одиночных нитей. Так, у всех больных с аппендицитом, осложненным абсцессом брюшной полости, помимо нейтрофильных сетей были найдены нейтрофильные экстраклеточные структуры в форме одиночных нитей. Такие нейтрофильные экстраклеточные структуры в форме одиночных нитей обнаруживались также и у части больных с холециститом и панкреатитом (табл. 2).

Необходимо отметить, что у всех больных с абдоминальным воспалением, осложненным абсцессом брюшной полости, помимо нейтрофильных сетей регистрировали также и аномальные формы НЭЛ, в частности НЭЛ в морфологической форме одиночных нитей.

Группа больных с постковидным синдромом, выбранная в пределах настоящего исследования как группа сравнения, демонстрирует абсолютное отсутствие нейтрофильных сетей. У всех исследованных больных с постковидом обнаруживаются НЭЛ только в форме одиночных нитей [3].

Патогенез постковиды связан с вирус-индуцированным повреждением сосудистого эндотелия, приводящим к развитию воспалительного процесса [5, 8, 10]. Контактные взаимодействия нейтрофилов с фибробластами могут поддерживать процесс активации нейтрофильных лейкоцитов крови и индуцировать формирование НЭЛ в форме одиночных нитей.

Маркеры асептического воспаления

Нитевидные нейтрофильные экстраклеточные ловушки — маркеры асептического воспаления. В экспериментах по клеточному культивированию нейтрофилов здоровых доноров с фибробластами мы обнаружили формирование НЭЛ в виде одиночных нитей, выходящих из ядра нейтрофилов. Результаты последующих экспериментов показали, что индукторами формирования НЭЛ в морфологической форме одиночных нитей являются пептиды коллагена (рис.).

Таким образом, наше предположение о том, что коллаген, локализованный на поверхно-

Таблица 2. Количество и морфологические формы НЭЛ у больных с различными нозологическими формами воспалительного процесса в брюшной полости и у больных с постковидным синдромом

Table 2. Morphological forms of NETs in patients with various nosological forms of the inflammatory process in the abdominal cavity and in patients with post-COVID syndrome

Группы больных Groups of patients	Количество НЭЛ, % The number of NETs, %	Морфологические формы НЭЛ Morphological forms of NETs			
		Сети Web-like structures	Одиночные нити Single filaments	Волокна Fibers	Буали Clouds
Острый аппендицит, осложненный абсцессом брюшной полости Acute appendicitis complicated by abdominal abscess (n = 6)	13,26±0,95	+++	+	+	+
Острый холецистит Acute cholecystitis (n = 8)	15,66±2,81	++	+	+	–
Острый панкреатит/панкреонекроз Acute pancreatitis/pancreonecrosis (n = 6)	12,64±2,73	+	+	+	+
Постковид Post-COVID (n = 20)	6,55±0,94	–	+	–	–

Примечание. См. примечание к табл. 1.
Note. As for Table 1.

сти фибробластов, может индуцировать формирование НЭЛ в виде одиночных нитей, нашло свое экспериментальное подтверждение. Физиологическое значение этого эффекта пока нуждается в четкой интерпретации, но перспективы практического его применения уже достаточно ясны. Данные литературы показывают, что НЭЛ могут быть вовлечены не только в начальные этапы воспаления, но и в последующий фиброз [4]. У больных с опухолевыми заболеваниями было выявлено, что коллаген индуцирует формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек [7] и способствует инфильтрации активированных лимфоцитов в опухолевую ткань, однако морфологические формы НЭЛ при этом не были определены.

Заключение

Определение причины и вида воспаления имеет важное значение в медицине, так как этот принцип классификации необходим для постановки диагноза и определения тактики лечения.

Предложена система классификации видов воспаления, основанная на определении параметров адаптивного иммунитета. Эта классификация использует сочетания различных цитокинов [11]. Результаты проведенного нами исследования демонстрируют эффективность избранного подхода к поиску специфических маркеров воспаления. Обнаружение в крови больных нейтрофильных сетей — признак инфекционного воспалительного процесса. Этот вывод в некоторой степени подтверждается данными других исследований, в кото-

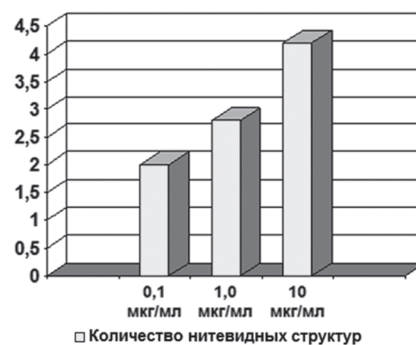


Рисунок. Формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек в нитевидной форме нейтрофилами здоровых доноров под влиянием пептидов коллагена

Figure. Neutrophil extracellular traps formation in filamentous form by neutrophils of healthy donors under collagen peptides influence

Примечание. По вертикальной оси — нейтрофильные экстраклеточные ловушки (в %). По горизонтальной оси — концентрация пептидов коллагена (мкг/мл).

Note. On the vertical axis — neutrophil extracellular traps (in %). On the horizontal axis — the collagen peptides concentration (µg/mL).

рых обнаружили подобные структуры (web-like structures) [9]. Вместе с тем нейтрофильные сети формируются и под влиянием апоптозирующих клеток, инфицированных вирусами или внутриклеточными микроорганизмами [1].

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме одиночных нитей, согласно результатам наших исследований, являются маркерами асептического воспаления, а также признаком поражения эндотелия.

Список литературы/References

1. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В. Антивирусная система врожденного иммунитета: патогенез и лечение COVID-19 // Вестник РГМУ. 2020. № 5. С. 5–14. [Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V. Antiviral system of innate immunity: COVID-19 pathogenesis and treatment. *Vestnik RGMU = Bulletin of RSMU*, 2020, no. 5, pp. 5–13. (In Russ.)]
2. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И. Новые возможности диагностики и исследования патогенеза различных видов воспаления // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2022. Т. 66, № 2. С. 34–42. [Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I. New opportunities for diagnosis and investigation of the pathogenesis of various types of inflammation. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 2022, vol. 66, no. 2, pp. 34–42. (In Russ.)]
3. Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ларина В.Н., Рыжих А.А., Стоделова Е.А., Казимирский А.Н. Нейтрофильные и моноцитарные экстраклеточные ловушки в диагностике постковидного синдрома // Вестник РГМУ. 2022. № 6. С. 84–88. [Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Larina V.N., Ryzhikh A.A., Stodelova E.A., Kazimirskii A.N. Neutrophil and monocyte extracellular traps in the diagnosis of post-COVID syndrome. *Vestnik RGMU = Bulletin of RSMU*, 2022, vol. 6, pp. 80–84. (In Russ.)]
4. Chrysanthopoulou A., Mitroulis I., Apostolidou E., Arelaki S., Mikroulis D., Konstantinidis T., Sivridis E., Koffa M., Giatromanolaki A., Boumpas D.T., Ritis K., Kambas K. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J. Pathol.*, 2014, vol. 233, no. 3, pp. 294–307.
5. Hidalgo A., Libby P., Soehnlein O., Aramburu I.V., Papayannopoulos V., Silvestre-Roig C. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. *Cardiovasc. Res.*, 2022, vol. 118, no. 13, pp. 2737–2753.
6. Huang J., Hong W., Wan M., Zheng L. Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases. *MedComm* (2020), 2022, vol. 3, no. 3, e162. doi: 10.1002/mco.162
7. Li H., Li J., Bai Z., Yan S., Li J. Collagen-induced DDR1 upregulates CXCL5 to promote neutrophil extracellular traps formation and Treg infiltration in breast cancer. *Int. Immunopharmacol.*, 2023, vol. 120, 110235. doi: 10.1016/j.intimp.2023.110235

8. Martins-Goncalves R., Hottz E.D., Bozza P.T. Acute to post-acute COVID-19 thromboinflammation persistence: mechanisms and potential consequences. *Curr. Res. Immunol.*, 2023, vol. 4: 100058. doi: 10.1016/j.crimmu.2023.100058
9. Pieterse E., Rother N., Yanginlar C., Hilbrands L.B., van der Vlag J. Neutrophils discriminate between lipopolysaccharides of different bacterial sources and selectively release neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.*, 2016, vol. 7: 484. doi: 10.3389/fimmu.2016.00484
10. Poli V., Zanoni I. Neutrophil intrinsic and extrinsic regulation of NETosis in health and disease. *Trends Microbiol.*, 2023, vol. 31, no. 3, pp. 280–293.
11. Roe K. An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scand. J. Immunol.*, 2021, vol. 93, no. 2: e12970. doi: 10.1111/sji.12970

Авторы:

Казимирский А.Н., д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела молекулярных технологий, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии Института биологии и патологии человека ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия;

Салмаси Ж.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии Института биологии и патологии человека ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия;

Порядин Г.В., д.м.н., член-корреспондент РАН, профессор, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии Института биологии и патологии человека ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия;

Панина М.И., д.м.н., профессор, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии Института биологии и патологии человека ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия;

Ким А.Э., ассистент кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии Института биологии и патологии человека ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия;

Рогожина Л.С., ассистент кафедры госпитальной хирургии № 1 ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия.

Authors:

Kazimirskii A.N., DSc (Biology), Leading Research Associate, Department of Molecular Technologies, Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Human Biology and Pathology Institute, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

Salmasi J.M., DSc (Medicine), Professor, Head, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Human Biology and Pathology Institute, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

Poryadin G.V., DSc (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Human Biology and Pathology Institute, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

Panina M.I., DSc (Medicine), Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Human Biology and Pathology Institute, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

Kim A.E., Assistant Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Human Biology and Pathology Institute, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

Rogozhina L.S., Assistant Professor, Department of Hospital Surgery No. 1, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation.

ВЛИЯНИЕ НЕЙТРОФИЛОВ И ИХ ЭКЗОПРОДУКТОВ НА БИОМАССУ БИОПЛЕНКИ, ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ И КОНЬЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС В КЛЕТКИ *ESCHERICHIA COLI*

И.Л. Масленникова¹, И.В. Некрасова¹, М. Старчич Эрьявец², М.В. Кузнецова¹

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

² Люблянский университет, Любляна, Словения

Резюме. Цель данного исследования — изучить влияние нейтрофилов и их антимикробных факторов, перекиси водорода и дефензина α , на биомассу биопленки, жизнеспособность входящих в нее бактерий и эффективность конъюгативного переноса плазмиды pOX38:Сm от штамма *E. coli* N4i pOX38:Сm в разные штаммы *E. coli* (комменсальный K12 TG1 и уropатогенные DL82, R32, R45). Массивность биопленки реципиента *E. coli* K12 TG1 с донором *E. coli* N4i pOX38:Сm увеличивалась при добавлении нейтрофилов в концентрации 10^5 кл/мл по сравнению с контролем, в то время как биомасса биопленки снижалась у уropатогенных штаммов *E. coli* DL82/*E. coli* R45 с донором с $10^6/10^4$ – 10^6 кл/мл нейтрофилов, соответственно. Выживаемость реципиентов *E. coli* K12 TG1 и транс-конъюгантов в биопленке была выше при добавлении всех концентраций нейтрофилов по сравнению с контролем. Действие 0,1 мМ H_2O_2 увеличивало показатель биомассы биопленки *E. coli* DL82 и *E. coli* R45, а концентрации 0,5 мМ для DL82 и 0,5 мМ, 2,5 мМ для R45 снижали биомассу биопленки бактерий в составе конъюгативной смеси. Частота конъюгативного переноса плазмиды pOX38:Сm была ниже в присутствии 2,5 мМ H_2O_2 в биопленке N4i pOX38:Сm \times DL82, а также в присутствии 0,5 и 2,5 мМ H_2O_2 в биопленке N4i pOX38:Сm \times R45 по сравнению с контролем. Частота конъюгации от донора *E. coli* N4i pOX38:Сm в *E. coli* DL82 снижалась при добавлении 5 или 25 нг/мл дефензина α , а частота конъюгации в биопленке N4i pOX38:Сm \times R45 снижалась при добавлении 5 нг/мл, тогда как при добавлении 25 нг/мл — увеличивалась.

Ключевые слова: UPEC, биопленки, нейтрофилы, активные формы кислорода, дефензин α , конъюгация.

THE INFLUENCE OF NEUTROPHILS AND THEIR EXOPRODUCTS ON BIOFILM BIOMASS, BACTERIAL VIABILITY AND CONJUGATIVE TRANSFER INTO *ESCHERICHIA COLI*

Maslennikova I.L.^a, Nekrasova I.V.^a, Starčič Erjavec M.^b, Kuznetsova M.V.^a

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

^b University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Abstract. The purpose of this study was to investigate the effect of neutrophils and their antimicrobial factors, hydrogen peroxide and defensin α , on the biofilm biomass, the viability of bacteria in the biofilm and the efficiency of conjugative

Адрес для переписки:

Масленникова Ирина Леонидовна
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13,
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.
Тел.: 8 (342) 280-74-42. Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: I.Maslennikova1974@gmail.com

Contacts:

Irina L. Maslennikova
614081, Russian Federation, Perm, Goleva str., 13,
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB of RAS.
Phone: +7 (342) 280-74-42. Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: I.Maslennikova1974@gmail.com

Для цитирования:

Масленникова И.Л., Некрасова И.В., Старчич Эрьявец М.,
Кузнецова М.В. Влияние нейтрофилов и их экзопродуктов на биомассу
биопленки, жизнеспособность бактерий и конъюгативный перенос
в клетки *Escherichia coli* // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3.
С. 511–518. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-16691

Citation:

Maslennikova I.L., Nekrasova I.V., Starčič Erjavec M., Kuznetsova M.V.
The influence of neutrophils and their exoproducts on biofilm biomass,
bacterial viability and conjugative transfer into *Escherichia coli* // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14,
no. 3, pp. 511–518. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-16691

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124020500027-7.

The work was performed within the framework of the state assignment No. 124020500027-7.

transfer of the pOX38:Cm plasmid from the *E. coli* N4i pOX38:Cm strain into different *E. coli* strains (commensal K12 TG1 and uropathogenic DL82, R32 and R45). The biofilm of the recipient *E. coli* TG1 with the donor *E. coli* N4i pOX38:Cm increased when 10^5 cells/ml of neutrophils were added compared to the control, while the biofilm biomass of the uropathogenic *E. coli* recipient strains DL82/*E. coli* R45 with the donor *E. coli* N4i pOX38:Cm decreased when $10^6/10^4$ – 10^6 cells/ml of neutrophils were added, respectively. The survival of recipient *E. coli* TG1 cells and transconjugants in the biofilm was, compared to the control, higher when 10^4 , 10^5 , 10^6 cells/ml of neutrophils were added. The addition of 0.1 mM H_2O_2 increased biofilm formation of *E. coli* DL82 and *E. coli* R45, and addition of 0.5 mM H_2O_2 reduced biofilm formation of *E. coli* DL82, while 0.5 mM or 2.5 mM reduced the *E. coli* R45 bacterial biofilm biomass in the conjugative mixture. The frequency of the pOX38:Cm conjugative transfer was lower in the presence of 2.5 mM H_2O_2 in the N4i pOX38:Cm \times DL82 biofilm, and also in the presence of 0.5 and 2.5 mM H_2O_2 in the N4i pOX38:Cm \times R45 biofilm, compared to the control. The frequency of pOX38:Cm conjugation from the donor *E. coli* N4i pOX38:Cm into *E. coli* DL82 decreased, when 5 or 25 ng/ml defensin α were added and the conjugation frequency in the mating mixture N4i pOX38:Cm \times R45 decreased, when 5 ng/ml were added, while, when 25 ng/ml of defensin α were added it increased.

Key words: UPEC, biofilms, neutrophils, reactive oxygen species, defensin α , conjugation.

Введение

Молекулярные механизмы хронических бактериальных инфекций и, в частности, инфекций мочевыводящих путей (ИМВП) активно изучаются во всем мире. Основным возбудителем ИМВП являются представители уропатогенных *Escherichia coli* (УРЕС), которые имеют тенденцию образовывать на биотических и абиотических поверхностях биопленки, либо внедряться в слизистую оболочку мочевого пузыря, который становится резервуаром бактерий, что обуславливает развитие хронических рецидивирующих инфекций и, как следствие, деструктивных процессов [5, 9]. Биопленка может быть местом, где изменения генома, а именно приобретение резистентности к антибиотикам или факторов патогенности, могут осуществляться при горизонтальном переносе генов путем конъюгации [11]. Известно, что конъюгативный перенос вносит дополнительную динамику в биопленкообразование за счет усиленной экспрессии клетками факторов слипания во время передачи плазмиды [4]. Плазмиды могут являться инструментом генетического разнообразия, способствуя эволюции кодируемых плазмидами генов бактерий [18].

В составе биопленки бактерии являются недоступными как для самих клеток иммунной системы (фагоцитов/нейтрофилов), так и для бактерицидных кислородзависимых (активные формы кислорода, МПО и т. д.) и кислороднезависимых (α -дефензины, лизоцим, катепсин G и т. д.) факторов. Вирулентность микроорганизмов, свойства внеклеточного матрикса ограничивают возможность контроля нейтрофилами и другими эффекторами иммунитета процесса биопленкообразования и последующего распространения бактерий.

Экспрессия вирулентных генов УРЕС, с одной стороны, может влиять на их биопленкообразование, а с другой — может иметь опосредо-

ванное влияние и на функции нейтрофилов [14, 15, 17, 19]. Ранее мы показали, что клетки и супернатанты бактерий *E. coli* снижали жизнеспособность и стимулировали ранний апоптоз нейтрофилов [10]. Характер взаимодействия нейтрофилов с биопленками штаммов с высоким патогенным потенциалом определялся, в основном, на уровне действия «биопленочных» супернатантов за счет лизиса фагоцитов. Напротив, супернатанты штаммов с ограниченным набором вирулент-ассоциированных генов не вызывали гибели и уход в апоптоз нейтрофилов по сравнению с бактериальными клетками, что позволяло фагоцитам внедряться в массивную биопленку и частично разрушать ее. В соответствии с этим была выдвинута гипотеза, что горизонтальный перенос генов может определяться факторами патогенности реципиентов, связанными как с образованием биопленок, так и с факторами, вызывающими изменения функций клеток врожденного иммунитета.

Цель данного исследования — изучить влияние нейтрофилов и их антимикробных факторов, перекиси водорода и дефензина α , на биомассу биопленки, жизнеспособность входящих в нее бактерий и эффективность конъюгативного переноса в клетки штаммов *E. coli*.

Материалы и методы

В работе использовали комменсальный штамм *E. coli* K12 TG1 [1]. Референтный уропатогенный *E. coli* DL82 и *E. coli* N4i pOX38:Cm получены из коллекции группы молекулярной генетики биотехнологического факультета Люблянского университета (Словения). Штаммы *E. coli* R32, *E. coli* R45 [8] были выделены от пациентов с ИМВП, госпитализированных в стационары г. Перми, и депонированы в коллекцию Ex culture Люблянского университета (Словения). Набор вирулентных факторов,

филогруппа и коровый профиль представлен в работе Kuznetsova et al. [8]. Штаммы *E. coli* K12 TG1, *E. coli* DL82, *E. coli* R32, *E. coli* R45 использовали в качестве реципиентов плазмиды, а *E. coli* N4i pOX38:Сm — в качестве донора в конъюгативной смеси.

Нейтрофилы периферической крови здоровых мужчин ($n = 3-4$) выделяли на двойном градиенте фиколл-урографина (1,077 и 1,112 г/мл). От всех доноров было получено письменное информированное согласие при сдаче крови в соответствии с правилами этического комитета ИЭГМ УрО РАН. Жизнеспособность нейтрофилов в тесте с трипановым синим составила 97%.

В работе использовали дефензин α нейтрофилов (HNPI-3) (DEFa1, Cloud-Clone Corp., США) в концентрациях 5, 25, 50 нг/мл, перекись водорода (AppliChem, Германия) — в концентрациях 0,02–2,5 мМ.

Биопленки *E. coli* TG1, *E. coli* DL82, *E. coli* R32, *E. coli* R45 получали в 96-луночных полистироловых планшетах (ApexLab, Китай) при выращивании штаммов в LB (Luria-Bertani; Sigma-Aldrich) среде в течение 24 ч при 37°C статически. Биопленки отмывали 3-кратно с использованием 0,9% NaCl.

Конъюгативный перенос осуществляли в 24-ч биопленке путем добавления суспензии (100 мкл) донорного штамма *E. coli* N4i pOX38:Сm, активированного 2 ч на среде RPMI 1640 basic (Thermo Fisher Scientific, США). Затем к конъюгативной смеси приливали 100 мкл суспензии нейтрофилов в концентрации 10^4 , 10^5 , 10^6 кл/мл; или 100 мкл перекиси водорода в конечной концентрации 0,02; 0,1; 0,5; 2,5 мМ; или 100 мкл дефензина α — 5, 25, 50 нг/мл. В контроль конъюгативной смеси добавляли среду RPMI. После 4 ч культивирования с бактериальными биопленками межклеточный комплекс отмывали, биопленки разрушали в ультразвуковой ванне Elma Ultrasonic 30S (Elma, Германия) (1 мин \times 5 при 37 кГц), а затем делали высевы на LB агар с ампициллином (120 мкг/мл) для реципиентов, гентамицином (15 мкг/мл) для доноров, ампициллином (120 мкг/мл) и хлорамфениколом (50 мкг/мл) для трансконъюгантов. Частоту конъюгации рассчитывали как отношение числа трансконъюгантов к числу реципиентов [6]. Биомассу конъюгативной смеси с/без нейтрофилов определяли согласно [16].

Статистический анализ проводили в программе Statistica 6.0. Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения. t-критерий Стьюдента (t-критерий) использовали для оценки массивности биопленки и выживаемости, критерий Вилкоксона для оценки частоты конъюгации. Порог статисти-

ческой значимости был установлен на уровне $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициента Пирсона.

Результаты и обсуждение

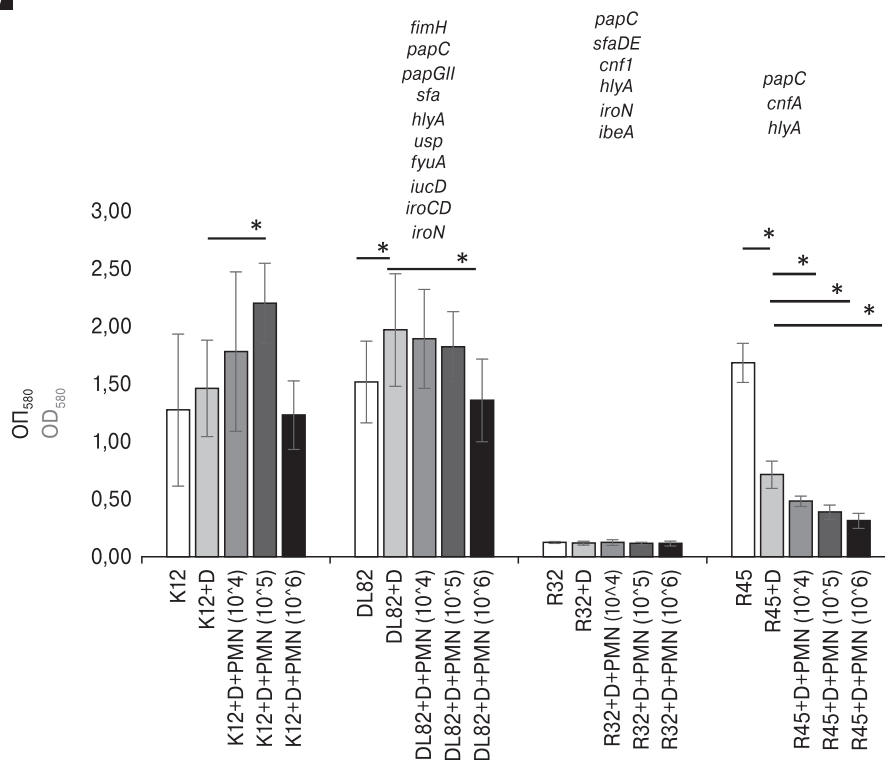
Показано, что массивность биопленки комменсального штамма *E. coli* TG1, уропатогенного низкобиопленочного штамма R32 при добавлении донора *E. coli* N4i pOX38:Сm не изменялась, биомасса биопленки DL82 и донора в этих же условиях возрастала, тогда как у R45 — снижалась (рис. 1А). Добавление нейтрофилов в концентрации 10^4-10^5 клеток/мл к смешанной биопленке *E. coli* TG1 и *E. coli* N4i pOX38:Сm вызывало увеличение ее величины относительно контроля. Повышение концентрации нейтрофилов до 10^6 клеток/мл выражено снижало биомассу биопленки. В противоположность комменсальному штамму влияние нейтрофилов на биопленки уропатогенных штаммов *E. coli* DL82 и R45 было прямо пропорционально их концентрации. Оценить влияние нейтрофилов на величину смешанной биопленки штамма R32 было сложно, в связи с малой величиной показателя толщины биопленки.

Выживаемость реципиентов и трансконъюгантов в биопленке была выше при действии нейтрофилов в концентрации 10^4 , 10^5 , 10^6 кл/мл у штамма *E. coli* K12 TG1 по сравнению с контролем (рис. 1Б). Число бактерий донорного штамма было выше в конъюгативной смеси DL82 с *E. coli* N4i pOX38:Сm в присутствии 10^4 клеток/мл нейтрофилов и снижалось при повышении концентрации нейтрофилов.

Частота конъюгативного переноса в варианте с нейтрофилами варьировала в опытных вариантах в пределах $2,45-4,65 \times 10^{-4}$, в контроле — $5,27 \times 10^{-4}$, однако, без достоверной разницы (рис. 2). Наблюдалась тенденция к снижению частоты конъюгации при увеличении концентрации нейтрофилов у уропатогенных штаммов и противоположная у комменсального штамма. Достоверная положительная корреляция между концентрацией нейтрофилов и частотой конъюгации показана для штамма *E. coli* K12 TG1 ($p = 0,02$), отрицательная — для R45 ($p = 0,04$).

На рис. 3А представлены данные биомассы биопленки штаммов DL82 и R45 с донором в присутствии перекиси водорода. Показано, что добавление 0,1 мМ H_2O_2 увеличивало показатель биомассы биопленки обоих штаммов. Более высокие концентрации перекиси (0,5 мМ) снижали биомассу биопленки бактерий в составе конъюгативной смеси. Количество реципиентов в составе биопленки не зависело от присутствия H_2O_2 . Выживаемость доноров и трансконъюгантов в конъюгативной сме-

А (А)



Б (Б)

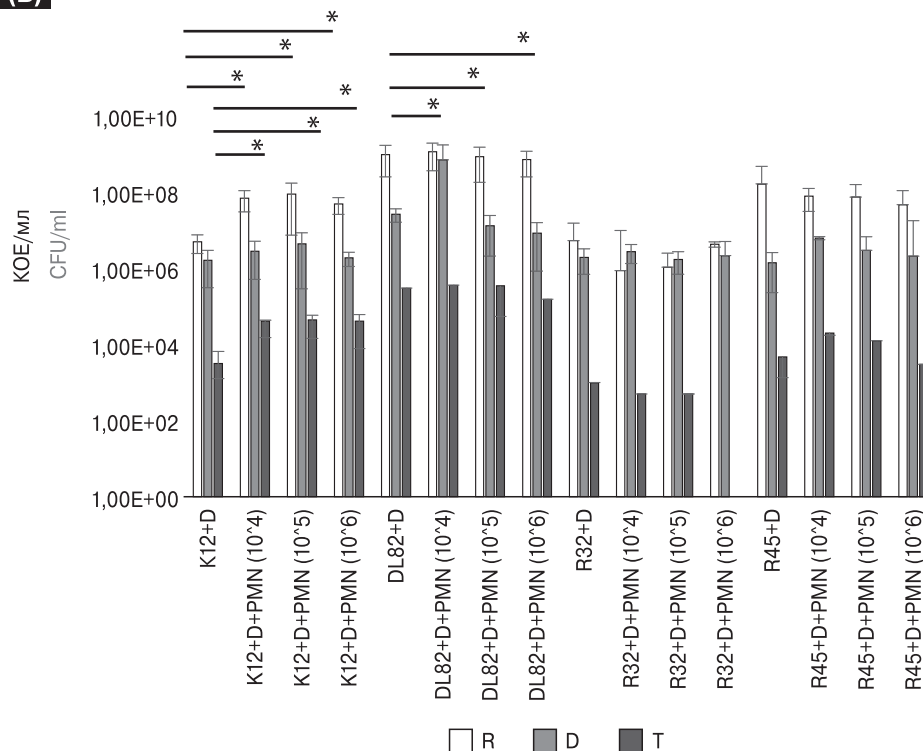


Рисунок 1. Биомасса биопленок (А) и выживаемость реципиентов *E. coli* K12 TG1, DL82, R32, R45 (R), донора *E. coli* N4i рOX38:Сm (D), трансконъюгантов (Т) (Б) в конъюгативной смеси в присутствии нейтрофилов (PMN)

Figure 1. Biofilm biomass (A) and survival of recipients *E. coli* K12 TG1, DL82, R32, R45 (R), donor *E. coli* N4i рOX38:Сm (D), transconjugants (T) (B) in the conjugative mixture in the presence of neutrophils (PMN)

Примечание. Число нейтрофилов — 10^4 (10^4), 10^5 (10^5), 10^6 (10^6) кл./мл. * — достоверные отличия между значениями при $p < 0,05$.

Note. The number of neutrophils is 10^4 (10^4), 10^5 (10^5), 10^6 (10^6) cells/ml. * — significant differences between values at $p < 0.05$.

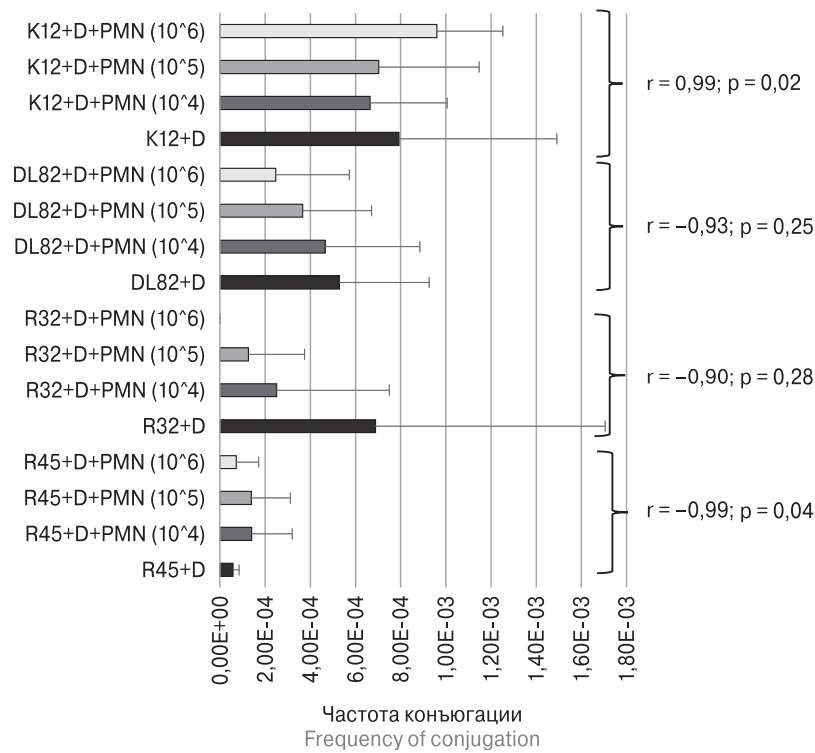


Рисунок 2. Частота конъюгации комменсального *E. coli* K12 TG1, уропатогенных штаммов *E. coli* (DL82, R32, R45) с донором *E. coli* N4i рOX38 (D) в присутствии нейтрофилов (PMN)

Figure 2. Frequency of conjugation of commensal *E. coli* K12 TG1, uropathogenic *E. coli* strains (DL82, R32, R45) with the donor *E. coli* N4i рOX38 (D) in the presence of neutrophils (PMN)

Примечание. Число нейтрофилов — 10⁴ (10⁴), 10⁵ (10⁵), 10⁶ (10⁶) кл/мл. * — достоверные отличия между значениями при p < 0,05.

Note. The number of neutrophils is 10⁴ (10⁴), 10⁵ (10⁵), 10⁶ (10⁶) cells/ml. * — significant differences between values at p < 0.05.

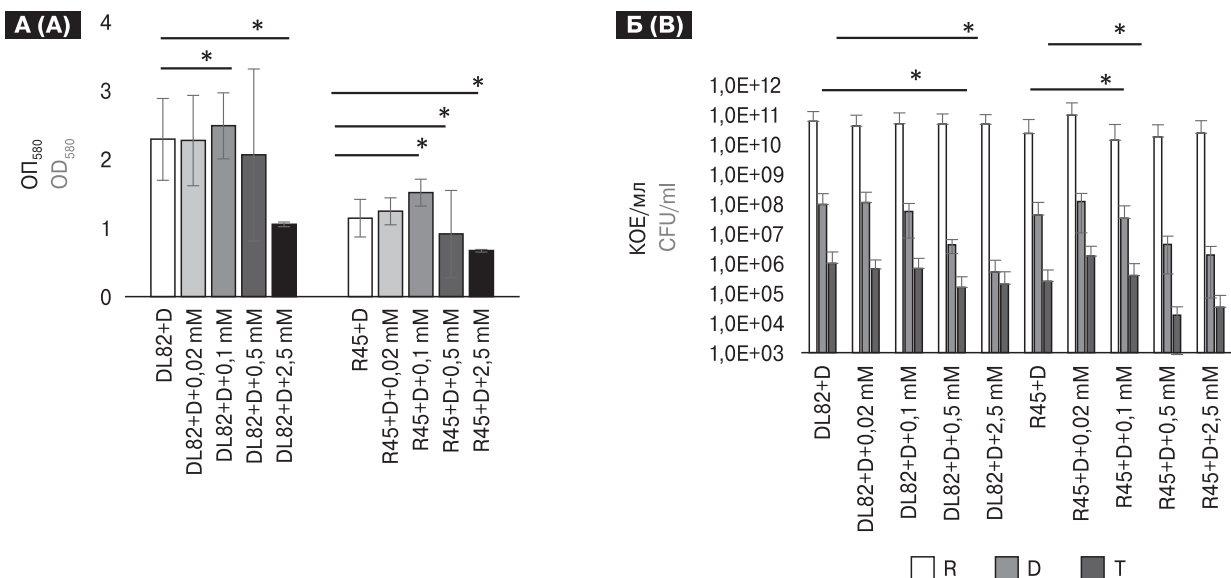


Рисунок 3. Биомасса биопленок (А) и выживаемость реципиентов *E. coli* DL82, R45 (R), донора *E. coli* N4i рOX38 (D), трансконъюгантов (Т) (Б) в конъюгативной смеси в присутствии перекиси водорода

Figure 3. Biofilm biomass (A) and survival of recipients *E. coli* DL82, R45 (R), donor *E. coli* N4i рOX38 (D), transconjugants (T) (B) in a conjugative mixture in the presence of hydrogen peroxide

Примечание. * — достоверные отличия между значениями при p < 0,05.

Note. * — significant differences between values at p < 0.05.

си снижалась при концентрации перекиси 0,5 мМ и выше (рис. 3В). Частота конъюгативного переноса была ниже при действии 2,5 мМ H_2O_2 в биопленке DL82, и при 0,5 и 2,5 мМ H_2O_2 в биопленке R45 (рис. 4).

На рис. 5 представлены данные по конъюгативному переносу в биопленках уропатогенных штаммов в присутствии дефензина α . Показано отсутствие влияния дефензина в исследуемой концентрации на количество реципиентов в смешанной биопленке обоих уропатогенных штаммов. Количество доноров снижалось при 50 нг/мл в биопленке со штаммом DL82, и при 5 нг/мл — со штаммом R45 (рис. 5А). Частота конъюгации в клетки DL82 снижалась при 5 и 25 нг/мл дефензина α по сравнению с контролем, у R45 снижался уровень горизонтального переноса при 5 нг/мл и повышался при 25 нг/мл (рис. 5В).

Плазмиды играют ключевую роль в экологии и эволюции бактерий, поскольку они мобилизуют дополнительные гены путем горизонтального переноса генов [18]. Высокий уровень разнообразия признаков, кодируемых плазмидами, обеспечивает основу для изучения потенциала плазмид в качестве резервуаров адаптивных признаков для микробных сообществ. Показано, что нейтрофилы «притягиваются» к биопленкам посредством хемотаксических активных молекул, высвобождаемых иммунокомпетентными клетками [7]. По данным нашего исследования увеличение биомассы биопленки было характерно только для комменсального штамма, но не для уропатогенных (рис. 1). Увеличение показателя биомассы смешанной

биопленки с комменсальным штаммом сопровождалось и увеличением числа доноров в конъюгативной смеси (рис. 1В). Таким образом, вирулентный потенциал штаммов может влиять на характер взаимодействия сформированной ими биопленки с факторами иммунного ответа.

Как показано в ранних работах, комменсальные штаммы довольно активно запускали апоптозные механизмы нейтрофилов [10]. Не исключено, что данный процесс сопровождается усилением конъюгативных процессов с увеличением числа нейтрофилов (рис. 2), что показано для штамма *E. coli* K12 TG1 и является необходимым условием для увеличения разнообразия бактериальной популяции при наличии внешнего прессинга в виде факторов врожденного иммунитета. Напротив, у UPEC штаммов наблюдалась тенденция к снижению частоты конъюгации при увеличении числа нейтрофилов, достоверная корреляция показана для штамма R32. Острые воспалительные реакции со стороны факторов врожденного иммунитета обусловлены реализацией вирулентного потенциала штаммов UPEC штаммов, которая в итоге приводит к снижению биомассы биопленки и числа участников конъюгативного процесса.

Перекись водорода в составе активных форм кислорода в концентрации 0,001–0,01 мМ выполняет роль вторичного мессенджера, участвующего в регуляции разнообразных сигнальных процессов; 0,02–0,1 мМ H_2O_2 присутствует в местах воспаления [2]. Продукция активных форм кислорода (АФК) осуществляется нейтрофилами, участвующими в защитной ре-

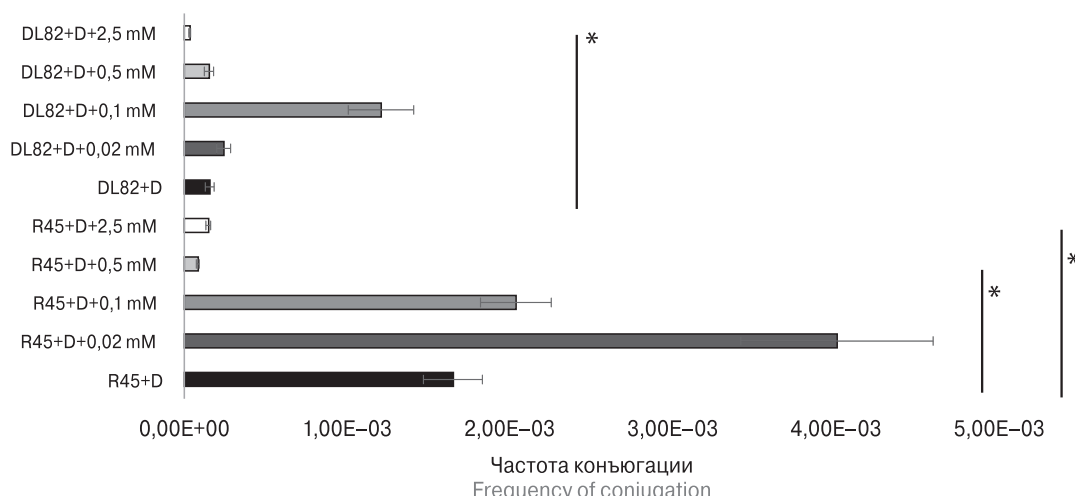


Рисунок 4. Частота конъюгации уропатогенных штаммов *E. coli* (DL82, R45) с донором *E. coli* N4i pOX38 (D) в присутствии перекиси водорода

Figure 4. Frequency of conjugation of uropathogenic *E. coli* strains (DL82, R45) with the donor *E. coli* N4i pOX38 (D) in the presence of hydrogen peroxide

Примечание. * — достоверные отличия между значениями при $p < 0,05$.

Note. * — significant differences between values at $p < 0.05$.

акции хозяина, в ответ на внешние патогены. Генерация внеклеточных АФК является стратегией нападения на биопленки [7], способствуя повреждению ее поверхностных слоев, межклеточного матрикса. По данным наших исследований, присутствие перекиси водорода в физиологических концентрациях респираторного взрыва (0,02–0,1 мМ) не влияло на конъюгативный перенос, хотя наблюдалась тенденция его увеличения. При более высоких концентрациях H_2O_2 в конъюгативной смеси эффективность переноса плазмиды в биопленках уропатогенных штаммов снижалась (рис. 4).

Известно, что дефензины обладают самостоятельной антимикробной активностью и усиливают эффективность некоторых антибактериальных препаратов в отношении представителей клинически значимых бактерий, и, кроме того, проявляют «антибиопленочную» активность. Так, минимальная подавляющая концентрация HNP-1 составила от 2 (4–32) мкг/мл,

укороченной формы HNP-1 без цистеина, HNP1ΔC18A, до 125–250 мкг/мл в отношении референтных и клинических штаммов *E. coli* [3, 12]. В плазме крови здоровых людей концентрация HNP-1 варьирует в пределах 5–11 нг/мл [13] и повышается примерно в 7 раз при обнаружении бактерий в моче (около 35–77 нг/мл) [20]. В нашем исследовании дефензин снижал частоту конъюгации, что связано с его действием на выживаемость донора плазмиды, при этом число реципиентов в биопленке при концентрации 5 нг/мл возрастало.

Как показали различные исследования, иммунный ответ хозяина варьируется в зависимости от патотипа *E. coli* и является штаммоспецифическим, поскольку экспрессия генов факторов вирулентности также различна у каждого штамма. В нашем исследовании мы также видим разнонаправленную реакцию сессильных клеток на присутствие нейтрофилов и их микробицидных факторов.

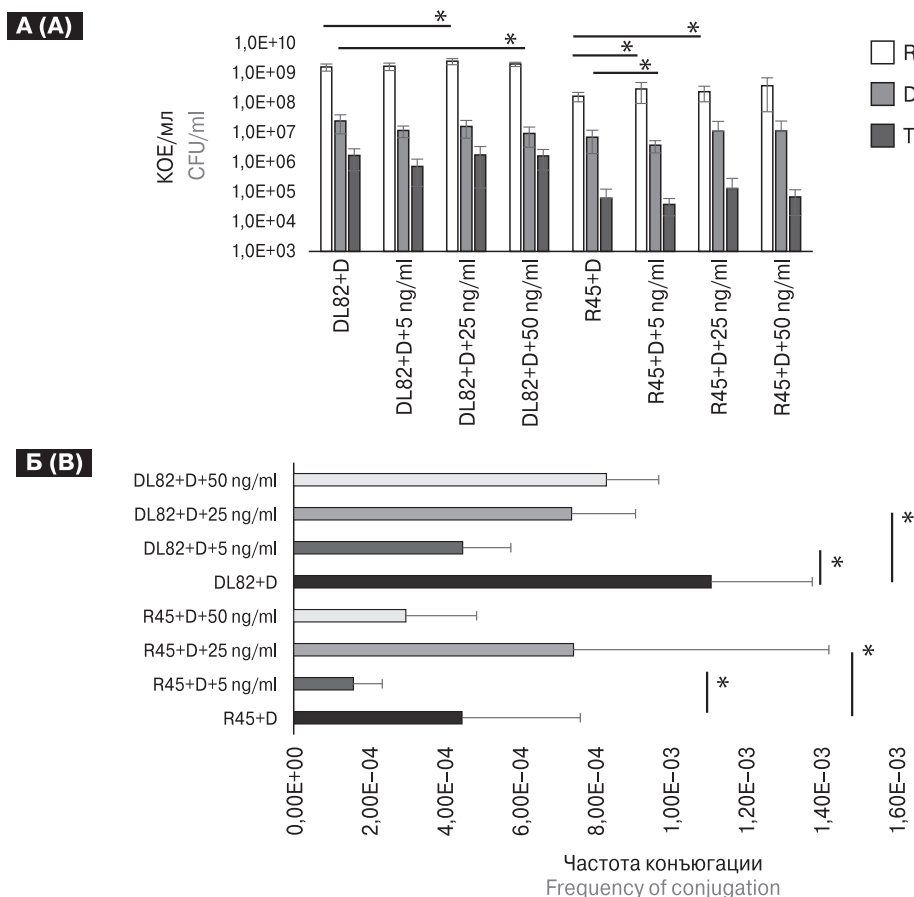


Рисунок 5. Выживаемость реципиентов *E. coli* DL82, R45 (R), донора *E. coli* N4i pOX38 (D), трансконъюгантов (Т) в конъюгативной смеси (А) и частота конъюгации (Б) в присутствии дефензина α

Figure 5. Survival of recipients *E. coli* DL82, R45 (R), donor *E. coli* N4i pOX38 (D), transconjugants (T) in the conjugative mixture (A) and frequency of conjugation (B) in the presence of defensin α

Примечание. * — достоверные отличия между значениями при $p < 0,05$.

Note. * — significant differences between values at $p < 0.05$.

Список литературы/References

1. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е., Соловьева Л.Н., Завильгельский Г.Б. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов бактерий // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2002. Т. 3. С. 20–24. [Danilov V.S., Zarubina A.P., Eroshnikov G.E., Solov'eva L.N., Kartashev F.V., Zavil'gel'skii G.B. Sensory bioluminescence systems based on lux-operons of various-type luminescent bacteria. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya = Herald of Moscow University. Series 16. Biology*, 2002, vol. 3, pp. 20–24. (In Russ.)]
2. Abdesselem M., Pétri N., Kuhner R., Mousseau F., Rouffiac V., Gacoïn T., Laplace-Builhé C., Alexandrou A., Bouzigues C.I. Real-time in vivo ROS monitoring with luminescent nanoparticles reveals skin inflammation dynamics. *Biomed Opt. Express*, 2023, vol. 14, no. 10, pp. 5392–5404. doi: 10.1364/BOE.501914
3. Bolatchiev A. Antibacterial activity of human defensins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Peer J.*, 2020, vol. 8: e10455. doi: 10.7717/peerj.10455
4. Burmølle M., Bahl M.I., Jensen L.B., Sørensen S.J., Hansen L.H. Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. *Microbiology (Reading)*, 2008, vol. 154, no. pt 1, pp. 187–195. doi: 10.1099/mic.0.2007/010454-0
5. Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Caparon M., Hultgren S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, vol. 13, no. 5, pp. 269–284. doi: 10.1038/nrmicro3432
6. Guglielmini J., Quintais L., Garcillán-Barcia M.P., de la Cruz F., Rocha E.P. The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet.*, 2011, vol. 8: e1002222. doi: 10.1371/journal.pgen.1002222
7. Hirschfeld J. Dynamic interactions of neutrophils and biofilms. *J. Oral Microbiol.*, 2014, vol. 6: 26102. doi: 10.3402/jom.v6.26102
8. Kuznetsova M.V., Maslennikova I.L., Pospelova J.S., Žgur Bertok D., Starčić Erjavec M. Differences in recipient ability of uropathogenic *Escherichia coli* strains in relation with their pathogenic potential. *Infect. Genet. Evol.*, 2022, vol. 97: 105160. doi: 10.1016/j.meegid.2021.105160
9. Lila A.S.A., Rajab A.A.H., Abdallah M.H., Rizvi S.M.D., Moin A., Khafagy E.S., Tabrez S., Hegazy W.A.H. Biofilm Lifestyle in Recurrent Urinary Tract Infections. *Life (Basel)*, 2023, vol. 13, no. 1: 148. doi: 10.3390/life13010148
10. Maslennikova I.L., Nekrasova I.V., Kuznetsova M.V. Interaction of neutrophils and biofilm formed by uropathogenic *Escherichia coli* strains with different pathogenic potential. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2022, vol. 174, no. 1, pp. 51–56. doi: 10.1007/s10517-022-05647-4
11. Michaelis C., Grohmann E. Horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in biofilms. *Antibiotics (Basel)*, 2023, vol. 12, no. 2: 328. doi: 10.3390/antibiotics12020328
12. Moazzezy N., Asadi Karam M.R., Rafati S., Bouzari S., Oloomi M. Inhibition and eradication activity of truncated α -defensin analogs against multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* biofilm. *PLoS One*, 2020, vol. 15, no. 7: e0235892. doi: 10.1371/journal.pone.0235892
13. Németh B.C., Várkonyi T., Somogyvári F., Lengyel C., Fehértemplomi K., Nyiraty S., Kempler P., Mándi Y. Relevance of α -defensins (HNP1-3) and defensin β -1 in diabetes. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, no. 27, pp. 9128–9137. doi: 10.3748/wjg.v20.i27.9128
14. Oliveira A., Sousa J.C., Silva A.C., Melo L.D.R., Sillankorva S. Chestnut honey and bacteriophage application to control *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms: Evaluation in an ex vivo wound model. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9: 1725. doi: 10.3389/fmicb.2018.01725
15. Olson P.D., Hunstad D.A. Subversion of Host Innate Immunity by Uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens*, 2016, vol. 5, no. 1: 2. doi: 10.3390/pathogens5010002
16. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, vol. 54, pp. 49–79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
17. Robinson A.E., Heffernan J.R., Henderson J.P. The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: the role of transition metal control in virulence. *Future Microbiol.*, 2018, vol. 13, no. 7, pp. 745–756. doi: 10.2217/fmb-2017-0295
18. Rodríguez-Beltrán J., DelaFuente J., León-Sampedro R., MacLean R.C., San Millán Á. Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021, vol. 9, no. 6, pp. 347–359. doi: 10.1038/s41579-020-00497-1
19. Wang Z., Humphrey C., Frilot N., Wang G., Nie Z., Moniri N.H., Daaka Y. Dynamin2- and endothelial nitric oxide synthase-regulated invasion of bladder epithelial cells by uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Cell. Biol.*, 2011, vol. 192, no. 1, pp. 101–110. doi: 10.1083/jcb.201003027
20. Watson J.R., Hains D.S., Cohen D.M., Spencer J.D., Kline J.M., Yin H., Schwaderer A.L. Evaluation of novel urinary tract infection biomarkers in children. *Pediatr. Res.*, 2016, vol. 79, no. 6, pp. 934–939. doi: 10.1038/pr.2016.33

Авторы:

Масленникова И.Л., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия;
Некрасова И.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия;
Старчич Эрjavec М., к.б.н., профессор кафедры микробиологии биотехнического факультета Люблянского университета, Любляна, Словения;
Кузнецова М.В., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия.

Authors:

Maslennikova I.L., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;
Nekrasova I.V., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;
Starčić Erjavec M., PhD, Professor, Department of Microbiology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia;
Kuznetsova M.V., DSc (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation.

Поступила в редакцию 01.04.2024
 Принята к печати 02.04.2024

Received 01.04.2024
 Accepted 02.04.2024

ВЛИЯНИЕ *TRITRICHOMONAS* spp. НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ МЫШЕЙ ЛИНИИ *Muc2*^{-/-} ПОСЛЕ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ

Е.П. Гончарова, В.Д. Бец, Ю.С. Макушева, Е.А. Литвинова

Центр технологического превосходства, Новосибирский государственный технический университет, г. Новосибирск, Россия

Резюме. В то время как патогенные протисты, населяющие репродуктивные пути хорошо изучены, в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) существует конститутивная микробиота протистов, которая является неотъемлемой частью микробиома позвоночных. В настоящее время недостаточно описано влияние протозойных инфекций на иммунную систему хозяина и их потенциальный вклад в нарушение иммунного гомеостаза слизистой оболочки. Протисты, наряду с бактериями и вирусами, являются постоянными представителями микробиоты человека. Основное внимание исследователей сосредоточено на изучении их патогенного влияния в заболеваниях ЖКТ. Однако, их роль в симбиотических отношениях с хозяевами относительно мало изучена. Ранее было показано, что ближайшим человеческим ортологом трихомонады мышей (*Tritrichomonas* spp.) является трихомонада *Dientamoeba fragilis*, которая способна вызывать симптомы воспалительных заболеваний кишечника. В настоящее время неясно, являются ли *Dientamoeba fragilis* и другие виды протистов, такие как *Enteromonas* spp., *Entamoeba dispar*, комменсалами, патобионтами или возбудителями заболеваний кишечного тракта человека. Таким образом, информация о мутуалистических отношениях между протистами, микробиотой ЖКТ и иммунной системой мышей могут быть использованы для понимания взаимоотношений хозяина и простейших у человека. Полученные данные позволят оценить потенциальный вклад комменсалов простейших в формировании защитных механизмов слизистой оболочки животных и человека. Ранее нами было показано, что антибиотикотерапия приводит к увеличению количества *Tritrichomonas* spp. наряду с уменьшением бактерий в кишечнике мышей с мутацией в гене *Muc2*. Мутация в этом гене приводит к нарушению формирования слизистой оболочки кишечника у мышей. Мыши с мутацией в гене *Muc2* могут быть использованы при изучении воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) человека. В настоящей работе мы провели сравнительное исследование иммунологического статуса мышей *Muc2*^{-/-}, инфицированных трихомонадой *Tritrichomonas* spp., после проведения антибиотикотерапии в течение 2 недель с последующим подселением мышам *Lactobacillus johnsonii* и мышей без подселения пробиотических микроорганизмов (самовосстановление). Анализ основных популяций лимфоцитов в крови, селезенке и лимфатических узлах показал, что подселение *Lactobacillus johnsonii* после антибиотикотерапии приводит к достоверному увеличению популяции Т-лимфоцитов в крови и в селезенке, и увеличению количества хелперных Т-клеток в лимфатических узлах мышей *Muc2*^{-/-} по сравнению с группой мышей без подселения пробиотических микроорганизмов.

Ключевые слова: муцин 2, иммунитет, протозойная инфекция, кишечник, *Tritrichomonas* spp., антибиотики.

Адрес для переписки:

Бец Виктория Дмитриевна
630073, Россия, г. Новосибирск, пр. К. Маркса, 20,
Центр технологического превосходства Новосибирского
государственного технического университета.
Тел.: 8 (913) 797-73-95.
E-mail: betsvd.bio@gmail.com

Contacts:

Victoria D. Bets
630073, Russian Federation, Novosibirsk, K. Marx pr., 20,
Center for Technological Excellence, Novosibirsk State
Technical University.
Phone: +7 (913) 797-73-95.
E-mail: betsvd.bio@gmail.com

Для цитирования:

Гончарова Е.П., Бец В.Д., Макушева Ю.С., Литвинова Е.А. Влияние *Tritrichomonas* spp. на иммунную систему мышей линии *Muc2*^{-/-} после антибиотикотерапии // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 519–524. doi: 10.15789/2220-7619-IOT-16746

Citation:

Goncharova E.P., Bets V.D., Makusheva Yu.S., Litvinova E.A. Impact of *Tritrichomonas* spp. on the immune system of *Muc2*^{-/-} mice after antibiotic therapy // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 519–524. doi: 10.15789/2220-7619-IOT-16746

Анализ иммунных клеток и протозоа в фекалиях лабораторных животных проведен при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 23-26-00270.

The analysis of immune cells and protozoa in faeces of laboratory animals was supported by Russian Science Foundation (RSF) grant No. 23-26-00270.

© Гончарова Е.П. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-IOT-16746>

IMPACT OF *TRITRICHOMONAS* spp. ON THE IMMUNE SYSTEM OF *Muc2*^{-/-} MICE AFTER ANTIBIOTIC THERAPY

Goncharova E.P., Bets V.D., Makusheva Yu.S., Litvinova E.A.

Center for Technological Excellence, Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. While pathogenic protists inhabiting the reproductive tract are well studied, the gastrointestinal (GI) tract contains a constitutive protist microbiota that is an integral part of the vertebrate microbiome. Currently, the effect of protozoan infections on the host immune system and their potential contribution to disruption of mucosal immune homeostasis are not well understood. Protists, along with bacteria and viruses, are permanent representatives of the human microbiota. The main attention of researchers is focused on studying their pathogenic role in gastrointestinal diseases. However, their role in symbiotic relationships with hosts is relatively little studied. It was previously shown that the closest human ortholog of mouse *Trichomonas* (*Tritrichomonas* spp.) is *Trichomonas Dientamoeba fragilis*, which can cause symptoms of inflammatory bowel disease. It is currently unclear whether *Dientamoeba fragilis* and other protist species such as *Enteromonas* spp., *Entamoeba dispar* are commensals, pathobionts, or pathogens of the human intestinal tract. Thus, information about the mutualistic relationships between protists, the gastrointestinal microbiota, and the immune system of mice can be used to understand host-protozoan relationships in humans. The data obtained allow us to evaluate the potential contribution of commensal protozoa in the formation of protective mechanisms of the mucous membrane of animals and humans. We have previously shown that antibiotic therapy leads to an increase in the number of *Tritrichomonas* spp. along with a reduction in bacteria in the gut of mice with a mutation in the *Muc2* gene. A mutation in this gene leads to impaired formation of the intestinal mucosa in mice. Mice with a mutation in the *Muc2* gene can be used as model to study human inflammatory bowel diseases (IBDs). In this work, we conducted a comparative study of the immunological status of *Muc2*^{-/-} mice harboring *Tritrichomonas* spp. after antibiotic therapy for 2 weeks followed by gavage of *Lactobacillus johnsonii* into mice and mice without introduction of probiotic microorganisms (self-recovery). Analysis of the main populations of lymphocytes in the blood, spleen and lymph nodes showed that the introduction of *Lactobacillus johnsonii* after antibiotic therapy leads to a significant increase in the population of T-lymphocytes in the blood and spleen, and an increase in the number of helper T cells in the lymph nodes of *Muc2*^{-/-} mice compared to mice without the addition of probiotic microorganisms.

Key words: mucin 2, immunity, protozoal infection, intestines, *Tritrichomonas* spp., antibiotics.

Введение

В кишечнике млекопитающих обитает широкий консорциум микроорганизмов: различные типы вирусов, прокариотические бактерии и эукариотические микроорганизмы, включающих множество грибов, гельминтов и простейших. Трихомонады относятся к типу *Parabasalia*, классу *Trichomonadea*, отряду *Trichomonadida* [1]. Эти простейшие живут в анаэробно-микроаэрофильных, покрытых слизистой оболочкой, нестерильных полостях органов, таких как желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) и репродуктивные пути. Как и у большинства анаэробных простейших, у трихомонад отсутствуют многие собственные пути биосинтеза, и для выживания они используют метаболиты, которые нарабатывают клетки хозяина. Инфекция, связанная с трихомонадами, является рецидивирующей, без стойкого иммунитета, часто бессимптомной. Трихомонады паразитируют путем адгезии к эпителиальным клеткам репродуктивных путей или ЖКТ. Известно, что некоторые представители *Lactobacillus* spp. препятствуют адгезии трихомонад к эпителиальным клеткам, а некоторые представители, наоборот, способствуют [6]. Однако влияние этих видов

на организм хозяина и их потенциальный вклад в иммунный гомеостаз слизистой кишечника остаются малоизученными. Ранее было показано, что ближайшим человеческим ортологом трихомонады мышей (*Tritrichomonas* spp.) является трихомонада *Dientamoeba fragilis*, которая способна вызывать симптомы воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) [9]. В настоящее время нет достоверной информации являются ли *Dientamoeba fragilis* и другие виды протистов, такие как *Enteromonas* spp., *Entamoeba dispar*, патогенными возбудителями заболеваний кишечного тракта человека или комменсалами. Новые данные о влиянии *Tritrichomonas* spp. на микробиоту ЖКТ и иммунную систему у мышей могут быть использованы для понимания взаимоотношений хозяина и простейших у человека. Вовлечение в понимание этих взаимодействий представителей нормальной микробиоты *Lactobacillus johnsonii*, которые известно, что препятствуют адгезии трихомонад к эпителиальным клеткам, поможет оценить их вклад в активацию иммунитета. В последующем влияние комменсалов простейших на формирование защитных механизмов в слизистой оболочке необходимо будет учитывать при определении терапевтических схем лечения ВЗК.

Материалы и методы

Восьминедельных мышей *Muc2^{-/-}* содержали в индивидуально вентилируемых клетках (Optimise, США) с постоянным доступом к пище и воде при 22–25°C с 14 ч:10 ч циклом свет-темнота (световая фаза с 1:00 до 15:00). Все животные получали нестерилизованный стандартный рацион для грызунов (Р-22, БиоПро, Новосибирск), питьевую воду. После недели акклиматизации мыши были разделены на 2 группы (в среднем по 5 животных в группе), каждая группа получала коктейль антибиотиков в течение 14 дней. Коктейль антибиотиков готовили в питьевой воде с концентрацией: гентамицин 0,5 г/л, амоксицилин 0,5 г/л, ванкомицин 1 г/л и метронидазол 0,5 г/л. После завершения курса антибиотикотерапии экспериментальная группа получала *L. johnsonii* (10⁸ КОЕ/мышь) внутрижелудочно три раза в неделю в течение трех недель. Группа мышей без подселения пробиотических микроорганизмов (самовосстановление), также получавшая коктейль антибиотиков, далее получала воду. Анализ фенотипа лимфоцитов проводили с помощью проточной цитометрии. Клетки выделяли из селезенки и лимфоузлов с помощью сита для клеток, промывали PBS, для анализа брали 1 × 10⁵ клеток. Клетки крови обрабатывали буфером, лизирующим эритроциты, промывали PBS. Макрофаги выделяли из перитонеальной полости животных. После этого клетки метили моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромами, к поверхностным антигенам (BioLegend, США) в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Для анализа клеток использовали антитела анти-CD45-Pacific Blue анти-CD3-PE анти-CD4-FITC анти-CD8-PE/Cyanine7 анти-CD19-FITC анти-CD45RB-PE анти-CD25-PerCP/Cyanine5.5 анти-Foxp3-APC анти-CD38-PE/Cyanine7 анти-CD209-PE анти-Arg-APC анти-INOS-PE. Клетки промывали PBS и анализировали на проточном цитометре FACS Canto II (Becton Dickinson, США).

Для выделения простейших из фекалий использовали следующий протокол: свежесобранные фекалии от мышей помещали в 5 мл холодного раствора PBS, тщательно фильтровали (70 мкм), затем центрифугировали в течение 5 минут при 1200 rpm +4°C и промывали холодным PBS. Далее образец наносили на градиент (Percoll 40%/80%) и центрифугировали в течение 20 минут при 1000g. После отбирали содержимое интерфазы, отмывали два раза холодным PBS, микроскопировали с помощью метода «живая капля».

Данные в тексте представлены в виде средних ± SEM. Анализ выполняли с помощью статистики в Past 4.15. Выборки данных срав-

нивали между группами с помощью One-way PERMANOVA. Значение $p < 0,05$ считалось значимым.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что антибиотикотерапия приводит к увеличению количества *Tritrichomonas* spp. наряду с уменьшением бактерий в кишечнике мышей с мутацией в гене *Muc2* [2]. При этом у таких животных снижался уровень *Lactobacillus* spp. в ЖКТ. В настоящей работе анализ фекалий интактных мышей линии *Muc2^{-/-}* показал, что у 100% животных в фекалиях была обнаружена трихомонада *Tritrichomonas* spp. Для оценки иммунологического статуса мышей *Muc2^{-/-}*, в фекалиях которых была обнаружена *Tritrichomonas* spp., были сформированы две группы мышей (n = 4–5 голов). В течение двух недель мыши обеих групп получали коктейль из антибиотиков в питьевой воде. После проведения антибиотикотерапии мышам первой группы подсеяли пробиотический штамм *L. johnsonii* (10⁸ КОЕ/мышь), который ранее был выделен и охарактеризован от мышей дикого типа (C57BL/6) без признаков воспаления и наличия у них *Tritrichomonas* spp. Мышам второй группы не подсеяли пробиотические микроорганизмы (самовосстановление). Через две недели после отмены антибиотиков *Tritrichomonas* spp. была обнаружена у всех животных в группе самовосстановления микробиоты. Интересно, что у мышей, получавших *L. johnsonii*, протозойная инфекция при микроскопическом методе исследования не выявлялась на протяжении всего периода подселения пробиотиков. Полученные данные позволяют предположить, что пробиотические бактерии сдерживают развитие протозойных инфекций по сравнению с группой самовосстановления. Известно, что лактобактерии используют как молекулы широкого спектра действия (например, молочную кислоту), так и патоген-специфические молекулы, ингибирующие патогены [8]. Также ингибирующую активность штаммов *Lactobacillus* против *Trichomonas vaginalis* обнаружили Ниха Фукан с соавт. [7]. Было показано, что фактор, способствующий агрегации (APF-2) штамма *Lactobacillus gasseri*, в значительной степени способствует ингибированию адгезии *Trichomonas vaginalis* к эктоцервикальным клеткам человека. Также, известно, что лактобактерии снижают адгезию *Trichomonas vaginalis*, к эпителиальным клеткам хозяина на 60% [6]. Два штамма *L. johnsonii* снижали адгезивную способность *Trichomonas vaginalis* к эктоцервикальным клеткам. Пробиотические штаммы *Lactobacillus* могут влиять на патоген напрямую, препятствуя прикреплению или инвазии клетки-хозяина, либо косвенно, регулируя экс-

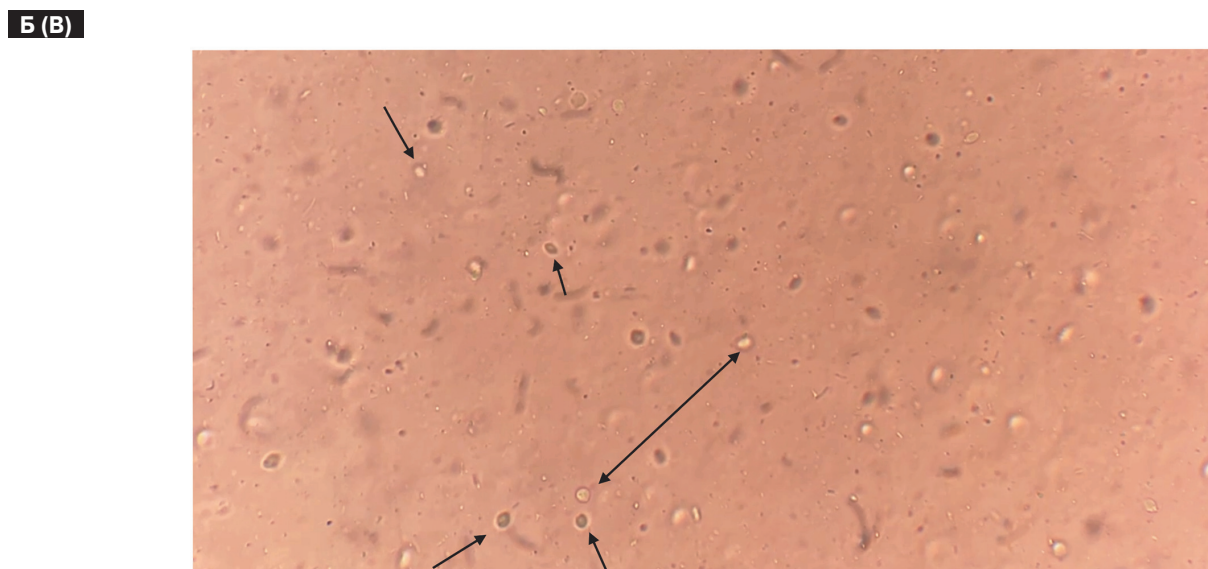
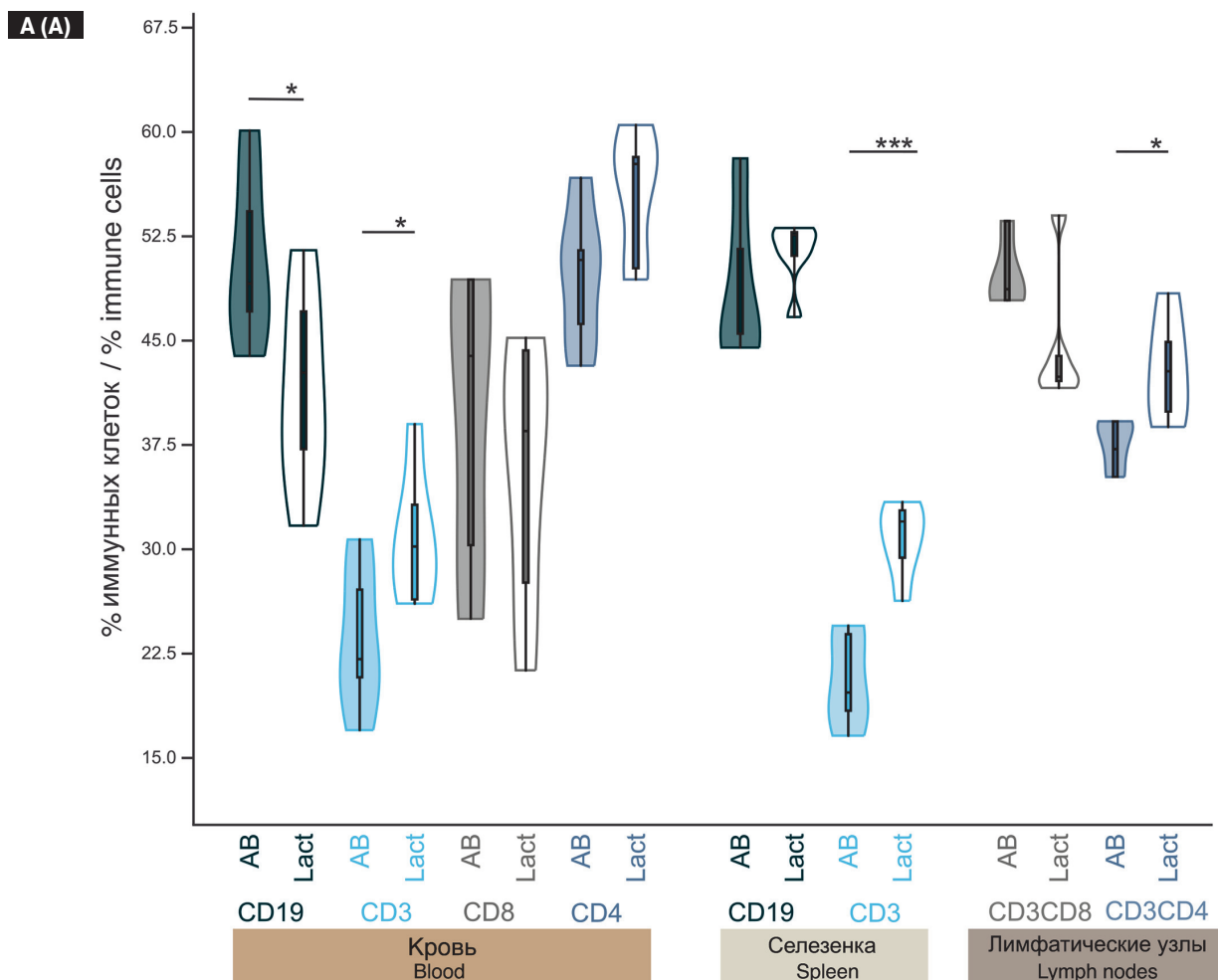


Рисунок А. Процент разных популяций лимфоцитов (CD45⁺CD19⁺, CD45⁺CD3⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺, CD45⁺CD3⁺CD4⁺) крови, селезенки и мезентериальных лимфатических узлов мышей после самовосстановления микробиоты (AB) и при применении пробиотического штамма *L. johnsonii* (Lact). *, *** — p < 0,05, p < 0,001 межгрупповое сравнение One-way PERMANOVA test.

Б. *Tritrichomonas* spp. в живой капле, выделенная из кишечника мышей *Muc2*^{-/-} (указана стрелками)

Figure A. Percentage of different lymphocyte populations (CD45⁺CD19⁺, CD45⁺CD3⁺, CD45⁺CD3⁺CD8⁺, CD45⁺CD3⁺CD4⁺) in the blood, spleen and mesenteric lymph nodes of mice after microbiota self-healing (AB) and using the probiotic strain *L. johnsonii* (Lact). *, *** — p < 0.05, p < 0.001 intergroup comparison One-way PERMANOVA test.

B. *Tritrichomonas* spp. in a live drop isolated from the intestines of *Muc2*^{-/-} mice (indicated by arrows)

прессию цитокинов, синтез муцина в слизистой оболочке хозяина. Таким образом, наблюдение о том, что штаммы *Lactobacillus* способны ингибировать развитие протозойной инфекции подтверждает полученные нами данные.

Конститутивная микробиота протистов является неотъемлемой частью микробиома позвоночных. Влияние *Tritrichomonas* spp. на иммунную систему хозяина в настоящее время недостаточно изучено. В данной работе было проведено исследование влияния трихомонады *Tritrichomonas* spp. на иммунную систему мышей *Muc2*^{-/-}, получавших *L. johnsonii* (внутрижелудочно) и мышей без подселения пробиотических микроорганизмов (самовосстановление). После отмены антибиотиков у всех животных в группе самовосстановления микробиоты была обнаружена *Tritrichomonas* spp. Однако в этой группе мышей процент CD4⁺CD45RB^{high} Т-клеток, способных индуцировать хроническое воспаление кишечника [10] достоверно не отличался от процента таких же клеток у неинфицированных мышей в группе, получавших пробиотический штамм *L. johnsonii*. Процент перитонеальных макрофагов М1 типа (CD38⁺; iNOS⁺) и М2 типа (CD209⁺; Arg⁺) также не отличался между исследуемыми группами. Этот факт свидетельствует об отсутствии развития острой воспалительной реакции в группе самовосстановления мышей *Muc2*^{-/-} в фекалиях, которых была обнаружена трихомонада. Таким образом, можно предположить, что *Tritrichomonas* spp. не вызывает развития воспалительной реакции и скорее всего является условно патогенной. Полученные нами данные совпадают с результатами, представленными в книге Baker [3].

Анализ содержания разных популяций лимфоцитов в крови, селезенке и мезентеральных лимфатических узлах у мышей в группах с подселением *L. johnsonii* после антибиотикотерапии и самовосстановления микробиоты представлен на рис. Процент Т-лимфоцитов в крови и селезенке был достоверно выше в группе, которая получала пробиотический штамм *L. johnsonii* в течение трех недель после антибиотикотерапии, по сравнению с группой мышей *Muc2*^{-/-}, с восстановлением микробиоты без применения пробиотиков. В крови процент В-клеток был достоверно ниже в группе с подселением пробиотического штамма *L. johnsonii* и отсутствием *Tritrichomonas* spp. относительно мышей, у которых на протяжении всего периода самовосстановления микробиоты в фекалиях детектировали *Tritrichomonas* spp. Таким образом, заселение лактобактерий, которые препятствуют развитию трихомонад в ЖКТ, способствует повышению процента Т-лимфоцитов и снижению В-лимфоцитов. Хорошо известно, что лимфоциты мигрируют из селезенки в региональные

лимфатические узлы, где они активируются. Было проведено сравнение профиля иммунных клеток в мезентеральных лимфатических узлах у мышей *Muc2*^{-/-} двух групп. Мышей линии *Muc2*^{-/-}, которые получали пробиотический штамм *L. johnsonii* и не имели *Tritrichomonas* spp. в фекалиях, в лимфоузлах наблюдался больший процент Т-хелперов по сравнению с животными с самовосстановлением микробиоты. Несмотря на это, достоверных различий по проценту цитотоксических Т-клеток в лимфоузлах между группами мышей носителями *Tritrichomonas* spp. и без *Tritrichomonas* spp. обнаружено не было. Это подтверждает отсутствие активации провоспалительной реакции в ответ на восстановление микробиоты вместе с *Tritrichomonas* spp. у мышей с нарушением барьерного слоя кишечника (мышей *Muc2*^{-/-}). Ранее было показано, что *Tritrichomonas musculus* активируют эпителиальные клетки, которые, стимулируя посредством интерлейкина-18 дендритные клетки, способствуют развитию Т-хелперов 1 и 17 типа иммунного ответа. Такой механизм обеспечивает формирование эффективной защиты от бактериальных инфекций [5]. Ранее, в экспериментах *in vitro* мы показали, что *L. johnsonii* способна стимулировать активацию дендритных клеток [4]. Чтобы исключить эффект антибиотикотерапии и подтвердить влияние *Tritrichomonas* spp. на изменение процента Т-хелперов в мезентеральных лимфатических узлах, была проанализирована популяция клеток лимфоузлов интактных мышей *Muc2*^{-/-}, среди которых 75% особей имели *Tritrichomonas* spp. Процент цитотоксических клеток мышей этой группы составил 46,9±5,2, что достоверно не отличается от группы с самовосстанавливающейся микробиотой. Процент хелперных Т-клеток был 41,1±4,2 в группе интактных мышей и не отличался от процента клеток мышей из группы самовосстановления.

Итак, можно предположить, что выявляемая у мышей *Tritrichomonas* spp. может быть условно-патогенной. Восстановление микробиоты совместно с *Tritrichomonas* spp. не вызывает развитие острой воспалительной реакции и даже не влияет на другие популяции лимфоцитов. В свою очередь добавление пробиотического штамма *L. johnsonii* повышает процент Т-клеток в крови и селезенке и увеличивает процент Т-хелперов в региональных лимфатических узлах у мышей с нарушенной барьерной функцией из-за отсутствия муцина-2. Требуется проведение дополнительных экспериментов для изучения механизма действия условно-патогенных протозоа на иммунитет слизистого слоя кишечника человека. В последующем необходимо будет учитывать такое влияние простейших на иммунитет при определении терапевтических схем лечения ВЗК.

Список литературы/References

1. Aquino M.F.K., Hinderfeld A.S., Simoes-Barbosa A. Trichomonas vaginalis. *Trends Parasitol.*, 2020, vol. 36, no. 7, pp. 646–647. doi: 10.1016/j.pt.2020.01.010
2. Achasova K.M., Kozhevnikova E.N., Borisova M.A., Litvinova E.A. Fucose Ameliorates Trichomonas sp.-Associated Illness in Antibiotic-Treated Muc2-/- Mice. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 19: 10699. doi: 10.3390/ijms221910699
3. Baker D.G. Parasites of Rats and Mice. In: *Flynn's Parasites of Laboratory Animals: Second Edition*; 2008, pp. 303–397. doi: 10.1002/9780470344552.ch11
4. Blinova E.A., Goncharova E.P., Kalmykova G.V., Akulova N.I., Litvinova E.A. Lactobacillus johnsonii modulation of bone marrow-derived dendritic cells generated from mice with null mutation of the Muc2 gene. *Medical Immunology (Russia)*, 2023, vol. 25, no. 3, pp. 587–594. doi: 10.15789/1563-0625-LJM-2831
5. Chudnovskiy A., Mortha A., Kana V., Kennard A., Ramirez J.D., Rahman A., Remark R., Mogno I., Ng R., Gnjatic S., Amir E.D., Solovyov A., Greenbaum B., Clemente J., Faith J., Belkaid Y., Grigg M.E., Merad M. Host-Protozoan Interactions Protect from Mucosal Infections through Activation of the Inflammasome. *Cell*, 2016, vol. 167, no. 2, pp. 444–456.e14. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.076
6. Phukan N., Parsamand T., Brooks A.E., Nguyen T.N., Simoes-Barbosa A. The adherence of Trichomonas vaginalis to host ectocervical cells is influenced by lactobacilli. *Sex. Transm. Infect.*, 2013, vol. 89, no. 6, pp. 455–459. doi: 10.1136/sextrans-2013-051039
7. Phukan N., Brooks A.E.S., Simoes-Barbosa A. A Cell Surface Aggregation-Promoting Factor from Lactobacillus gasseri Contributes to Inhibition of Trichomonas vaginalis Adhesion to Human Vaginal Ectocervical Cells. *Infect. Immun.*, 2018, vol. 86, no. 8: e00907-17. doi: 10.1128/IAI.00907-17
8. Spurbeck R.R., Arvidson C.G. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiol.*, 2011, vol. 6, no. 5, pp. 567–582. doi: 10.2217/fmb.11.36
9. Stark D., Garcia L.S., Barratt J.L., Phillips O., Roberts T., Marriott D., Harkness J., Ellis J.T. Description of Dientamoeba fragilis cyst and precystic forms from human samples. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 7, pp. 2680–2683. doi: 10.1128/JCM.00813-14
10. Steinbach E.C., Gipson G.R., Sheikh S.Z. Induction of Murine Intestinal Inflammation by Adoptive Transfer of Effector CD4+ CD45RB high T Cells into Immunodeficient Mice. *J. Vis. Exp.*, 2015, no. 98: 52533. doi: 10.3791/52533

Авторы:

Гончарова Е.П., к.б.н., младший научный сотрудник Центра технологического превосходства Новосибирского государственного технического университета, г. Новосибирск, Россия;

Бец В.Д., младший научный сотрудник Центра технологического превосходства Новосибирского государственного технического университета, г. Новосибирск, Россия;

Макушева Ю.С., младший научный сотрудник интеграционной лаборатории «Биоинженерия» Новосибирского государственного технического университета, г. Новосибирск, Россия;

Литвинова Е.А., к.б.н., научный сотрудник Центра технологического превосходства Новосибирского государственного технического университета, г. Новосибирск, Россия.

Authors:

Goncharova E.P., PhD (Biology), Junior Researcher, Center for Technological Excellence, Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russian Federation;

Bets V.D., Junior Researcher, Center for Technological Excellence, Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russian Federation;

Makusheva Yu.S., Junior Researcher, Integration laboratory "Bioengineering", Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russian Federation;

Litvinova E.A., PhD (Biology), Researcher, Center for Technological Excellence, Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.03.2024
Принята к печати 05.04.2024

Received 31.03.2024
Accepted 05.04.2024

ТЕЧЕНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗА У МЫШЕЙ ГАПЛОТИПА $H2^v$, АССОЦИИРОВАННОГО СО СВЕРХВЫСОКОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТЬЮ К ИНФЕКЦИИ

П.Г. Байкузина^{1,2}, Д.В. Горбачева^{1,3}, А.С. Апт¹, М.В. Коротецкая^{1,3}

¹ ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме. Генетические основы восприимчивости хозяина к патогену *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) и тяжесть течения инфекционного процесса изучены недостаточно. Поиск конкретных генов и зависимых от них иммунных реакций, влияющих на восприимчивость к туберкулезу, необходим для понимания механизмов патогенеза инфекционного процесса и определения мишеней для терапии инфекции, а также рационального конструирования новых вакцин. При работе с мышами линии B10.SM ($H2^v$) мы показали, что эта линия проявляет очень высокую чувствительность к туберкулезной инфекции, при этом очень мало данных о структуре генома этой линии мышей, в том числе собственно гаплотипа $H2^v$. Мы подобрали генетические маркеры *Mit* с длиной пробега в электрофорезе продуктов ПЦР, которые отличны у мышей линии B10.SM и конгенной по хромосоме 17 линии B10 ($H2^b$), гораздо более резистентной к инфекции. В модели инфекции, вызванной введением путем ингаляции двух разных доз *Mtb* (100 и 600 КОЕ/мышь), мы установили, что срок жизни животных двух линий достоверно короче у мышей B10.SM, а уровень размножения микобактерий в легких у них достоверно выше. Мы показали (внутриклеточное окрашивание и ELISA), что продукция легочными клетками CD4⁺ IFN γ у зараженных животных полностью соответствует данным по фенотипу самой инфекции. Более резистентные мыши B10 отличаются более высоким содержанием в легких IFN γ -положительных клеток и более высоким уровнем его секреции. При изучении влияния генетики хозяина на течение инфекционного процесса важно знать, по какому типу наследуется чувствительность и резистентность к заражению. Полученные нами данные показывают, что по времени выживания, размножению микобактерий в легких и выработке IFN γ гибриды (B10x B10.SM) F1 имеют промежуточный фенотип, то есть наследование идет по типу неполного доминирования. Эти данные были подтверждены сегрегационным анализом гибридов F2. Для более полного описания фенотипа линии B10.SM была проведена вакцинация животных BCG. Вакцинация достоверно снижала количество бактерий в легких после заражения и уровень легочной патологии, а также увеличивала продолжительность жизни животных, то есть высокая чувствительность к первичной инфекции не мешала эффективности вакцинации. Генетический и иммунологический анализ сверхчувствительной к туберкулезу линии мышей B10.SM будет продолжен, поскольку экспериментальные данные о причинах таких серьезных

Адрес для переписки:

Коротецкая Мария Валерьевна
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2,
ФГБНУ Центральный НИИ туберкулеза.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: mkorotetskaya@gmail.com

Contacts:

Mariya V. Korotetskaya
107564, Russian Federation, Moscow, Yauzskaya avenue, 2,
Central TB Research Institute.
Phone: +7 (499) 785-90-72.
E-mail: mkorotetskaya@gmail.com

Для цитирования:

Байкузина П.Г., Горбачева Д.В., Апт А.С., Коротецкая М.В.
Течение туберкулеза у мышей гаплотипа $H2^v$, ассоциированного
со сверхвысокой генетической восприимчивостью к инфекции //
Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 525–531. doi: 10.15789/2220-
7619-TCO-16612

Citation:

Baikuzina P.G., Gorbacheva D.V., Apt A.S., Korotetskaya M.V. The course
of tuberculosis infection in hyper-susceptible mice carrying the $H2^v$
haplotype // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 525–531. doi: 10.15789/2220-7619-
TCO-16612

Исследование поддержано грантом РФФ № 23-14-00030.

The study was supported by Grant No. 23-14-00030 of the Russian Science Foundation.

© Байкузина П.Г. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TCO-16612>

нарушений в защите от инфекции необходимы для понимания причин широкого спектра проявления заболевания в популяциях человека и рационального поиска новых вакцин и лекарств против туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, гаплотип, чувствительность, микобактерия, главный комплекс гистосовместимости, восприимчивость.

THE COURSE OF TUBERCULOSIS INFECTION IN HYPER-SUSCEPTIBLE MICE CARRYING THE *H2^v* HAPLOTYPE

Baikuzina P.G.^{a,b}, Gorbacheva D.V.^{a,c}, Apt A.S.^a, Korotetskaya M.V.^{a,c}

^a Central TB Research Institute, Moscow, Moscow, Russian Federation

^b Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation

^c M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Genetic regulation of the host susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) and severity of tuberculosis (TB) infection remain incompletely investigated. Identification of particular genes and involved in TB control and immune reactions regulated by these genes is essential for our understanding of pathogenesis of the disease, discovery of drug targets and rational vaccine development. We have shown that mice of the B10.SM (*H2^v*) strain are extremely TB susceptible; meanwhile, the general genome structure of this mouse strain and the *H2^v* haplotype itself are poorly characterized. We selected a pool of *Mit* genetic markers differentiating B10.SM mice from Chr. 17-congenic mice of the B10 strain by the PCR products motility in the electrophoresis setting. TB susceptibility of B10 mice is much lower than that of B10.SM. In the model of infection triggered by two different doses of *Mtb* (100 and 600 CFU per mouse) administered via respiratory tract we demonstrated that B10.SM mice have significantly shorter survival time and significantly higher lung mycobacterial multiplication compared to B10 mice. We demonstrated (intracellular staining and ELISA) that IFN γ production in the lungs of infected mice of the two strains corresponds well to their disease phenotypes. Thus, more resistant B10 mice possess significantly more lung IFN γ -positive CD4⁺ T cells and a higher level of IFN γ secretion. We have established (B10x B10.SM) F1 hybrids and demonstrated that the post-infection phenotypes of survival time, lung mycobacterial multiplication and IFN γ production in these mice are intermediate compared to parental mice. Thus, we deal with the genetic trait with incomplete dominance expression. These data were confirmed in F2 hybrids by segregation genetic analysis. To characterize the phenotype of B10.SM mice in more detail, we vaccinated these mice with the BCG vaccine before TB challenge. Vaccination significantly prolonged survival time, diminished mycobacterial multiplication in the lungs and the degree of lung tissue pathology. Thus, a high level of susceptibility to primary infection did not interfere with BCG vaccination efficacy. We intend to continue genetic and immunologic analyses of TB-hyper-susceptible B10.SM mice. Experimental data regarding the cause of extreme disturbances in protection against infection are prerequisite for our better understanding causality of the wide spectrum of TB manifestations in human populations, as well as for rational search for novel vaccines and medications against TB infection.

Key words: tuberculosis, haplotype, sensitivity, mycobacterium, major histocompatibility complex, susceptibility.

Введение

Туберкулез (ТБ) остается важной проблемой здравоохранения. По последним опубликованным данным ВОЗ около 25% населения планеты инфицированы *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). У 5–10% инфицированных в течение жизни может развиваться активная форма ТБ [10]. Восприимчивость хозяина к *Mtb* и тяжесть течения инфекции — это признаки со сложной и недостаточно изученной генетической регуляцией. Ответ организма хозяина на *Mtb* регулирует множество генов со сложными фенотипическими проявлениями [5]. Поиск конкретных генов и зависимых от них иммунных реакций, влияющих на восприимчивость к ТБ, необходим для понимания механизмов патогенеза туберкулеза и определения мишеней для терапии инфекции, а также рационального конструирования новых вакцин.

Модели туберкулезной инфекции на мышах важны для изучения генетического контроля восприимчивости к инфекции, поскольку позволяют обойти многие сложности исследования механизмов патогенеза болезни у человека. В частности, на животных гораздо проще применить прямой генетический подход, основанный на определении локализации генов, аллельные варианты которых определяют контрастные фенотипы проявлений заболевания. Носителей разных фенотипов скрещивают, и в расщепляющихся поколениях F2 или BC1 проверяют проявление интересующего фенотипа и сцепление с выбранными генетическими маркерами. Последующее получение набора рекомбинантных инбредных линий дает возможность охарактеризовать их фенотипы и определить, какая именно область генома связана с проявлением фенотипа.

Мыши линии B10.SM (*H2^v*) проявляют очень высокую чувствительность к туберкулезной

инфекции. Данная линия очень мало изучена, в частности из-за того, что в настоящее время она разводится только в виварии ФГБНУ «ЦНИИТ». Линия B10.SM имеет общую генетическую основу с линией B10 ($H2^b$), гораздо более устойчивой к ТБ. Линии отличаются только большим участком 17-й хромосомы, включающим область МНС мыши, комплекс $H2$. Область $H2$ содержит множество генов, регулирующих иммунный ответ, важнейшими из которых можно считать классические гены класса I и II. Большое количество иммунологически активных и высокополиморфных генов в составе МНС сильно затрудняет поиск значимых аллельных вариантов, влияющих на течение ТБ.

Кроме того, в 17-й хромосоме вызывает интерес и плохо изученный Т-комплекс. Некоторые мутации в генах Т-комплекса приводят к летальности эмбрионов, нарушениям эмбрионального развития хвостовой части позвоночника и стерильности самцов. Этот участок охватывает примерно треть 17-й хромосомы (35 Mb) и фланкирует область $H2$ с дистального участка. Из-за инверсий в Т-области возникают сложности с выведением мышей, рекомбинантных по этой части генома [3].

В области МНС вполне могут располагаться несколько генов, влияющих на течение ТБ. Во многих работах, выполненных на конгенных по области $H2$ линиях мышей и на разных популяциях человека, было показано участие генов МНС мыши и человека в определении уровня восприимчивости к ТБ и иммунного ответа на инфекцию [2]. Целью данной работы стала характеристика параметров иммунного ответа на инфекцию у мышей конгенных линий генотипов $H2^v$ и $H2^b$, а также определение точных границ интервала хромосомы 17, по которому они отличаются

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Для работы использовались инбредные линии мышей B10.SM/SnEgYCit (B10.SM, $H2^v$) и B10/SnEgYCit (B10, $H2^b$). Линии поддерживаются братско-сестринскими скрещиваниями в питомнике ФГБНУ «ЦНИИТ» в обычных условиях с доступом к корму и воде *ad libitum*. Использовались самки весом 20–22 г в начале эксперимента.

Генетическое типирование. Определение генетических полиморфизмов внутри сегмента хромосомы 17, включающего комплекс $H2$ и прилежащие области, проводили методом ПЦР. Определяли либо замены одного нуклеотида (SNP), либо простые полиморфизмы длин некодирующих последовательностей (SSLP, или маркеры *Mit*). Праймеры для определения *Mit* были взяты из открытой базы данных (www.jax.org).

Проводилось пробное типирование мышей B10 и B10.SM и для последующей работы отбирались те маркеры, которые давали четкие отличия между линиями по длине пробега ПЦР-продуктов в электрофорезе в 4% агарозном геле.

Культуры микобактерий, вакцинация и заражение. В работе использовали штаммы *Mtb* H37Rv и *M. bovis* BCG (Pasteur) из коллекции лаборатории иммуногенетики ФГБНУ «ЦНИИТ». Микобактерии размножали в жидкой среде Дюбо и хранили аликвотами по 10^8 КОЕ/мл при -70°C . Подготовка культур и заражение мышей в аэрозольной камере «GlasCol» (США) описаны ранее [7, 8]. Вакцину BCG вводили однократно в дозе 5×10^7 КОЕ в 0,2 мл физиологического раствора с 0,05% Tween 20, подкожно в холку.

*Определение количества *Mtb* и BCG в органах.* Стерильно выделяли легкие и селезенки зараженных и/или вакцинированных животных, гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора, а затем готовили серийные десятикратные разведения гомогенатов органов и высеивали на чашки Петри с агаром Дюбо (Difco, США) по 50 мкл на чашку. Чашки инкубировали при 37°C , через 21 дней подсчитывали количество колоний на чашке и пересчитывали их количество на орган (КОЕ/орган).

Приготовление суспензий клеток селезенки, лимфоузлов и легких. Методика приготовления суспензий клеток детально описаны в более ранних работах из нашей лаборатории [6]. Для работы с первичными культурами клеток легкого, лимфоузлов или селезенки выделенные клетки помещали в среду для культивирования (RPMI-1640, содержащая 5% FCS, 1 mM пируват, 4 mM L-глутамат, 50 мкг/мл смеси антибиотиков стрептомицина и пеницилина, 5×10^{-5} M β -меркаптоэтанол, 10 mM HEPES, все компоненты производства HiClone, Logan, UT, США).

Проточная цитофлуориметрия. Клеточную суспензию из легких индивидуальных мышей ($1-2 \times 10^6$ клеток) инкубировали 10 минут при 4°C с моноклональными антителами анти-CD16/CD32 (клон CT-17.1,17.2) для блокирования Fc-рецепторов, после чего 20 минут окрашивали моноклональными антителами анти-CD3e-FITC (BD Biosciences, клон 145-2C11), анти-CD44-PE (BioLegend, клон IM7), анти-CD8a-PerCp (BioLegend, клон 53-6.7), анти-CD62L-APC (BioLegend, клон MEL-14) и анти-CD4-Bv421 (BioLegend, клон GK1.5). Окрашенные клетки отмывали дважды и фиксировали 1% параформальдегидом, после чего анализировали на приборе BD FACSCanto II с помощью программного обеспечения FlowJo (Tree Star). Выявляли следующие фенотипы Т-клеток: $CD3^+CD4^+$, активированные — $CD3^+CD4^+CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{low}}$, неактивированные — $CD3^+CD4^+CD44^{\text{low}}CD62L^{\text{high}}$ [6].

Внутриклеточное окрашивание цитокинов антителами. $1,5 \times 10^6$ клеток легких инкубировали в присутствии убитых ультрафиолетом *Mtb* 72 часа, а затем на последние 12 часов добавляли блокатор аппарата Гольджи GolgiPlug (1 $\mu\text{g/ml}$; BD Biosciences). После отмывки у клеток легкого окрашивали поверхностные антигены антителами анти-CD4- и анти-CD8a-PerCp. Окрашивание цитокинов в клетках проводили с использованием набора Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) антителами анти-IFN γ -APC (BD Biosciences, клон XMG1.2) с соблюдением рекомендаций фирмы производителя.

Анализ продукции IFN γ проводили в супернатантах культур клеток селезенки, лимфоузлов или легких после 72-часовой инкубации при 37°C и 5% CO $_2$ методом ELISA с использованием набора DuoSet ELISA Development kit (R&D,

Таблица. Список маркеров *Mit*, которые давали продукт, имеющий отличие у линии В10 и В10.SM по весу, а значить отличающийся по набору последовательности нуклеотидов

Table. *Mit* markers list with different weights of PCR products between strains of mice В10 and В10.SM

Маркеры <i>Mit</i> markers	Геномная позиция на 17 хромосоме в миллионах пар оснований Genomic position on 17 chromosome in millions of base pairs
D17Mit164	3,97
D17Brg125	4,33
D17Mit172	6,14
D17Mit195	7,24
D17Mit133	24,99
D17Mit198	27,79
D17Mit16	33,6
D17Dcr4	33,737
D17Mit62	33,874
D17Mit82	33,81
D17Dcr6	34,75
D17Mit28	34
D17Mit13	35,298
D17Mit47	36,35
D17Mit148	36,94
D17Mit234	38,66
D17Mit263	41,22
D17Mit11	22 см*
D17Mit49	44,77
D17Mit177	48,02
D17Mit87	54,88
D17Mit152	65,24
D17Mit141	73,8
D17Mit244	91,16

DY485) с соблюдением рекомендаций фирмы производителя.

Приготовление гистологических срезов и окрашивание препаратов. Для определения степени воспаления и других патологических изменений в легких у исследуемых мышей среднюю долю правого легкого замораживали в режиме температурного градиента от -60°C до -20°C в течение 10 минут в электронном криотоме (ThermoShandon, Великобритания). Получали срезы толщиной 8–10 мкм. Срезы высушивали на воздухе, фиксировали в этаноле и окрашивали гематоксилином и эозином.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.) по методам корреляционного и вариационного анализа (ANOVA) и критерия Манна–Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

По старым данным, приведенным в монографиях по биологии МНС, мыши В10.SM отличаются от мышей В10 только участком 17-й хромосомы, несущим комплекс *H2*. Однако эта линия была выведена во времена, когда генетическое картирование проводилось по отторжению трансплантатов кожи и было очень неточным [9]. Поэтому для выполнения задач исследования необходимо было в первую очередь точно определить границы перенесенного на генетическую основу В10 участка генома в миллионах пар оснований (Mbp) с помощью методов современного генетического типирования.

Размер участка *H2^v* был определен с помощью маркеров *Mit*, отличающих аллельные варианты *H2^b* и *H2^v* (см. табл.). Было показано, что линии В10 и В10.SM отличаются по очень большому, содержащему сотни генов участку 17-й хромосомы размером более 70 млн пар оснований, включающему область *H2* (рис. 1А).

Высокий уровень восприимчивости к ТБ мышей В10.SM проявляется в сильно сокращенном сроке выживания после заражения двумя разными дозами *Mtb* по сравнению с мышами В10 (рис. 2Б, В) и достоверно более высоком уровне размножения микобактерий в легких (рис. 2Г, Е). Примечательно, что специфическая (стимулированная антигенами возбудителя) продукция клетками легкого зараженных мышей двух линий IFN γ , то есть основного цитокина обеспечивающего активацию зараженных макрофагов и уничтожение внутриклеточных микобактерий [4], оказалась достоверно выше у более резистентных мышей В10, несмотря на меньшее количество микобактерий в их легких (рис. 2Д, Ж)

Анализ клеточного состава легкого после заражения показал, что общая инфильтрация органа Т-клетками CD4⁺ была выше у мышей B10.SM, но процент активированных клеток с фенотипом CD44⁺CD62L⁻ в этой популяции оказался достоверно ниже, чем у мышей линии B10 (рис. 2А, Б). Такая же разница выявилась по количеству Т-клеток CD4⁺, продуцирующих IFN γ (внутриклеточное окрашивание, рис. 2В), что соответствует картине общей продукции этого цитокина (рис. 2Г). Разницы по количеству и уровню активации других типов клеток иммунной системы (Т-лимфоцитов CD8⁺, В-лимфоцитов CD19⁺, нейтрофилов Ly-6G⁺ и макрофагов F4/80⁺) нами найдено не было.

Мыши конгенных по *H2* линий отличаются не только по тяжести течения первичного ТБ, но и по эффективности вакцинации BCG, причем между этими параметрами не всегда наблюдается корреляция [1]. Для более полного описания фенотипа мышей B10.SM мы провели вакцинацию этих мышей и через 5 недель заразили вакцинированных и невакцинированных животных. По кривой выживаемости,

количеству микобактерий в легких и картине патологии оказалось, что вакцинация BCG вполне эффективна (рис. 2Д-Ж). У предварительно вакцинированных животных достоверно снизилось размножение микобактерий в легких (рис. 2Д) и повысилось время выживания (рис. 2Е). У невакцинированных мышей наблюдалось диффузное воспаление легочной ткани, тогда как у вакцинированных мышей очаги воспаления были более четко отделены от здоровой ткани (рис. 2Ж). Таким образом, сверхвысокая чувствительность мышей B10.SM к *Mtb* не мешает эффективности иммунного ответа на вакцину BCG.

Для последующей работы по сужению генетического интервала, определяющего высокую восприимчивость к инфекции, и началу поиска генов-кандидатов, важно было выяснить тип наследования высокой чувствительности к ТБ. С этой целью мы получили гибридов, между двумя линиями. У гибридов (B10 x B10.SM) F1 наблюдается промежуточный фенотип по выживаемости (рис. 2А), размножению *Mtb* в легких (рис. 2Б) и продукции IFN γ (рис. 2В),

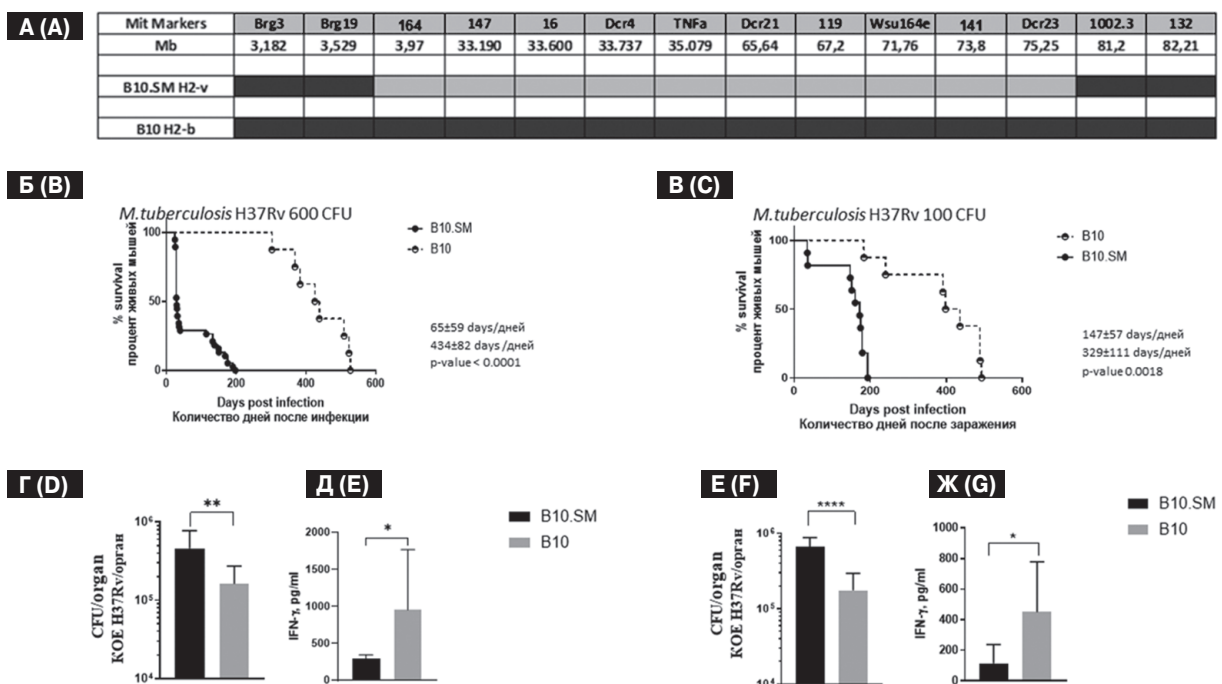


Рисунок 1. Отличия между линиями мышей B10 и B10.SM

Figure 1. Differences between the B10 and B10.SM mouse strains

Примечание. (А) Участок гаплотипа *H2^v* (серый) на генетической основе гаплотипа *H2^b* (черный) 17-й хромосомы, определенный с помощью метода ПЦР-анализа с набором маркеров *Mit*. Кривые выживания мышей двух линий после заражения *Mtb* в дозе 600 (Б) и 100 (В) КОЕ через респираторный тракт. Размножение *Mtb* в легких после заражения высокой (Г) и низкой (Е) дозой. Продукция IFN γ клетками легкого мышей, зараженных высокой (Д) и низкой (Ж) дозой возбудителя, после стимуляции *in vitro* полиантигеном *Mtb*. *, **, **** = $p < 0.05$, $p < 0.01$ и $p < 0.0001$ соответственно.

Note. (A) Mice B10.SM carry region of *H2^v* (gray color) haplotype on *H2^b* background (black color) of 17 chromosome determined using PCR analysis with *Mit* markers. Survival curves of strains B10.SM and B10 after aerosol *Mtb* infection with dose of 600 (B) and 100 (C) CFU. Reproduction of *Mtb* in the lungs after high (D) and low (F) dose infection. Production of IFN γ by lung cells of mice infected with a high (E) and low (G) dose of the pathogen after stimulation *in vitro* with *Mtb* poly-antigen.

*, **, **** = $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.0001$, respectively.

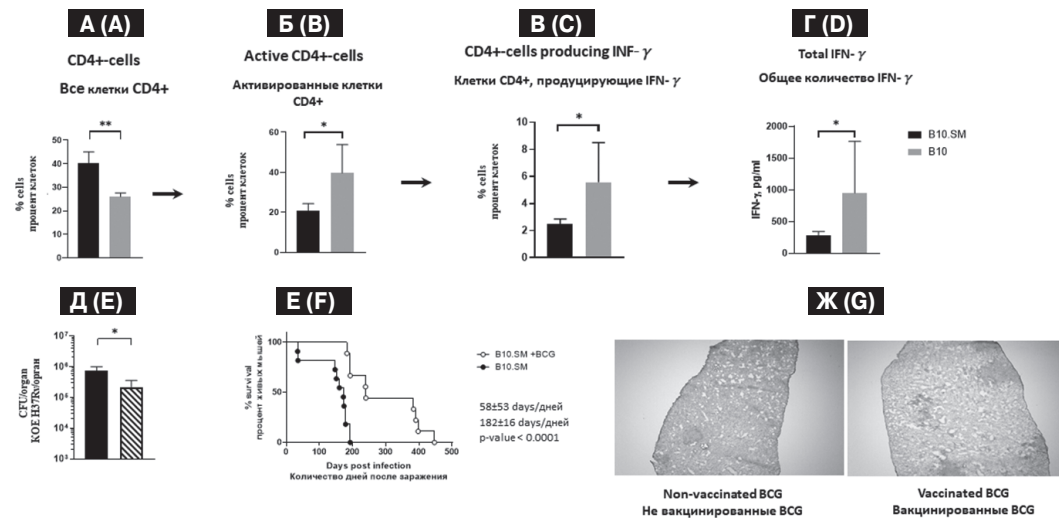


Рисунок 2. Количество и уровень активации T-клеток CD4⁺ у мышей двух линий после заражения и ответ на вакцинацию BCG мышей B10.SM

Figure 2. Communication between the number and level of activation of CD4⁺ T cells with the susceptibility of mice strain B10.SM, and response to BCG vaccination

Примечание. Общий процент (А), доля активированных (Б) количество продуцентов IFN γ среди T-клеток CD4⁺ (В) и общая секреция всеми клетками легких IFN γ *in vitro* (Г) после заражения туберкулезом. (Д) — количество *Mtb* в легких у мышей после вакцинации и последующего заражения H37Rv в дозе 600 КОЕ/мышь; (Е) — кривая выживаемости мышей после вакцинации и последующего заражения; (Ж) — патология легких у вакцинированных и невакцинированных животных после заражения, окрашивание гематоксилином-эозином, увеличение $\times 25$.

Note. Total percentage CD4⁺ by all lung cells (A), proportion activated T-cells (B), number of IFN γ producers among CD4⁺ T cells (C) and total secretion of IFN γ by all lung cells *in vitro* (D) after tuberculosis infection. (E) — the number of *Mtb* in the lungs of mice after vaccination and subsequent infection with H37Rv at a dose of 600 CFU/mouse; (F) — survival curve of mice after vaccination and subsequent infection; (G) — pathology of the lungs in vaccinated and unvaccinated animals after infection, staining with hematoxylin-eosin, magnification $\times 25$.

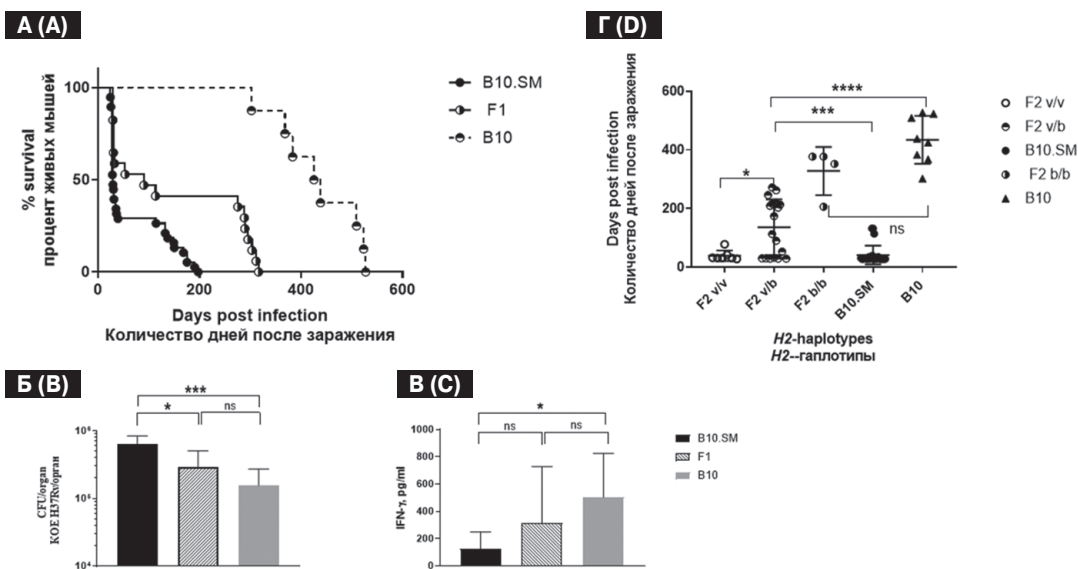


Рисунок 3. Промежуточная восприимчивость к инфекции гибридов (B10.SM x B10) F1 и F2

Figure 3. Intermediate susceptibility to infection of hybrids (B10.SM x B10) F1 and F2

Примечание. (А) — кривые выживания после заражения дозой 600 КОЕ/мышь. (Б) — Размножение *Mtb* в легких. (В) — Специфическая продукция IFN γ клетками легких. (Г) — картина неполного доминирования при сегрегационном генетическом анализе гибридов F2.

Note. (A) — survival curves after infection with a dose of 600 CFU/mouse. (B) — reproduction of *Mtb* in the lungs. (C) — Specific production of IFN γ by lung cells. (D) — segregation genetic analysis of F2 hybrids.

что соответствует наследованию по типу неполного, или промежуточного, доминирования. Такая картина наследования не характерна для генов МНС класса I и II, для которых чаще всего наблюдается кодоминирование.

Более надежным источником данных о типе наследования являются гибриды F2. Получив таких гибридов, мы провели генетическое типирование на носительство генотипов H2^{v/v}, H2^{v/b} и H2^{b/b} и заразили животных *Mtb*. Среднее время выживания мышей с генотипом H2^{v/v} не отличалось от мышей родительской линии В10.SM, гибриды с гетерозиготным вариантом имели промежуточный фенотип, а носители генотипа H2^{b/b} не отличались от мышей В10 (рис. 2Г). Таким образом, наследование резистентности по типу промежуточного доминирования было подтверждено сегрегационным анализом (рис. 2Г).

Список литературы/References

1. Apt A.S., Avdienko V.G., Nikonenko B.V., Kramnik I.B., Moroz A.M., Skamene E. Distinct H-2 complex control of mortality, and immune responses to tuberculosis infection in virgin and BCG-vaccinated mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 1993, vol. 94, no. 2, pp. 322–329. doi: 10.1111/j.1365-2249.1993.tb03451.x
2. Apt A.S., Logunova N.N., Kondratieva T.K. Host genetics in susceptibility to and severity of mycobacterial diseases. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2017, vol. 106, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.tube.2017.05.004
3. Artzt K. Relationship of the murine t-haplotypes and the H-2 complex. *Surv. Immunol. Res.*, 1983, vol. 2, no. 3, pp. 278–280. doi: 10.1007/BF02918431
4. Cooper A.M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, vol. 27, pp. 393–422. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132703
5. Kramnik I.B., Dietrich W.F., Demant P., Bloom B.R. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 15, pp. 8560–8565. doi: 10.1073/pnas.150227197
6. Lyadova I.V., Eruslanov E.B., Khaidukov S.V., Yermeev V.V., Majorov K.B., Pichugin A.V., Nikonenko B.V., Kondratieva T.K., Apt A.S. Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyperresistant to Mycobacterium tuberculosis-triggered disease. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, no. 10, pp. 5921–5931. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5921
7. Radaeva T.V., Kondratieva E.V., Sosunov V.V., Majorov K.B., Apt A.S. A human-like TB in genetically susceptible mice followed by the true dormancy in a Cornell-like model. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2008, vol. 88, no 6, pp. 576–585. doi: 10.1016/j.tube.2008.05.003
8. Radaeva T.V., Nikonenko B.V., Mischenko V.V., Averbakh M.M.Jr., Apt A.S. Direct comparison of low-dose and Cornell-like models of chronic and reactivation tuberculosis in genetically susceptible I/St and resistant B6 mice. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2005, vol. 85, no. 1-2, pp. 65–72. doi: 10.1016/j.tube.2004.09.014
9. Snell G.D. Congenic resistant strains of mice. In: *Origins of Inbred Mice*. Ed. by H.C. Morse. New York: Academic Press, 1978.
10. World Health Organization. Global tuberculosis report 2023. URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>

Авторы:

Байкузина П.Г., лаборант-исследователь лаборатории иммуногенетики отдела иммунологии ФГБНУ Центральный НИИ туберкулеза, Москва, Россия; лаборант Сколковского института науки и технологий, Москва, Россия;

Горбачева Д.В., лаборант-исследователь лаборатории иммуногенетики отдела иммунологии ФГБНУ Центральный НИИ туберкулеза, Москва, Россия, студентка 6-го курса факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Апт А.С., д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики отдела иммунологии ФГБНУ Центральный НИИ туберкулеза, Москва, Россия;

Коротецкая М.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики отдела иммунологии ФГБНУ Центральный НИИ туберкулеза, Москва, Россия; преподаватель факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

Обсуждение

Мы получили подробную картину фенотипов мышей линии В10.SM с мало изученным гаплотипом H-2^v в отношении тяжести течения ТБ. Помимо фенотипов мы смогли уточнить размер участка гаплотипа H-2^v, который был перенесен на генетическую основу линии мышей В10 в период выведения линии В10.SM. Область поиска гена-кандидата составляет чуть больше 70 млн пар оснований. Новые рекомбинантные линии, выведением которых мы занимаемся в настоящее время, дадут нам возможность сократить участок поиска генов на 17-й хромосоме и соотнести их с фенотипическими проявлениями. Следующим этапом станет поиск генов-кандидатов и определение того, какие регуляторные пути нарушены у сверхчувствительных к ТБ рекомбинантных конгенных мышей.

Authors:

Baikuzina P.G., Research Assistant, Laboratory for Immunogenetics, Department of Immunology, Central TB Research Institute, Moscow, Russian Federation; Technician, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation;

Gorbacheva D.V., Research Assistant, Laboratory for Immunogenetics, Department of Immunology, Central TB Research Institute, Moscow, Russian Federation; Undergraduate Student, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

Apt A.S., DSc (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Immunogenetics, Immunology Department, Central TB Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Korotetskaya M.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunogenetics, Department of Immunology, Central TB Research Institute, Moscow, Russian Federation; Lecturer, Department of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ miR-222-3p В КУЛЬТУРЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS МАКРОФАГОВ НЕ ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЯ НА ИХ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

Г.С. Шепелькова, В.В. Евстифеев, В.В. Еремеев

ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Резюме. Туберкулез, вызываемый *Mycobacterium tuberculosis*, является тяжелым бременем для общественного здравоохранения. Врожденный и адаптивный иммунитет в организме человека выступают в качестве надежной защиты от патогенов. Однако в процессе коэволюции с человеком этот микроб приобрел множество механизмов, позволяющих обходить иммунный ответ и обеспечивающих его внутриклеточное существование и длительное выживание в организме хозяина. Более того, появившиеся данные свидетельствуют о том, что эта скрытная бактерия может изменять экспрессию регуляторных некодирующих РНК (в том числе микроРНК), что впоследствии приводит к дисрегуляции биологических процессов, что может быть причиной патогенеза туберкулеза. Так, например, было показано, что miR-222-3p регулирует функциональное перепрограммирование макрофагов и участвует в регуляции врожденного иммунитета хозяина. Ранее нами была продемонстрирована важная роль miR-222-3p в качестве биологического маркера активности туберкулезного процесса. Многие исследовательские группы работают над установлением функциональных связей между экспрессией микроРНК в различных условиях и их реальным биологическим действием, методами молекулярной биологии и биоинформатики, чтобы подтвердить их биологические мишени и понять их роль в патогенезе туберкулеза. В настоящем исследовании путем использования культуры *in vitro* человеческих макрофагов моноцитарного происхождения, активированных антигенами микобактерий туберкулеза, нам удалось продемонстрировать влияние гиперэкспрессии miR-222-3p на некоторые функции этих клеток. В частности, мы установили, что гиперэкспрессия miR-222-3p приводит к достоверному снижению экспрессии IL-6, IFN γ и увеличению экспрессии IL-1 β и sxc110 в культуре неинфицированных макрофагов. Культуры инфицированных Мф с гиперэкспрессией miR-222-3p, также, как и инфицированные Мф без трансфекции, характеризовались повышенным уровнем экспрессии NF-IL6. Еще одним важным фактом стало наблюдение о том, что гиперэкспрессия miR-222-3p приводит к небольшому, но тем не менее достоверному увеличению продукции активных форм азота инфицированными Мф, однако не влияет на их бактериостатическую активность в отношении *M. tuberculosis*. Выяснение функций различных микроРНК в регуляции разнообразных патогенных сигнальных путей при ТБ может привести к обнаружению новых терапевтических мишеней.

Адрес для переписки:

Шепелькова Галина Сергеевна
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2, ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Contacts:

Galina S. Shepelkova
107564, Russian Federation, Moscow, Yauza alley, 2,
Central Tuberculosis Research Institute.
Phone: +7 (499) 785-90-72.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Для цитирования:

Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Еремеев В.В. Гиперэкспрессия miR-222-3p в культуре инфицированных *Mycobacterium tuberculosis* макрофагов не оказывает влияния на их бактериостатическую активность // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 532–538.
doi: 10.15789/2220-7619-OMI-16717

Citation:

Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Yermeev V.V. Overexpressing miR-222-3p in cultured mycobacterium tuberculosis-infected macrophages does not affect their bacteriostatic activity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 532–538.
doi: 10.15789/2220-7619-OMI-16717

Детальное изучение микроРНК, регулирующих иммуноассоциированные пути, полезно для разработки молекул миРНК-миметиков — ингибиторов или активаторов. Иммуные эффекты, индуцированные препаратами микроРНК, в настоящее время являются основной проблемой микроРНК-терапии.

Ключевые слова: туберкулез, макрофаги, микроРНК, бактериостатическая активность, гиперэкспрессия, воспаление.

OVEREXPRESSING miR-222-3p IN CULTURED *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*-INFECTED MACROPHAGES DOES NOT AFFECT THEIR BACTERIOSTATIC ACTIVITY

Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Yermeev V.V.

Central Tuberculosis Research Institute (CTRI), Moscow, Russian Federation

Abstract. Tuberculosis, a disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*, is a major public health concern. Innate and adaptive immunity provide robust defense against pathogens. However, *M. tuberculosis*, which co-evolved with humans, has acquired many mechanisms to evade the immune response and ensure its intracellular existence and long-term survival within the host. Moreover, emerging evidence suggests that this secretive bacterium can alter expression of regulatory noncoding RNAs (including microRNAs), leading to dysregulation of biological processes underlying tuberculosis pathogenesis. For example, miR-222-3p has been shown to regulate the functional reprogramming of macrophages and is involved in the regulation of host innate immunity. Previously, we demonstrated the important role of miR-222-3p as a biological marker of tuberculosis activity. To confirm their biological targets and understand their role in the pathogenesis of tuberculosis, many research groups are working to establish functional relationships between miRNA expression under different conditions and their actual biological action using molecular biology and bioinformatics methods. In the present study, we demonstrated the effect of miR-222-3p overexpression on several functions of human macrophages of monocytic origin activated with *M. tuberculosis* antigens in in vitro culture. Specifically, we found that miR-222-3p overexpression significantly decreased IL-6 and IFN γ expression and increased IL-1 β and cxcl10 expression in cultures of uninfected macrophages. Infected macrophages overexpressing miR-222-3p were characterized by increased NF- κ B and IL-6 expression, as were infected macrophages without transfection. Another important finding was that miR-222-3p overexpression caused a small but significant increase in reactive nitrogen species production by infected macrophages, but did not affect their bacteriostatic activity against *M. tuberculosis*. Elucidating the functions of different microRNAs in regulating different pathogenic pathways in TB may lead to discovering new therapeutic targets. The detailed study of microRNAs that regulate immune-associated pathways will be useful for the design of miRNA mimetic molecules, either as inhibitors or as activators. Immune effects induced by miRNA drugs are currently a major challenge for miRNA therapeutics.

Key words: tuberculosis, macrophages, miRNA, bacteriostatic activity, overexpression, inflammation.

Введение

Актуальность выявления новых легкодоступных биомаркеров для диагностики туберкулеза (ТБ), а также маркеров, способных указать на обострение воспаления, изменение активности инфекционного процесса при ТБ не вызывает сомнения. Ведущая роль в иммунном ответе, развивающемся при ТБ инфекции, принадлежит профессиональным фагоцитам, а именно, макрофагам. Макрофаги являются первой линией защиты на пути микобактерий. Данные клетки вовлечены в развитие как врожденного, так и адаптивного иммунного ответов. Макрофаги способны нейтрализовать и устранять бактерии путем индукции апоптоза, воспалительных реакций и фагоцитарной активности [12]. За тысячелетия сосуществования с человеком микобактерии, как организм с внутриклеточным типом паразитирования, выработали широкий спектр защитных механизмов, препятствующих их элиминации. Так, микобактерии способны 1) препятствовать фа-

гоцитозу, а также образованию фаголизосом в макрофагах; 2) нейтрализовать кислую среду [3]; 3) блокировать формирование мембраны апоптотических везикул [4]; 4) ингибировать восстановление плазматической мембраны, что может приводить к распространению инфекции через некроз макрофагов [2]; 5) подавлять активацию иммунных клеток, препятствовать презентации антигена; 6) модулировать экспрессию генов связанных с патогенезом заболевания и влиять на экспрессию микроРНК (miRs) через ключевые точки их регуляции.

miRs — это короткие, биологически консервативные некодирующие РНК, участвующие в регуляции ряда клеточных (пролиферация, дифференцировка и апоптоз) и физиологических процессов, таких как воспалительный ответ, эмбриогенез и онкогенез [8]. Регуляторная роль молекул miRs показана как при аутоиммунных, так и при инфекционных заболеваниях. Они служат своего рода факторами, запускающими либо тормозящими развитие реакций врожденного и адаптивного ответов и, таким образом,

могут играть решающую роль в развитии бактериальных инфекционных заболеваний [6]. miRs потенциально могут быть использованы в качестве диагностических и прогностических биомаркеров заболевания и ответа на терапию. Ряд исследований посвящен поиску miRs маркеров в легкодоступных биообразцах, таких как цельная кровь. В нашем предыдущем исследовании мы описываем паттерн экспрессии из 6 зрелых сывороточных miRs (miR-155-5p, miR-191-5p, miR-223-5p, miR-222-3p, miR-26a-5p и miR-320-5p) у пациентов с различными вариантами ТБ легких. По уровню и направлению экспрессии данных miR можно охарактеризовать различные варианты течения ТБ (с разной интенсивностью воспалительных иммунологических процессов) [10, 11]. Чувствительность и специфичность вышеупомянутых miRs в качестве использования их как биомаркеров активности ТБ 88–100%.

Ранее было показано, что miR-222-3p регулирует функциональное перепрограммирование макрофагов и участвует в регуляции врожденного иммунитета хозяина. Кроме того, продемонстрировано снижение экспрессии этой miR под действием внутриклеточной паразитарной инфекции *Echinococcus multilocularis*, участие данной miR в регуляции иммунной функции макрофагов [13]. Однако механизм действия miR-222 при ТБ остается неизвестен. В нашей работе мы исследуем влияние гиперэкспрессии miR-222 на функцию макрофагов при экспериментальной ТБ инфекции.

Материалы и методы

Выделение моноцитов крови и культивирование макрофагов. В работе использовали цельную кровь здоровых доноров. Донорами до момента забора крови была подписана форма добровольного информированного согласия. Исследование было одобрено ЛЭК ФГБНУ «ЦНИИТ» (протокол № 13 от 28.12.2021). Мононуклеары выделяли из крови здоровых доноров с использованием градиента фикола с плотностью 1,077 г/л (ПанЭко, Россия). После чего клетки отмывали и инкубировали 3 часа в чашках Петри при 37°C и 5% CO₂ в среде DMEM (ПанЭко, Россия). Из прилипших к пластику моноцитов «воспитывали» макрофаги по методу, описанному S. Saeed и коллегами [9] в присутствии 10% активной человеческой сыворотки. В экспериментах использовали сыворотку, полученную от тех же доноров, что и кровь для выделения моноцитов, либо донорскую сыворотку от доноров с идентичной группой крови АВ0 и резус-фактором. Обогащение культуры моноцитов макрофагами оценивали по экспрессии макрофагального поверхностного маркера CD163.

Антигены. В работе использовали вирулентный штамм *M. tuberculosis* H37RV Pasteur из коллекции ФГБНУ «ЦНИИТ». Нарработку микобактерий для экспериментов *in vitro* производили по ранее описанной методике [7]. В ряде экспериментов *in vitro* в качестве антигена использовали ультразвуковой дезентиграт культуры микобактерий (микобактериальный соникат) 10 мкг/мл. Соникат микобактерий был любезно предоставлен В.Г. Авдиенко.

Трансфекция. Для стимуляции гиперэкспрессии miR-222 использовали синтетический аналог данной miR:

hsa-miR-222: (rC)(U)(rC)-(rA)(rG)(U)-(rA)(rG)(rC)-(rC)(rA)(rG)-(U)(rG)(U)-(rA)(rG)(rA)-(U)(rC)(rC)-(U).

Трансфекцию малой интерферирующей РНК осуществляли с использованием набора HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Германия) согласно рекомендации фирмы изготовителя. Через 72 часа трансфицирования макрофаги отмывали и культивировали с контрольной средой в течение 24 часов. Полученные таким образом культуры клеток использовали в экспериментах *in vitro*. В качестве отрицательного контроля макрофаги трансфицировали смесью без РНК и смесью, содержащей Negative Control siRNA (Qiagen, Германия) (NC).

Выделение РНК и синтез кДНК. Для выделения суммарной РНК из культуры макрофагов использовали TRIzol® Reagent (ThermoFisher Scientific (Ambion), США). Полученные образцы РНК использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК. кДНК получали при помощи набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия). кДНК miRs получали при помощи TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с методикой, описанной ранее [10].

ПЦР в реальном времени. qRT-PCR с кДНК проводили с использованием системы CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США), специфических праймеров, зондов TaqMan и реагентов ThermoFisher Scientific (Applied Biosystems, США) для определения уровней мРНК генов, связанных с воспалением. GAPDH использовался в качестве гена домашнего хозяйства.

Для определения уровней экспрессии miR использовали TaqMan™ Advanced miRNA Assay (ThermoFisher Scientific, США). Ген miR-186 был выбран в качестве гена с постоянным уровнем экспрессии в соответствии с рекомендациями TaqMan® Advanced miRNA Assays User Guide (ThermoFisher Scientific, США).

Определение бактериостатической функции макрофагов. Бактериостатическую функцию макрофагов оценивали методом регистрации включения [³H]-урацила микобактериями при совместном культивировании с макрофагами

по ранее описанной методике [1]. Подавление роста микобактерий в культурах Мф представляли в процентах от включения [^3H]-урацила микобактериями в культурах без Мф. Продукцию активных форм азота макрофагами при их совместном культивировании с микобактериями определяли по концентрации нитрит-аниона с использованием реактива Грисса [1].

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки полученных данных использовали t-тест с поправкой на множества Бонферони при сравнении более двух групп. Отличия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для получения макрофагальной культуры с гиперэкспрессией miR-222, Мф, «воспитанные» из моноцитов крови, подвергали трансфекции синтетическим аналогом hsa-miR-222. Через 72 часа клетки отмывали от среды трансфекции и культивировали 24 часа в присутствии либо в отсутствии сониката микобак-

терий. Из рис. 1А видно, что наличие микобактериальных антигенов в культуре неинфицированных Мф вело к достоверному снижению экспрессии miR-222. Обработка «наивных» макрофагов синтетическим аналогом miR-222 приводила к достоверному усилению экспрессии данной miR. В то время как наличие микобактериальных антигенов в культуре отменяло эффект гиперэкспрессии miR-222. Отрицательным контролем в экспериментах *in vitro* являлись культуры макрофагов человека, обработанные трансфицирующим агентом без РНК и смесью трансфицирующего агента с NC. Достоверных отличий между культурами «наивных» Мф (без трансфекции) и культурами отрицательного контроля в экспериментах *in vitro* получено не было.

Усиление экспрессии miR-222 приводило к подавлению экспрессии miR-26a в неинфицированных Мф, но не влияло на экспрессию последней при наличии в культуре антигенов микобактерий (рис. 1Б). Воздействие сониката микобактерий на культуру Мф приводило к достоверному понижению экспрессии miR-191,

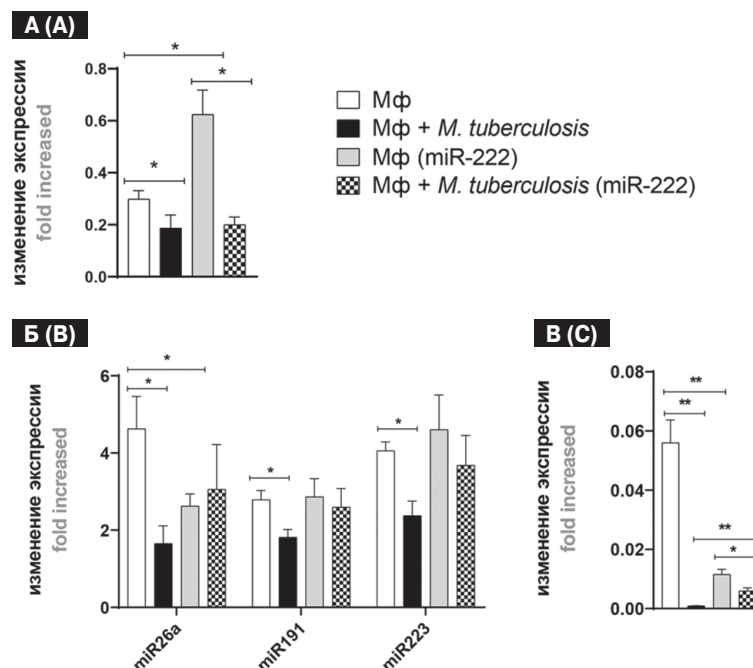


Рисунок 1. Влияние усиления экспрессии has-miR-222 на экспрессию miRs макрофагами при экспериментальной ТБ инфекции

Figure 1. Effect of increased has-miR-222 expression on macrophage miR expression during experimental TB infection

Примечание. Стимуляцию гиперэкспрессии miR-222 в культуре Мф человека проводили с помощью синтетического аналога данной miR (см. Материалы и методы) (время трансфекции 72 часа). Трансфицированные и «наивные» Мф культивировали в присутствии/в отсутствии микобактериальных антигенов. Через 24 часа в культурах Мф определяли уровень экспрессии miR-222 (А); miR-26a, miR-191, miR-223 (Б) и miR-320 (В). Представлены средние значения \pm SEM ($n = 3$ повтора на группу); * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$

Note. The hyperexpression of miR-222 in human MF culture was stimulated using a synthetic analog of this miR (see Materials and Methods) (transfection time 72 h). Transfected and naive MFs were cultured in the presence or absence of mycobacterial antigens. After 24 hours, the expression levels of miR-222 (A); miR-26a, miR-191, miR-223 (B) and miR-320 (C) were determined in MF cultures. Means \pm SEM are shown ($n = 3$ replicates per group); * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$.

miR-223 и miR-320 (рис. 1Б, В). Гиперэкспрессия miR-222 отменяла данное действие микобактериальных антигенов для miR-191 и miR-223; и не влияла на экспрессию данных miR в культуре «наивных» Мф (рис. 1Б). В случае miR-320 увеличенное количество miR-222 в культуре приводило к сильному достоверному снижению экспрессии данной miR неинфицированными Мф и увеличивало экспрессию miR-320 в присутствии в культуре антигенов микобактерий (рис. 1В).

В этих же культурах оценивали экспрессию факторов воспаления (цитокинов и хемокинов). Было продемонстрировано, что гиперэкспрессия miR-222 приводит к достоверному снижению экспрессии IL-6, IFN γ и увеличению экспрессии IL-1 β и sxc110 в культу-

ре неинфицированных Мф (рис. 2А, В, Д, Е). Причем при усиленной экспрессии miR-222, как и в культурах клеток без трансфекции, экспрессия IL-6 и IL-1 β достоверно выше в культуре, содержащей соникат (рис. 2А, Д); в то время как уровень экспрессии IFN γ не менялся и был одинаков в инфицированных культурах Мф после трансфекции и без трансфекции (рис. 2В). Экспрессия sxc110 достоверно увеличивалась у трансфицированных Мф в присутствии сониката (рис. 2Е). Культуры инфицированных Мф с гиперэкспрессией miR-222, также, как и инфицированные Мф без трансфекции, характеризовались повышенным уровнем экспрессии NF-IL6. Причем, экспрессия данного гена у Мф после трансфекции была достоверно ниже (рис. 2Б). Гиперэкспрессия miR-222 не влияла

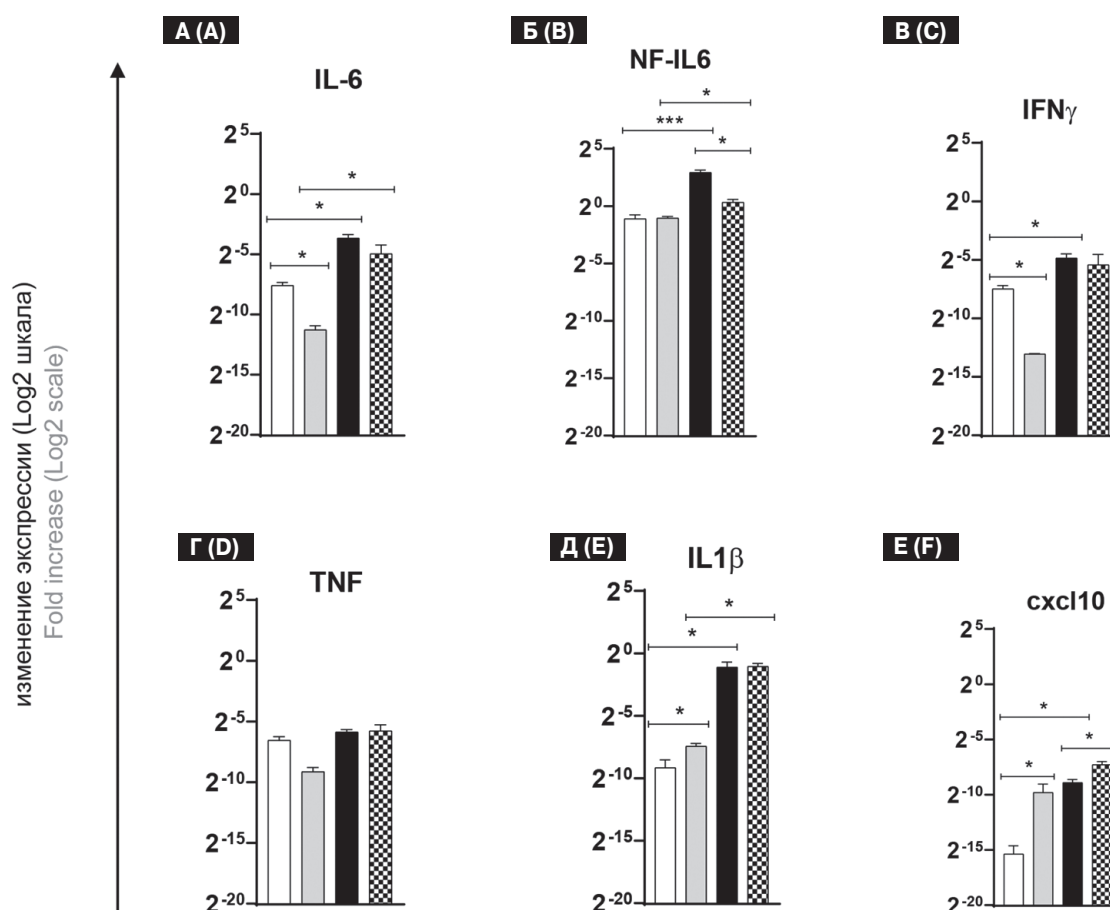


Рисунок 2. Усиление экспрессии miR-222 влияет на изменение профиля воспалительных реакций в Мф человека при экспериментальном ТБ

Figure 2. Increased miR-222 expression influences altered inflammatory response profile in human Mf in experimental TB

Примечание. Трансфицированные и «наивные» Мф культивировали в присутствии/в отсутствие микобактериальных антигенов. Через 24 часа в культурах Мф определяли уровень экспрессии генов цитокинов/хемокинов. □ — «наивные» Мф; ■ — Мф и *M. tuberculosis*; □ — трансфицированные miR-222 Мф; ▨ — трансфицированные miR-222 Мф и *M. tuberculosis*. Представлены средние значения \pm SEM (n — 3 повтора на группу); * — p < 0,05; *** — p < 0,001

Note. Transfected and naive MFs were cultured in the presence or absence of mycobacterial antigens. After 24 hours, the expression levels of cytokines/chemokines were determined in MF cultures. □ — naive MF; ■ — MF and *M. tuberculosis*; □ — miR-222 transfected MF; ▨ — miR-222 transfected MF and *M. tuberculosis*. Means \pm SEM are shown (n — 3 replicates per group); * — p < 0.05; *** — p < 0,001.

на экспрессию TNF в Мф как в присутствии, так и в отсутствии антигенов микобактерий (рис. 2Г).

Мишенью miR-222 является липидная фосфотаза PTEN [14], которая обладает ингибирующим действием в отношении PI3K/АКТ/NF-κB путей и, следовательно, способна регулировать активность транскрипционного фактора NF-κB. NF-κB в свою очередь имеет решающее значение для индукции и выработки ряда воспалительных факторов и цитокинов (таких как IL-1β, IL-6, TNF). Таким образом, гиперпродукция miR-222 будет приводить к ингибированию NF-κB и как следствие снижению экспрессии провоспалительных цитокинов, что согласуется с полученными нами результатами.

Одна из основных функций Мф при ТБ инфекции — элиминация микобактерий, поэтому на следующем этапе исследования было оценено влияние гиперэкспрессии miR-222 на бактериостатическую активность макрофагов. Для чего трансфицированные и «наивные» Мф культивировали совместно с вирулентным штаммом *M. tuberculosis* при соотношении микобактерия:Мф в культуре 5:1. Через 72 часа в данных культурах оценивали ограничение роста микобактерий по включению последними ³H-урацила, а также генерацию активных форм азота (NO^{*}) по продукции нитрит-аниона (рис. 3).

Было показано, что гиперэкспрессия miR-222 приводит к небольшому достоверному увеличению продукции активных форм азота инфицированными Мф, но не влияет на их бактериостатическую активность (рис. 3). Для miR-222 показано сильное понижение экспрессии при поляризации Мф в сторону M1 [5], что характерно на начальных этапах ТБ инфекции. Гиперэкспрессия данной miR, напротив, препятствует дифференцировке Мф и как следствие может влиять на активацию бактериостатической функции фагоцитов.

Заключение

В результате проведенных исследований нам удалось показать, что гиперэкспрессия miR-222 в культуре инфицированных Mtb макрофагов человека не ведет к существенному изменению продукции IFNγ, а также их бактериостатической активности. При этом, miR-222 оказывает стимулирующее воздействие на продукцию

Список литературы/References

1. Шепелькова Г.С., Майоров К.Б., Евстифеев В.В., Апт А.С. Взаимодействие Т-лимфоцитов CD4+CD27hi и CD4+CD27lo с макрофагами при туберкулезной инфекции у мышей // Туберкулез и болезни легких. 2015. № 12. С. 57–60. [Shepelkova G.S., Mayorov K.B., Evstifeev V.V., Apt A.S. Interaction of T-lymphocytes of CD4+CD27hi and CD4+CD27lo with macrophages in tuberculous infection in mice. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2015, no. 12, pp. 57–60. (In Russ.)]

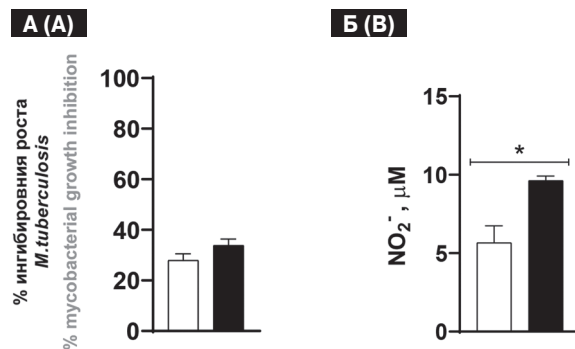


Рисунок 3. Влияние гиперэкспрессии miR-222 на бактериостатическую функцию Мф человека при экспериментальном ТБ

Figure 3. Effect of miR-222 overexpression on MF bacteriostatic function in experimental TB

Примечание. Трансфицированные и «наивные» Мф культивировали совместно с вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37RV (Мф:микобактерии = 1:5). Через 72 часа в культурах определяли ограничение роста Мф микобактерий по включению последними ³H-урацила и концентрацию (NO₂)⁻ (Б). □ — Мф без трансфекции; ■ — Мф, трансфицированные с использованием аналога miR-222. Представлены средние значения ±SEM (n — 3 повтора на группу); * — p < 0,05

Note. Transfected and “naive” MF were co-cultured with virulent *M. tuberculosis* H37RV (MF:mycobacteria = 1:5). Growth restriction of MF mycobacteria by ³H-uracil incorporation (A) and (NO₂)⁻ concentration (B) was determined after 72 h in culture. □ — MF without transfection; ■ — MF transfected using miR-222 analog. Means ±SEM are shown (n — 3 replicates per group); * — p < 0.05

оксида азота, IL-1β и sxc110 и понижает экспрессию IL-6 и IFNγ. Наши результаты согласуются с данными, полученными Chen Zonghai и соавт. [14], которые показали, что добавление ESAT6 в культуру клеток макрофагальной линии клеток ведет к снижению экспрессии miR-222-3p, и как следствие, подавляет выработку провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, IL-1β и TNF, способствуя экспрессии фосфатазы и тензина (PTEN), что в конечном итоге благоприятствует репликации *Mycobacterium smegmatis*. Наше исследование закладывает основу для интеграции miRs в клиническую практику для обогащения персонализированных и креативных диагностических стратегий, и дальнейшего принятия решений о лечении ТБ, особенно при лечении пациентов с лекарственной устойчивостью.

2. Divangahi M., Chen M., Gan H., Desjardins D., Hickman T.T., Lee D.M., Fortune S., Behar S.M., Remold H.G. Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat. Immunol.*, 2009, vol. 10, no. 8, pp. 899–906. doi: 10.1038/ni.1758
3. Flannagan R.S., Cosío G., Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, vol. 7, no. 5, pp. 355–366. doi: 10.1038/nrmicro2128
4. Gan H., Lee J., Ren F., Chen M., Kornfeld H., Remold H.G. Mycobacterium tuberculosis blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. *Nat. Immunol.*, 2008, vol. 9, no. 10, pp. 1189–1197. doi: 10.1038/ni.1654
5. Graff J.W., Dickson A.M., Clay G., McCaffrey A.P., Wilson M.E. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 26, pp. 21816–21825. doi: 10.1074/jbc.M111.327031
6. Hou J., Wang P., Lin L., Liu X., Ma F., An H. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J. Immunol.*, 2009, vol. 183, no. 3, pp. 2150–2158. doi: 10.4049/jimmunol.0900707
7. Lyadova I.V., Eruslanov E.B., Khaidukov S.V., Yeremeev V.V., Majorov K.B., Pichugin A.V., Nikonenko B.V., Kondratieva T.K., Apt A.S. Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyper-resistant to Mycobacterium tuberculosis-triggered disease. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, no. 10, pp. 5921–31. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5921
8. Naqvi A.R., Sarwat M. MicroRNAs and immunity. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 2022, vol. 124, pp. 1–2. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.10.007
9. Saeed S., Quintin J., Kerstens H.H., Rao N.A., Aghajanirofeh A., Matarese F., Cheng S.C., Ratter J., Berentsen K., van der Ent M.A., Sharifi N., Janssen-Megens E.M., Ter Huurne M., Mandoli A., van Schaik T., Ng A., Burden F., Downes K., Frontini M., Kumar V., Giamarellos-Bourboulis E.J., Ouwehand W.H., van der Meer J.W., Joosten L.A., Wijmenga C., Martens J.H., Xavier R.J., Logie C., Netea M.G., Stunnenberg H.G. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 2014, vol. 345, no. 6204: 1251086. doi: 10.1126/science.1251086
10. Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Berezovskiy Yu.S., Tarasov R.V., Bagirov M.A., Yeremeev V.V. Lung Inflammation Signature in Post-COVID-19 TB Patients. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, no. 22: 16315. doi: 10.3390/ijms242216315
11. Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Tarasov R.V., Ergeshova A.E., Bagirov M.A., Yeremeev V.V. MicroRNAs as Biomarkers of Active Pulmonary TB Course. *Microorganisms*, 2023, vol. 11, no. 3: 626. doi: 10.3390/microorganisms11030626
12. Simmons J.D., Stein C.M., Seshadri C., Campo M., Alter G., Fortune S., Schurr E., Wallis R.S., Churchyard G., Mayanja-Kizza H., Boom W.H., Hawn T.R. Immunological mechanisms of human resistance to persistent Mycobacterium tuberculosis infection. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, vol. 18, no. 9, pp. 575–589. doi: 10.1038/s41577-018-0025-3
13. Zheng Y. Suppression of mouse miRNA-222-3p in response to echinococcus multilocularis infection. *Int. Immunopharmacol.*, 2018, vol. 64, pp. 252–255. doi: 10.1016/j.intimp.2018.09.004
14. Zonghai C., Tao L., Pengjiao M., Liang G., Rongchuan Z., Xinyan W., Wenyi N., Wei L., Yi W., Lang B. Mycobacterium tuberculosis ESAT6 modulates host innate immunity by downregulating miR-222-3p target PTEN. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2022, vol. 1868, no. 1: 166292. doi: 10.1016/j.bbdis.2021.166292

Авторы:

Шепелькова Г.С., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Евстифеев В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия;

Еремеев В.В., д.м.н., главный научный сотрудник, зав. отделом иммунологии ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия.

Authors:

Shepelkova G.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Biotechnology, Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Evstifeev V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Biotechnology, Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation;

Yeremeev V.V., DSc (Medicine), Head Researcher, Head of the Department of Immunology, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 29.03.2024
Принята к печати 30.03.2024

Received 29.03.2024
Accepted 30.03.2024

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНЫЙ ТРЕКИНГ РЕПЕРТУАРА Т-КЛЕТОК ПОЗВОЛЯЕТ ДЕТЕКТИРОВАТЬ УСТОЙЧИВЫЙ CD4⁺ КЛАСТЕР КЛОНОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИХ К ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКЕ

М.А. Сальникова^{1,2}, Ю.Б. Лебедев²

¹ ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

Резюме. Адекватное функционирование адаптивной иммунной системы при острой вирусной инфекции невозможно представить без Т-клеток. Т-клетки не только элиминируют зараженные вирусом клетки и участвуют в формировании иммунологической памяти, а также косвенно модулируют гуморальный ответ через селекцию и поддержание специфических В-клеток. Т-клеточный рецептор (TCR) распознает процессированный антиген, представленный на поверхности клеток в МНС одного из двух классов. Таким образом, сформировавшийся репертуар TCR отражает историю встреченных антигенов через призму данного организма с конкретным набором МНС. Для исследования изменения репертуара TCR в ответ на острую вирусную инфекцию мы воспользовались моделью вакцинации от желтой лихорадки. Вакцина от желтой лихорадки уже больше полувека является эталоном как по безопасности, так и по эффективности. Основой вакцины является живой аттенуированный вирус, что позволяет исследовать иммунный ответ в условиях, максимально приближенных к заражению вирусом дикого типа. ЖЛ-специфический Т-клеточный ответ на иммунодоминантные пептиды, представляемые на HLA-A02 подробно изучен, однако данных от исследований иммунного ответа доноров, не несущих HLA-A02 аллель пока что мало. Целью данной работы стало рассмотрение динамики изменений структуры Т-клеточного репертуара, которые происходят в ответ на вакцинацию от ЖЛ у донора, не имеющего HLA-A02 аллель. В ходе работы мы обнаружили, что общая картина ответа сходна с таковой у доноров HLA-A02 положительных: вакцинация вызывает обширную экспансию ЖЛ-реактивных клонов на 14 день. Несмотря на отсутствие известного иммунодоминантного эпитопа для HLA аллелей первого класса данного донора, его ответ также был сдвинут в сторону CD8⁺ Т-клеток, и их доля возросла к 53 дню. Аминокислотные последовательности CDR3 TCRβ ЖЛ-реактивных клонов не образуют большого количества кластеров. Самый большой кластер образован CD4⁺ Т-клетками, что вместе с обширной экспансией ЖЛ-специфических клонов подтверждает наличие новых иммуногенных эпитопов.

Ключевые слова: Т-клеточный рецептор, специфичность, репертуар, желтая лихорадка, вакцинация, острая вирусная инфекция, рестрикция, клон, кластер, адаптивный иммунитет.

Адрес для переписки:

Сальникова Мария Алексеевна
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,
ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.
Тел.: 8 (916) 957-37-75.
E-mail: msalniku@yandex.ru

Contacts:

Mariia A. Salnikova
117997, Russian Federation, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10,
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS.
Phone: +7 (916) 957-37-75.
E-mail: msalniku@yandex.ru

Для цитирования:

Сальникова М.А., Лебедев Ю.Б. Продолжительный трекинг репертуара Т-клеток позволяет детектировать устойчивый CD4⁺ кластер клонов, специфических к желтой лихорадке // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 539–543. doi: 10.15789/2220-7619-LTO-16665

Citation:

Salnikova M.A., Lebedev Yu.B. Longitudinal tracking of T-cell repertoire reveals long-lasting CD4⁺ yellow fever specific clone cluster // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 539–543. doi: 10.15789/2220-7619-LTO-16665

© Сальникова М.А., Лебедев Ю.Б., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-LTO-16665>

LONGITUDINAL TRACKING OF T-CELL REPERTOIRE REVEALS LONG-LASTING CD4⁺ YELLOW FEVER SPECIFIC CLONE CLUSTER

Salnikova M.A.^{a,b}, Lebedev Yu.B.^b

^a Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^b Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russian Federation

Abstract. Infection is inconceivable without T cells. T cells not only eliminate virus-infected cells and participate in the formation of immunological memory, but also indirectly modulate the humoral response through the selection and maintenance of specific B cells. The T-cell receptor (TCR) recognizes processed antigen presented on the surface of cells in the MHC of one of two classes. Thus, the formed TCR repertoire reflects the history of encountered antigens through the prism of the specific organism with a particular set of MHC. To investigate changes in the TCR repertoire in response to acute viral infection, we utilized a yellow fever vaccination model. The yellow fever vaccine has been a benchmark for both safety and efficacy for over half a century. The vaccine is based on a live attenuated virus, allowing the study of the immune response under conditions closely to the viral infection. The yellow fever-specific T-cell response to immunodominant peptides presented on HLA-A02 is well studied, but experiments with HLA-A02-negative donors are still lacking. The aim of this study was to examine the dynamics of changes in the T-cell repertoire structure that occur in response to yellow fever vaccination in a donor without the HLA-A02 allele. We found that the overall T-cell response dynamics were similar to that in HLA-A02-positive donors: vaccination led to rapid expansion of yellow fever-reactive clones by day 14. Despite the absence of a known immunodominant epitope for HLA I alleles in this donor, the immune response also shifted towards CD8⁺ T cells, with increasing of the CD8⁺ clones fraction by day 53. The amino acid sequences of CDR3 TCRβ yellow fever specific clones formed a stable cluster by CD4⁺ T cells, further confirming the presence of novel immunogenic epitopes.

Key words: TCR, specific, repertoire, YF17D, vaccination, acute virus infection, HLA, MHC, restriction, clone, cluster, adaptive immunity.

Введение

Проблема острых вирусных инфекций продолжает быть актуальной [2]. Основная сложность изучения иммунного ответа человека на острые вирусные инфекции это отсутствие возможности постановки контролируемого эксперимента. Наиболее удачной моделью острой вирусной инфекции является вакцинация от желтой лихорадки (ЖЛ). Изобретатель вакцины, Макс Тейлер, получил Нобелевскую премию в 1951 г. «За открытия, связанные с желтой лихорадкой, и борьбу с ней» [6]. В основе вакцины аттенуированный вирус, который как и дикий тип вируса вызывает вирусемию, позволяя изучать иммунный ответ в условиях максимально близких к вирусной инфекции.

Т-клетки играют важную роль в противовирусной защите, участвуя во множестве процессов от элиминации вирусных частиц до формирования иммунологической памяти. Специфическое распознавание антигена Т-клетками происходит в ходе взаимодействия Т-клеточного рецептора (TCR) с процессированным антигеном, встроенным в главный комплекс гистосовместимости (МНС). Участок, принимающий наибольшее участие во взаимодействии с антигеном (CDR3) находится на TCRβ цепи и отличается крайней вариабельностью, формирующейся в процессе V(D)J рекомбинации. Применение технологий секвенирования нового поколения совместно с стратегиями пробоподготовки позволяет

преодолевать основную сложность исследования репертуара — огромное разнообразие последовательностей TCR [5]. Все вместе создает необходимую базу для изучения изменений Т-клеточного репертуара в ответ на вакцинацию от желтой лихорадки.

Динамика Т-клеточного ответа на первичную вакцинацию от желтой лихорадки характеризуется выраженной экспансией как CD8⁺, так и CD4⁺ Т-клеток на 14 день после вакцинации [11]. Репертуар ЖЛ-специфических Т-клеток подробно изучен для доноров, обладающих аллелем HLA-A02 [7], самым распространенным аллелем среди европейских доноров [8]. Найдена аминокислотная последовательность TCRβ CDR3 региона, распознающего иммуногенный эпитоп NS4В вирусного белка, представленного на HLA-A02, а также исследован ответ на вторичную вакцинацию [4]. Несмотря на это, данных о ЖЛ-специфическом Т-клеточном ответе доноров, не несущих аллель HLA-A02, намного меньше. При этом естественные резервуары желтой лихорадки географически не пересекаются с регионами широкого распространения HLA-A02 аллеля [3], поэтому исследование ЖЛ-специфических Т-клеток доноров, не несущих аллель HLA-A02 имеет особую клиническую значимость.

В данной работе мы подробно рассматриваем специфический Т-клеточный ответ на вакцинацию от желтой лихорадки у донора, не обладающего аллелем HLA-A02.

Материалы и методы

Образцы крови. Вакцинацию проводили живой аттенуированной вакциной YF17D, забор крови проводился в сертифицированной диагностической лаборатории. Мононуклеарные клетки периферической крови были выделены с помощью стандартного протокола центрифугирования в градиенте плотности (фиколл, 1,077 г/см³, ПанЭко, Россия) из 8 мл крови для каждой повторности. Выделение субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ осуществляли с использованием магнитной сепарации и позитивной селекции Dynabeads (Invitrogen, США) из 4 мл крови в каждой временной точке. РНК выделяли стандартным протоколом для Trizol реагента.

HLA-типирование. Стартовый материал для HLA-типирования брали из аликвоты РНК выделенной из мононуклеарных клеток периферической крови. Синтез кДНК библиотеки происходил с использованием праймеров на участки высокой консервативности HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB, HLA-DRB локусов. Полученную библиотеку секвенировали на платформе Illumina MiSeq в режиме 2 × 250 пн, полученные данные обрабатывались в среде R с помощью автоматизированного алгоритма.

Приготовление библиотек TCRβ, секвенирование. Библиотеки TCRβ подготавливались по ранее разработанному протоколу [7] с незначительными доработками. Основной особенностью нашей пробоподготовки является внедрение уникальных молекулярных баркодов с использованием эффекта смены матрицы ревертазой на 5'-конце, что позволяет подсчитать количество молекул мРНК на старте и исправить ошибки ПЦР при последующей обработке. Библиотеки были секвенированы на платформе Illumina NovaSeq в режиме 2 × 150 пн.

Обработка полученных данных. Сырые данные секвенирования были обработаны с помощью специального программного обеспечения MIGEC [10] и MiXCR [1], которое позволяет скорректировать ошибки секвенирования, подсчитать количество уникальных молекул мРНК, а также провести выравнивание V, D и J сегментов. Для дальнейшего анализа полученных таблиц клонсетов были использованы пакеты tidyverse, data.table в среде программирования R studio. Для построения графиков использовался пакет ggplot2.

Результаты и обсуждение

На первом этапе мы провели генотипирование донора и обнаружили у него следующие HLA-аллели: A*24:02:01; A*30:01:01; B*13:02:01; B*35:02:01; C*04:01:01; C*06:02:01; DQB1*02:02:01; DQB1*03:01:01; DRB1*07:01:01; DRB1*11:04:01.

Эксперимент проводили согласно следующей схеме: на день 0, до вакцинации, у донора забиралась кровь с последующим выделением РВМС и разделением на фракции CD4⁺ и CD8⁺, в этот же день проходила вакцинация донора YF17D. Далее у донора снова забиралась кровь с аналогичными шагами пробоподготовки на 15, 25, 34 и 53 день после вакцинации. На основе всех полученных образцов готовились библиотеки кДНК для дальнейшего секвенирования и реконструкции репертуаров TCR. Для того, чтобы обнаружить Т-клеточные клоны, отвечающие на вакцинацию YF17D, мы воспользовались пакетом для анализа дифференциальной экспрессии генов *edgeR* [9]. Мы смогли детектировать 584 клонов значимо увеличивших свою концентрацию на 15 день после вакцинации. Такие клоны занимают 3,9% от всего репертуара на 15 день (рис. 1). Что согласуется с ранее опубликованными данными, описывающими Т-клеточный ответ на первичную вакцинацию YF17D как быстро развивающийся с сильной клональной экспансией [11]. Для того, чтобы проследить за динамикой Т-клеточного ответа на вакцинацию от вируса желтой лихорадки мы рассмотрели изменение доли YF-специфических клонов от всего репертуара на 15, 25, 34 и 53 день (рис. 1). Ко дню 25 доля отвечающих клонов снизилась и продолжала плавно снижаться до дня 53.

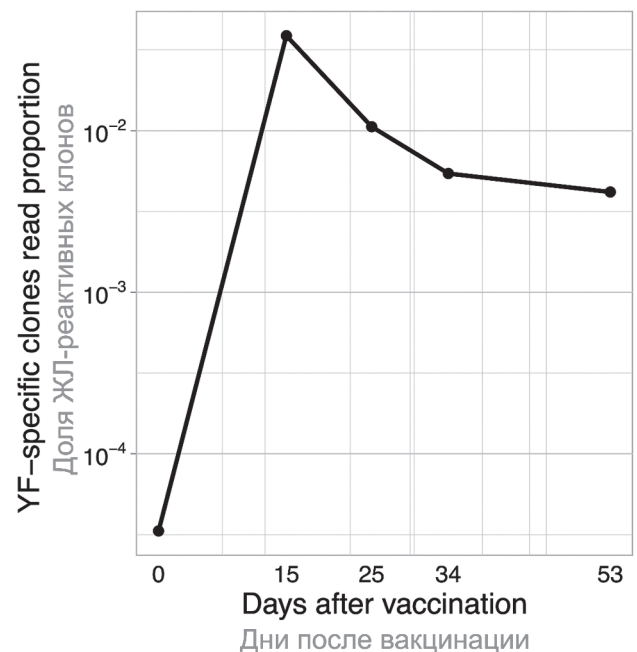


Рисунок 1. Динамика Т-клеточного ответа на вакцинацию YF17D. Доля ЖЛ-специфических TCRβ клонов от всего репертуара в различных точках до и после вакцинации

Figure 1. Dynamics of the T cell response towards YF17D vaccination. Fraction of the YF-specific TCRβ from the whole repertoire in different timepoints

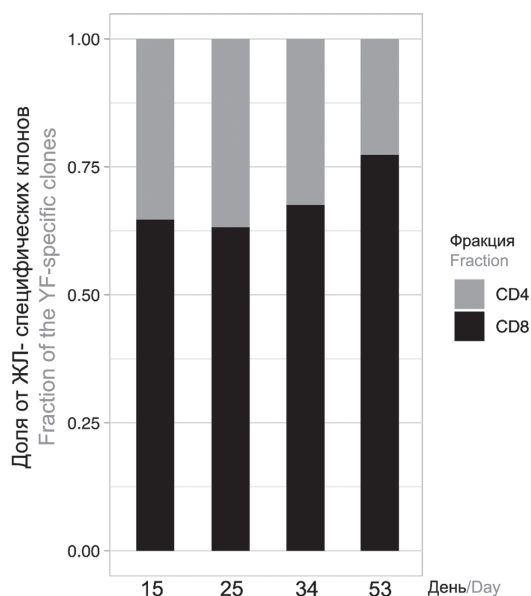


Рисунок 2. Фенотипический состав ЖЛ-специфических клонов. Доля CD8⁺ и CD4⁺ популяций среди всех ответивших клонов в различных точках после вакцинации

Figure 2. Phenotypes of the YF-specific clones. Fraction of the CD8⁺ and CD4⁺ populations from all expanded clones in different timepoints

Проанализировав вклад клеток с разным фенотипом в Т-клеточный ответ на вакцинацию, оказалось, что ответ сдвинут в сторону CD8⁺ Т клеток (рис. 2), как и для HLA-A02 положительных доноров. При этом доля CD8⁺ Т-клеток возросла к 53 дню, что может свидетельствовать об продолжительном участии в элиминации зараженных клеток и временном сдвиге CD8⁺ ответа. Несмотря на отсутствие известного иммуногенного эпитопа для данного набора HLA I класса, мы оценили схожесть аминокислотных последовательностей CDR3 TCRβ отвечающих клонов с помощью граф анализа (рис. 3). ЖЛ-специфические клоны данного донора образуют меньше кластеров, чем клоны HLA-A02 положительных доноров [7], при этом большинство кластеров образовано CD4⁺ Т-клетками. Клоны из самого большого CD4⁺ кластера сохранялись до 53 дня после вакцинации, что может указывать на наличие иммуногенного вирусного эпитопа, представленного на HLA II класса.

Список литературы/References

1. Bolotin D.A., Poslavsky S., Mitrophanov I., Shugay M., Mamedov I.Z., Putintseva E.V., Chudakov D.M. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods*, 2015, vol. 12, no. 5, pp. 380–381. doi: 10.1038/nmeth.3364
2. Chams N., Chams S., Badran R., Shams A., Araji A., Raad M., Mukhopadhyay S., Stroberg E., Duval E.J., Barton L.M., Hajj Hussein I. COVID-19: a multidisciplinary review. *Front. Public Health*, 2020, vol. 8: 383. doi: 10.3389/fpubh.2020.00383
3. Gonzalez-Galarza F.F., McCabe A., Santos E.J.M.D., Jones J., Takeshita L., Ortega-Rivera N.D., Cid-Pavon G.M.D., Ramsbottom K., Ghattaoraya G., Alfirevic A., Middleton D., Jones A.R. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Res.*, 2019, vol. 48, no. D1, pp. D783–D788. doi: 10.1093/nar/gkz1029

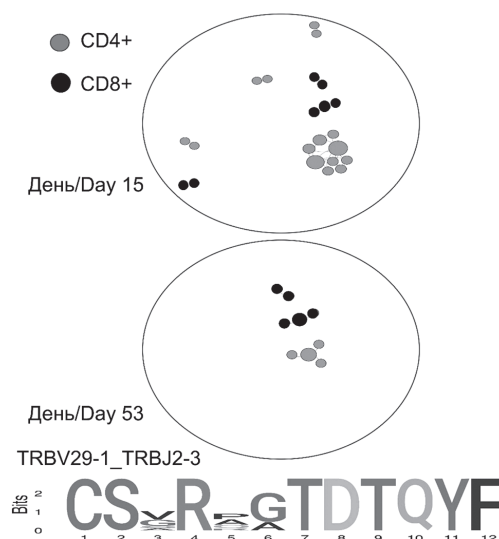


Рисунок 3. Графы для ЖЛ-специфических клонов. Каждая точка на графе обозначает отдельный клонотип. Черным цветом обозначены CD8⁺ клоны, серым CD4⁺. Приведен консенсусный мотив для самого большого кластера

Figure 3. Graphs of the YF-specific clones. Each dot represents a clonotype. Black colour represents CD8⁺ clones, grey CD4⁺. The consensus motif of the largest cluster is shown

Заключение

В данной работе мы подробно рассмотрели динамику и клональный состав Т-клеточного ответа на вакцинацию от желтой лихорадки донора с нераспространенным HLA генотипом. Общая динамика ответа была схожей с опубликованными данными, на 15 день после вакцинации мы смогли детектировать 584 ЖЛ-специфических клона, которые составляли 3,9% от всего репертуара TCRβ. Интересно, что несмотря на отсутствие известного иммуногенного эпитопа для HLA I класса у данного донора, среди отвечающих клонов преобладали CD8⁺ Т-клетки, увеличившие свою долю к 53 дню. Однако, аминокислотные кластеры CDR3 были образованы в большей части CD4⁺ Т-клетками, самый большой кластер был нами охарактеризован и сохранялся до 53 дня. Таким образом, были показаны важные отличия в Т-клеточном ответе, связанные с набором HLA аллелей.

4. Minervina A.A., Pogorelyy M.V., Komech E.A., Karnaukhov V.K., Bacher P., Rosati E., Franke A., Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B., Mora T., Walczak A.M. Primary and secondary anti-viral response captured by the dynamics and phenotype of individual T cell clones. *eLife*, 2020, vol. 9: e53704. doi: 10.7554/eLife.53704
5. Minervina A., Pogorelyy M., Mamedov I. T-cell receptor and B-cell receptor repertoire profiling in adaptive immunity. *Transpl. Int.*, 2019, vol. 32, no. 11, pp. 1111–1123. doi: 10.1111/tri.13475
6. Norrby E. Yellow fever and Max Theiler: the only Nobel Prize for a virus vaccine. *J. Exp. Med.*, 2007, vol. 204, no. 12, pp. 2779–2784. doi: 10.1084/jem.20072290
7. Pogorelyy M.V., Minervina A.A., Touzel M.P., Sycheva A.L., Komech E.A., Kovalenko E.I., Karganova G.G., Egorov E.S., Komkov A. Yu., Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Mora T., Walczak A.M., & Lebedev Y.B. Precise tracking of vaccine-responding T cell clones reveals convergent and personalized response in identical twins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2018, vol. 115, no. 50, pp. 12704–12709. doi: 10.1073/pnas.1809642115
8. Robinson J., Halliwell J.A., McWilliam H., Lopez R., Parham P., Marsh S.G.E. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 41, no. D1, pp. D1222–D1227. doi: 10.1093/nar/gks949
9. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 2010, vol. 26, no. 1, pp. 139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
10. Shugay M., Britanova O.V., Merzlyak E.M., Turchaninova M.A., Mamedov I.Z., Tuganbaev T.R., Bolotin D.A., Staroverov D.B., Putintseva E.V., Plevova K., Linnemann C., Shagin D., Pospisilova S., Lukyanov S., Schumacher T.N., Chudakov D.M. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat. Methods*, 2014, vol. 11, no. 6, pp. 653–655. doi: 10.1038/nmeth.2960
11. Wieten R.W., Jonker E.F.F., Van Leeuwen E.M.M., Remmerswaal E.B.M., Ten Berge I.J.M., De Visser A.W., Van Genderen P.J.J., Goorhuis A., Visser L.G., Grobusch M.P., De Bree G.J. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 3: e0149871. doi: 10.1371/journal.pone.0149871

Авторы:

Сальникова М.А., аспирант кафедры иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия; инженер-исследователь ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия;

Лебедев Ю.Б., д.б.н., профессор, зав. лабораторией сравнительной и функциональной геномики ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия.

Authors:

Salnikova M.A., Postgraduate Student, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation; Engineer-Researcher Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russian Federation; **Lebedev Yu.B.**, DSc (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Comparative and Functional Genomics, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 27.03.2024
Принята к печати 30.03.2024

Received 27.03.2024
Accepted 30.03.2024

СОСТОЯНИЕ БИОЦЕНОЗА ВЛАГАЛИЩА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

К.С. Федорова¹, К.А. Абрамовских², А.Ю. Савочкина¹, А.А. Минасова¹, М.А. Зотова¹,
А.И. Саматова¹, Д.Ю. Нохрин³, К.В. Никушкина¹

¹ НИИ иммунологии ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства
Здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск, Россия

² ГБУЗ Областной перинатальный центр, г. Челябинск, Россия

³ ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия

Резюме. Согласно литературным данным, бактериальный вагиноз является одной из наиболее распространенных проблем, связанных с репродуктивным здоровьем женщин. Ведущее место в биоценозе влагалища занимают *Lactobacillus* spp., которые обеспечивают местную антимикробную защиту, но не все виды в равной степени способны защищать экосистему влагалища от патогенных микроорганизмов. Доступные в практическом здравоохранении методы диагностики не позволяют провести видовую идентификацию *Lactobacillus* spp., что ограничивает возможность в полной мере оценить состояние биоценоза влагалища. В связи с этим, нами было проведено исследование, в котором были сопоставлены данные микроскопии обзорного мазка с идентификацией лактобактерий и сопутствующих микроорганизмов. Целью исследования являлась оценка видового состава *Lactobacillus* spp. влагалища в зависимости от морфологических характеристик и состава сопутствующей флоры. В исследовании была проведена оценка биоценоза влагалища у 64 условно-здоровых женщин репродуктивного возраста от 18 до 35 лет. Критерием исключения было наличие ИППП. Состояние биоценоза влагалища оценивали с помощью методов микроскопии и ПЦР в режиме реального времени. Также с помощью ПЦР в режиме реального времени нами была проведена идентификация видов *Lactobacillus* spp. Полученные результаты были обработаны общепринятыми методами описательной и ординационной статистики с использованием пакета прикладных программ «Past v 3.25». В ходе нашего исследования было установлено, что доминирующими видами *Lactobacillus* spp. в биоценозе влагалища являются *L. crispatus*, *L. vaginalis*, *L. iners* и *L. jensenii*, наиболее редко выявлялся вид *L. johnsonii*, *L. acidophilus* не были обнаружены. Результаты типирования показали, что влагалище чаще колонизировано несколькими видами лактобактерий, тогда как один вид *Lactobacillus* spp. идентифицировался реже. Была выявлена корреляция между видом лактобактерий и толщиной палочек. Если при микроскопии обзорного гинекологического мазка обнаружены толстые палочки, то, вероятно, они принадлежат к виду *L. crispatus*, которые обладают высокой колонизационной резистентностью и являются фактором стабильности биоценоза влагалища. Если при микроскопии мазка обнаружены тонкие палочки, то это, предположительно, виды *L. iners* и *L. jensenii*. Данные представители *Lactobacillus* spp. напрямую не связаны с дисбиотическим состоянием влагалища, но могут свидетельствовать о возможном развитии дисбиоза в будущем.

Ключевые слова: биоценоз влагалища, дисбиоз влагалища, бактериальный вагиноз, морфология лактобактерий, *Lactobacillus* spp., репродуктивное здоровье.

Адрес для переписки:

Минасова Анна Александровна
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64,
ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский
университет МЗ РФ.
Тел.: 8 (909) 068-45-28. E-mail: pandora_anna@mail.ru

Contacts:

Anna A. Minasova
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovskiy str., 64,
South Ural State Medical University.
Phone: +7 (909) 068-45-28. E-mail: pandora_anna@mail.ru

Для цитирования:

Федорова К.С., Абрамовских К.А., Савочкина А.Ю., Минасова А.А.,
Зотова М.А., Саматова А.И., Нохрин Д.Ю., Никушкина К.В. Состояние
биоценоза влагалища в зависимости от видового разнообразия
лактобактерий // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 544–550.
doi: 10.15789/2220-7619-TSO-16754

Citation:

Fedorova K.S., Abramovskikh K.A., Savochkina A.Yu., Minasova A.A.,
Zotova M.A., Samatova A.I., Nokhrin D.Yu., Nikushkina K.V. state of the vaginal
biocenosis depending on the species diversity of lactobacilli // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14,
no. 3, pp. 544–550. doi: 10.15789/2220-7619-TSO-16754

STATE OF THE VAGINAL BIOCECENOSIS DEPENDING ON THE SPECIES DIVERSITY OF LACTOBACILLI**Fedorova K.S.^a, Abramovskikh K.A.^b, Savochkina A.Yu.^a, Minasova A.A.^a, Zotova M.A.^a, Samatova A.I.^a, Nokhrin D.Yu.^c, Nikushkina K.V.^a**^a *Research Institute of Immunology South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation*^b *Regional Perinatal Center, Chelyabinsk, Russian Federation*^c *Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation*

Abstract. Bacterial vaginosis is one of the most common reproductive health problems in women. *Lactobacillus* spp. play a leading role in the vaginal biocenosis and provide local antimicrobial defense, but not all species are equally capable of protecting the vaginal ecosystem from pathogens. Diagnostic methods in practical healthcare do not allow identification of *Lactobacillus* spp. species, which limits the ability to comprehensively assess the status of the vaginal biocenosis. We conducted a study in which we compared microscopy data of the examined smear with the detection of *Lactobacillus* spp. and other microorganisms. The aim of the study was to evaluate the species composition of *Lactobacillus* spp. from the vagina depending on morphologic characteristics and composition of associated flora. The study included 64 conditionally healthy women of reproductive age from 18 to 35 years old. The study of species composition of the vaginal biocenosis and typing of lactobacilli was carried out by real-time PCR methods. The obtained results were processed using generally accepted methods of descriptive and ordinal statistics. During the study, it was found that the vaginal biocenosis was dominated by species of *Lactobacillus* spp. *L. crispatus*, *L. vaginalis*, *L. iners* and *L. jensenii*. *L. johnsonii* was rarely found, and *L. acidophilus* was not detected. Typing results showed that the vagina was more frequently colonized by more than one species of *Lactobacillus* spp. while a single species of *Lactobacillus* spp. was detected less frequently. A correlation was found between *Lactobacillus* spp. species and bacilli thickness. If thick bacilli are detected in gynecological smear microscopy, they belong to the species *L. crispatus*, which has high colonization resistance and is a factor in the stability of the vaginal biocenosis. If smear microscopy reveals thin bacilli, then these are species of *L. iners* and *L. jensenii*. These representatives of *Lactobacillus* spp. are not directly related to the dysbiotic state of the vagina, but may indicate the possible development of dysbiosis in the future.

Key words: vaginal biocenosis, vaginal dysbiosis, bacterial vaginosis, morphology of lactobacilli, *Lactobacillus* spp., reproductive health.

Введение

Репродуктивное здоровье женщины напрямую зависит от сбалансированного взаимодействия факторов местного иммунитета и микробиоты [9]. Половые пути женщины населяют различные микроорганизмы, но ведущее место в биоценозе влагалища занимают *Lactobacillus* spp., которые составляют 95% от всего микробного сообщества и являются основными симбионтами этой экологической ниши [2]. За более чем вековую исследовательскую историю было установлено, что именно лактобактерии обеспечивают антимикробную защиту влагалища как входных ворот для ряда инфекционных агентов, вызывающих как местные, так и системные заболевания. Защита репродуктивных путей, как анатомической ниши, связана со способностью лактобактерий формировать антиколониционный барьер. Реализация протективных функций основывается на синтезе молочной, уксусной и пироглутаминовой кислот, которые снижают pH влагалищного секрета до 3,7–4,5, создавая неблагоприятные условия для роста патогенной микрофлоры [5].

Снижение количества лактобактерий приводит к развитию бактериального вагиноза, который является одной из наиболее распространенных проблем, связанных с репродуктив-

ным здоровьем женщин [1]. Дисбиоз влагалища влияет на иммунный гомеостаз, что влечет за собой нарушение целостности эпителиального барьера и способствует проникновению патогенных микроорганизмов. Поэтому изучение лактобактерий, как ключевых представителей нормальной микробиоты влагалища, является актуальным для сохранения репродуктивного потенциала женщин.

Репродуктивные пути женщин населяют несколько видов *Lactobacillus* spp., но не все штаммы могут в равной степени защищать экосистему влагалища от патогенных микроорганизмов [2]. Согласно литературным данным, основными идентифицируемыми видами *Lactobacillus* spp. являются *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii*. Также встречаются *L. johnsonii*, *L. acidophilus* и *L. vaginalis* [14]. При этом *L. crispatus* обладает высокой колонизационной резистентностью, обеспечивает стабильность биоценоза влагалища и связан с низкой частотой встречаемости дисбиотических состояний, а преобладание таких видов, как *L. iners* и *L. gasseri* напротив связывают с появлением дисбиоза влагалища [8].

В практическом здравоохранении возможности выявления лактобактерий ограничены бактериологическим исследованием. Микроскопия гинекологического мазка позволяет оценить общую картину состояния биоценоза влагалища [6].

С помощью бактериологического метода можно выделить патогенные микроорганизмы и идентифицировать их штамм. Но данный способ исследования длителен, не подходит для трудно культивируемых микроорганизмов и для идентификации *Lactobacillus* spp. Таким образом, культуральный метод позволяет выявить лишь малую часть микроорганизмов, входящих в биоценоз влагалища [6].

В рамках ежегодного планового медосмотра для женщин предусмотрено посещение врача гинеколога, которое подразумевает взятие обзорного гинекологического мазка. Гинекологический мазок является хорошим инструментом для скрининга состояния биоценоза влагалища, но микроскопия не позволяет определить видовую принадлежность обнаруживаемых лактобактерий.

Таким образом, перечисленные методы не позволяют провести видовую идентификацию *Lactobacillus* spp., что ограничивает возможность комплексного подхода в оценке состояния биоценоза влагалища. В связи с этим нами было проведено исследование, где сопоставлены данные микроскопии обзорного мазка с идентифицированными лактобактериями и сопутствующими микроорганизмами.

Целью исследования являлась оценка видового состава *Lactobacillus* spp. влагалища в зависимости от морфологических характеристик и состава сопутствующей флоры.

Перед нами были поставлены следующие задачи:

1. Провести микроскопическое исследование обзорных гинекологических мазков с дополнительным описанием морфологии *Lactobacillus* spp.

2. Определить видовой состав влагалища методом ПЦР в режиме реального времени с использованием тест-системы «Фемофлор-16» (ДНК-Технология) и провести идентификацию типов *Lactobacillus* spp. использованием теста Типирование Лактобактерий (ДНК-Технология).

3. Проанализировать зависимость видовой принадлежности *Lactobacillus* spp. с морфологическими вариантами палочек, полученными в ходе микроскопии, и состоянием биоценоза влагалища.

Материалы и методы

В исследовании была проведена оценка биоценоза влагалища у 64 условно-здоровых женщин репродуктивного возраста от 18 до 35 лет (средний возраст $25,89 \pm 0,58$). В выборку вошли женщины, не принимающие оральные гормональные контрацептивы, у которых отсутствовали воспалительные заболевания урогенитального тракта и которые не являлись бере-

менными на момент проведения исследования. Забор биологического материала осуществлялся с 8 по 16 день менструального цикла. Выбор данного периода обусловлен рекомендациями по забору биоматериала в инструкциях производителя тест-систем.

Наличие инфекций, передающихся половым путем, являлось фактором исключения. Данные инфекции выявляли методом ПЦР в режиме реального времени с помощью набора «TNC Комплекс» (ДНК-Технология), который позволяет выявить наиболее распространенных безусловных патогенов *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*. Также критерием исключения являлось наличие *Mycoplasma genitalium*, которая входит в состав теста «Фемофлор-16». В результате обследования на наличие ИППП 4 женщины были исключены из исследования.

Оценка состояния биоценоза влагалища проводилась с помощью микроскопического исследования обзорных гинекологических мазков с подробным описанием морфологии *Lactobacillus* spp. Мазки окрашивали метиленовым синим.

В ходе микроскопии оценивались стандартные показатели обзорного гинекологического мазка и проводилось дополнительное описание морфологии обнаруженных в мазке палочек: оценивался размер палочек (мелкие, маленькие, средние, длинные, очень длинные), толщина (очень тонкие, тонкие, средней толщины, толстые, очень толстые), форма (прямые, изогнутые).

Для исследования биоценоза урогенитального тракта у женщин методом ПЦР в режиме реального времени использовался набор реагентов «Фемофлор-16» (ДНК-Технология), который предназначен для выявления ДНК условно-патогенных микроорганизмов, ДНК *Lactobacillus* spp. и геномной ДНК человека. Программа автоматически формирует лабораторное заключение исходя из количества лактобактерий и сопутствующих микроорганизмов. Возможны следующие варианты лабораторных заключений: абсолютный нормоценоз, условный нормоценоз, умеренный анаэробный дисбиоз, умеренный аэробный дисбиоз, умеренный анаэробно-аэробный дисбиоз, выраженный анаэробный дисбиоз, выраженный аэробный дисбиоз, выраженный анаэробно-аэробный дисбиоз.

Идентификация типов *Lactobacillus* spp. проводилась с помощью ПЦР в режиме реального времени на наборах «Типирование лактобактерий» (ДНК-Технология). Набор позволяет идентифицировать следующие виды *Lactobacillus* spp.: *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*. Выбор данных

штаммов лактобактерий обусловлен наибольшей частотой встречаемости этих видов во влагалище здоровых женщин.

Полученные результаты были обработаны методами описательной и ординационной статистики с использованием пакета прикладных программ «Past v 3.25» с помощью следующих критериев: для поиска статистически значимых связей был применен корреляционный анализ Спирмена и канонический анализ соответствий.

Результаты

По результатам исследования биоценоза урогенитального тракта у женщин с использованием «Фемофлор-16» абсолютный нормоценоз выявлялся у 29 женщин, условный нормоценоз у 21, умеренный анаэробный дисбиоз у 7 женщин, умеренный аэробный дисбиоз и выраженный анаэробный дисбиоз выявились у 2 и у 5 женщин соответственно. При этом такие варианты состояния биоценоза влагалища, как умеренный анаэробно-аэробный дисбиоз, выраженный аэробный дисбиоз и выраженный анаэробно-аэробный дисбиоз не были обнаружены в исследуемой выборке (рис. 1).

Следующим этапом нашей работы было типирование лактобактерий (рис. 2). В результате были идентифицированы следующие виды *Lactobacillus* spp.: *L. crispatus* у 46 женщин, *L. vaginalis* встречался у 37 обследуемых лиц, *L. iners* и *L. jensenii* выявлялись примерно с одинаковой частотой (36 и 35 женщин соответственно), *L. gasseri* был идентифицирован у 16 женщин. Наиболее редко встречался вид *L. johnsonii* (2 женщины). *L. acidophilus* в исследуемой выборке женщин не встречался.

У 16 женщин в исследуемой выборке при типировании лактобактерий был обнаружен

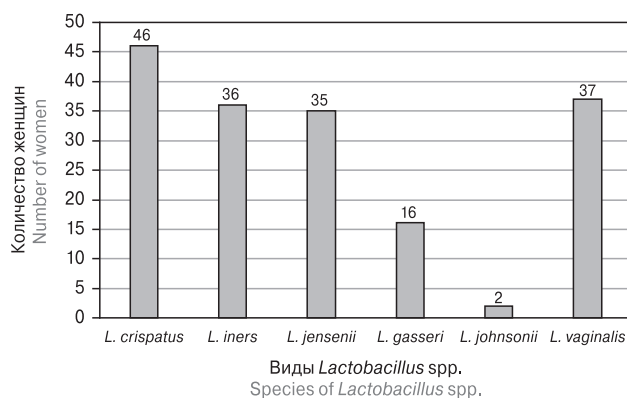


Рисунок 2. Частота встречаемости видов *Lactobacillus* spp.

Figure 2. Frequency of occurrence of *Lactobacillus* spp. types

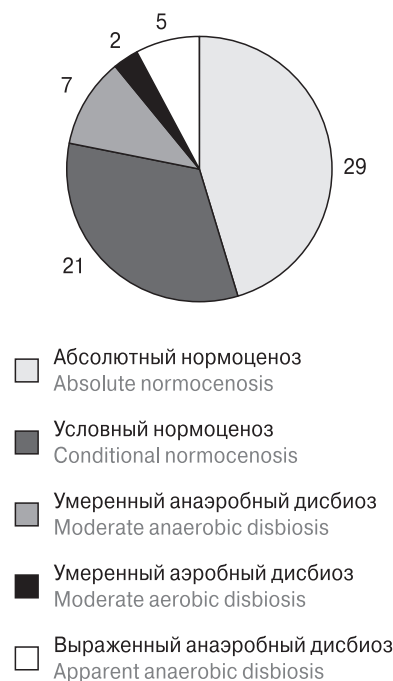


Рисунок 1. Распределение обследованных женщин, согласно лабораторному заключению «Фемофлор-16»

Figure 1. Distribution of examined women, according to the laboratory report “Femoflor-16”

только один вид *Lactobacillus* spp.: *L. crispatus* был обнаружен у 7 женщин, *L. iners* — у 6 женщин, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. vaginalis* как моновид встретились один раз. По два вида *Lactobacillus* spp. было идентифицировано у 10 женщин в исследуемой выборке: *L. crispatus* и *L. jensenii* — у 3 женщин, *L. crispatus* и *L. vaginalis* — у 2 женщин. Наиболее редкими парами лактобактерий являются: *L. crispatus* и *L. gasseri*, *L. crispatus* и *L. iners*, *L. iners* и *L. gasseri*, *L. iners* и *L. vaginalis*, *L. vaginalis* и *L. jensenii*. Три вида *Lactobacillus* spp. встречались у 14 женщин. Четыре вида *Lactobacillus*

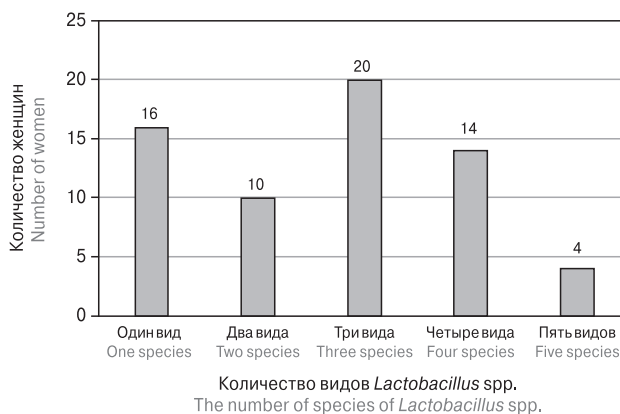


Рисунок 3. Распределение количества видов *Lactobacillus* spp.

Figure 3. Distribution of the number of *Lactobacillus* spp. types

spp. встречались у 14 женщин. Самое распространенное сочетание видов лактобактерий *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. vaginalis* встретилось у 11 женщин. Пять видов *Lactobacillus* spp. встречались у 4 женщин в единственной комбинации: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. vaginalis* (рис. 3).

Канонический анализ соответствий, проведенный среди идентифицированных лактобактерий и основных морфологических параметров (размер, толщина, форма), полученных при микроскопии обзорных гинекологических мазков, показал общие тенденции: *L. crispatus* является толстой палочкой, *L. gasseri* и *L. vaginalis* занимают промежуточное положение по толщине, *L. iners* и *L. jensenii* являются тонкими палочками; *L. jensenii* и *L. vaginalis* по форме представляют собой прямые палочки.

Для подтверждения установленных связей был проведен корреляционный анализ Спирмена, который показал следующие результаты: была обнаружена положительная корреляция между *L. crispatus* и толщиной палочек, тенденция к отрицательной корреляции между *L. jensenii* и толщиной палочек, тенденция к отрицательной корреляции между *L. iners* и толщиной палочек, тенденция к отрицательной корреляции между *L. jensenii* и формой палочек, тенденция к отрицательной корреляции между *L. vaginalis* и формой палочек. Иными словами, вероятно, толстые палочки, обнаруживаемые в обзорных гинекологических мазках, относятся к виду *L. crispatus* (рис. 4), а тонкие — к видам *L. iners* и *L. jensenii* (рис. 5). При обнаружении

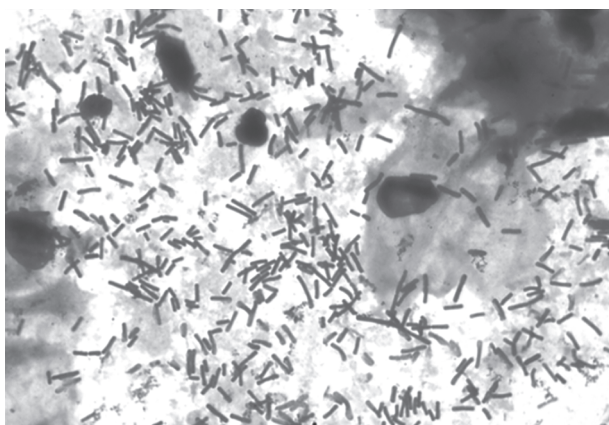


Рисунок 4. Фотография обзорного гинекологического мазка, окраска метиленовым синим, увеличение ×100

Figure 4. Photograph of an overview gynecological smear, stained with methylene blue, magnification ×100

Примечание. Толстые палочки, которые при типировании были идентифицированы как *L. crispatus*.

Note. Thick bacilli that were identified as *L. crispatus* during typing.

в мазке прямых палочек, предположительно, мы имеем дело с *L. jensenii* и *L. vaginalis*.

Также была обнаружена тенденция к положительной корреляции между *L. gasseri* и заключением «Фемофлор-16», *L. jensenii* и заключением «Фемофлор-16». Это может свидетельствовать о смещении состояния биоценоза влагалища от абсолютного нормоценоза.

Обсуждение

В ходе нашего исследования было установлено, что доминирующими видами *Lactobacillus* spp. в биоценозе влагалища являются *L. crispatus*, *L. vaginalis*, *L. iners* и *L. jensenii*, что частично согласуется с литературными данными. В нашем исследовании чаще остальных видов лактобактерий обнаруживался *L. crispatus*, что соответствует результатам других исследований. Стоит отметить, что *L. vaginalis* немного уступал по частоте встречаемости лидирующему виду, хотя в других исследованиях этот представитель *Lactobacillus* spp. встречался значительно реже [3, 10, 11].

Самым редким среди исследуемых видов являлся *L. johnsonii*, что соответствует литературным данным для условно-здоровых женщин.

В исследуемой выборке не был обнаружен вид *L. acidophilus*, что различается с результатами других исследований, где он выявлялся с высокой частотой среди женщин репродуктивного возраста [12]. Однако, есть данные, что лактобактерии вида *L. acidophilus* генетически гетерогенны и могут являться прародителем таких ви-

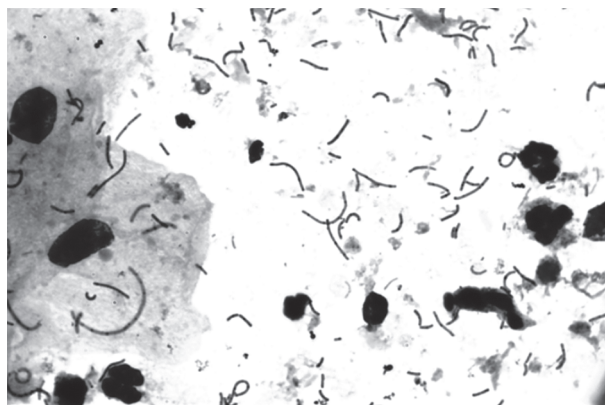


Рисунок 5. Фотография обзорного гинекологического мазка, окраска метиленовым синим, увеличение ×100

Figure 5. Photograph of an overview gynecological smear, stained with methylene blue, magnification ×100

Примечание. Тонкие палочки, которые при типировании были идентифицированы как *L. iners*.

Note. Thin bacilli that were identified as *L. iners* during typing.

дов, как *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, поэтому этот вид может не идентифицироваться [7].

Один вид *Lactobacillus* spp. обнаруживался у 16 женщин в исследуемой выборке, у остальных — два и более вида, что согласуется с литературными данными (два и более вида лактобактерий встречаются чаще, чем один вид) [12, 15].

Таким образом, нами было проведено комплексное исследование биоценоза влагалища условно-здоровых женщин репродуктивного возраста относительно видового разнообразия *Lactobacillus* spp. Нами были получены новые данные о наличии связи между видом лактобактерий, их морфологией и состоянием биоценоза влагалища. С высокой долей вероятности можно утверждать, что наличие толстых палочек в гинекологическом обзорном мазке свиде-

тельствует об обнаружении именно *L. crispatus*. Доминирование данного вида лактобактерий является позитивным признаком при оценке биоценоза влагалища, так как *L. crispatus* обладает наибольшей колонизационной резистентностью и обуславливает поддержание физиологического нормоценоза [13]. Также нами было установлено, что обнаружение тонких палочек в мазке может свидетельствовать о присутствии *L. iners*, и *L. jensenii*. В литературе отмечена связь между присутствием в биоценозе видов *L. iners*, и *L. jensenii* и дисбиозом влагалища, однако эти данные не нашли подтверждения в нашем исследовании [4, 13]. При этом преобладание тонких палочек в мазке может свидетельствовать о возможном развитии дисбиотического состояния.

Список литературы/References

1. Бебнева Т.Н., Дышковец А.А. Дисбиоз влагалища как междисциплинарная проблема. Взгляд с позиций гинеколога и иммунолога. Методы, пути и перспективы решения (интервью) // РМЖ. Мать и дитя. 2020. Т. 3, № 3. С. 157–162. [Bebneva T.N., Dyshkovets A.A. Vaginal dysbiosis is an interdisciplinary issue. Perspectives from a gynecologist and immunologist. Methods, options, and prospects for addressing (interview with). *Russkii meditsinskii zhurnal. Mat' i ditya = Russian Journal of Woman and Child Health*, 2020, vol. 3, no. 3, pp. 157–162. (In Russ.)] doi: 10.32364/2618-8430-2020-3-3-157-162
2. Бебнева Т.Н., Летуновская А.Б. Лактобактерии и эстриол в поддержании биоценоза влагалища // Фарматека. 2010. Т. 9, № 203. С. 24–28. [Bebneva T.N., Letunovskaya A.B. Lactobacillus and estrinol in maintenance of vaginal biocenosis. *Farmateka = Pharmateca*, 2010, vol. 9, no. 203, pp. 24–28. (In Russ.)]
3. Будиловская О.В., Шипицына Е.В., Герасимова Е.Н., Сафронова М.М., Савичева А.М. Видовое разнообразие вагинальных лактобацилл в норме и при дисбиотических состояниях // Журнал акушерства и женских болезней. 2017. Т. 66, № 2. С. 24–32. [Budilovskaya O.V., Shipitsyna E.V., Gerasimova E.N., Safronova M.M., Savicheva A.M. Species diversity of vaginal lactobacilli in norm and in dysbiotic states. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2017, vol. 66, no. 2, pp. 24–32. (In Russ.)] doi: 10.17816/JOWD66224-32
4. Будиловская О.В., Шипицына Е.В., Савичева А.М. Лактобациллы влагалища в норме и при дисбиотических состояниях // Молекулярная диагностика. 2017. Т. 1. С. 360–361. [Budilovskaya O.V., Shipitsyna E.V., Savicheva A.M. Lactobacilli of the vagina in normal and dysbiotic conditions. *Molekulyarnaya diagnostika = Molecular Diagnostics*, 2017, vol. 1, pp. 360–361. (In Russ.)]
5. Ворошилина Е.С., Гончарова Е.В., Тумбинская Л.В. Роль различных видов лактобактерий в формировании биоценоза влагалища у женщин с сохранной нормофлорой // Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. Т. 1, № 33. С. 99–103. [Voroshilina E.S., Goncharova E.V., Tumbinskaya L.V. Role of different lactobacillus species in formation of vaginal biocenosis with intact normal microflora. *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki = Herald of the Ural Medical Academia*, 2011, vol. 1, no. 33, pp. 99–103. (In Russ.)]
6. Ворошилина Е.С., Плотко Е.Э., Исламиди Д.К., Лаврентьева И.В., Зорников Д.Л. Микробиоценоз влагалища с точки зрения ПЦР в реальном времени. Возможности коррекции дисбиотических нарушений влагалища: учебное пособие. Екатеринбург, 2018. 60 с. [Voroshilina E.S., Plotko E.E., Islamidi D.K., Lavrentieva I.V., Zornikov D.L. The vaginal microbiota from the perspective of real-time PCR. Possibilities for correcting dysbiotic conditions: textbook. *Yekaterinburg*, 2018. 60 p. (In Russ.)]
7. Демкин В.В. Видовое разнообразие лактобактерий вагинального микробиома: как посмотреть // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018. Т. 36, № 3. С. 3–12. [Demkin V.V. Species diversity of lactobacillus of vaginal microbiome: how to see. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2018, vol. 36, no. 3, pp. 3–12. (In Russ.)] doi: 10.17116/molgen2018360313
8. Дикке Г.Б. Бактериальный вагиноз: новые аспекты этиопатогенеза и выбора терапевтических стратегий // РМЖ. Мать и дитя. 2019. Т. 2, № 4. С. 307–313. [Dikke G.B. Bacterial vaginosis: novel aspects of etiology, pathogenesis, and selection of therapeutic strategy. *Russkii meditsinskii zhurnal. Mat' i ditya = Russian Journal of Woman and Child Health*, 2019, vol. 2, no. 4, pp. 307–313. (In Russ.)] doi: 10.32364/2618-8430-2019-2-4-307-313
9. Дрожжина М.Б. Влагалищная микробиота, иммунный ответ и некоторые инфекции, передаваемые половым путем: механизмы взаимодействия и регуляции влагалищной экосистемы // Клиническая дерматология и венерология. 2020. Т. 19, № 6. С. 926–933. [Drozhdina M.B. Vaginal microbiota, immune response and some sexually transmitted infections: mechanisms of interaction and regulation of the vaginal ecosystem. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology*, 2020, vol. 19, no. 6, pp. 926–933. (In Russ.)] doi: 10.17116/klinderma202019061926
10. Мелкумян А.Р., Припутневич Т.В. Влагалищные лактобактерии современные подходы к видовой идентификации и изучению их роли в микробном сообществе // Акушерство и гинекология. 2013. № 7. С. 18–23. [Melkumyan A.R., Priputnevich T.V. Vaginal lactobacilli: Current approaches to species identification and to the study of their role in the microbial community. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2013, vol. 7, pp. 18–23. (In Russ.)]

11. Chee W.J.Ya., Chew S.Y., Than L.T.L. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. *Microb. Cell. Fact.*, 2020, vol. 19, no. 1, pp. 1–24. doi: 10.1186/s12934-020-01464-4
12. Dan Z., Linlin M., Qingwei M., Qiping L. Diversity of Lactobacillus in vagina of vulvovaginal candidiasis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2017, vol. 95, no. 13, pp. 1012–1016. doi: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2015.13.012
13. Fredricks D.N., Fiedler T.L., Marrazzo J.M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med.*, 2005, vol. 353, no. 18, pp. 1899–1911. doi: 10.1056/NEJMoa043802
14. Jespers V., Wijgert J., Cools P., Verhelst R., Verstraelen H., Delany-Moretlwe S., Mwaura M., Ndayisaba G.F., Mandaliya K., Menten J., Hardy L., Crucitti T. The significance of Lactobacillus crispatus and L. vaginalis for vaginal health and the negative effect of recent sex: a cross-sectional descriptive study across groups of African women. *BMC Infect. Dis.*, 2015, vol. 15, no. 115, pp. 1–15. doi: 10.1186/s12879-015-0825-z
15. Ravela J., Gajera P., Abdob Z., Schneider G.M., Koeniga S.S.K., McCullea S.L., Karlebachd S., Gorlee R., Russell J., Tacketf C.O., Brotmana R.M., Davis C.C., Aultd K., Peraltae L., Forney L.J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *PNAS*, 2011, vol. 108 (suppl. 1), pp. 4680–4687. doi: 10.1073/pnas.1002611107

Авторы:

Федорова К.С., старший лаборант НИИ иммунологии ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;
Абрамовских К.А., врач акушер-гинеколог ГБУЗ Областной перинатальный центр, г. Челябинск, Россия;
Савочкина А.Ю., д.м.н., доцент, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии НИИ иммунологии ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;
Минасова А.А., к.б.н., старший научный сотрудник НИИ иммунологии ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;
Зотова М.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник НИИ иммунологии ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;
Саматова А.И., старший лаборант НИИ иммунологии ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;
Нохрин Д.Ю., к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия;
Никושкина К.В., к.м.н., ведущий научный сотрудник НИИ иммунологии ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия.

Authors:

Fedorova K.S., Senior Laboratory Assistant, Research Institute of Immunology South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation;
Abramovskikh K.A., Obstetrician-Gynecologist, Regional Perinatal Center, Chelyabinsk, Russian Federation;
Savochkina A.Yu., DSc (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Research Institute of Immunology South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation;
Minasova A.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Research Institute of Immunology South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation;
Zotova M.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Research Institute of Immunology South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation;
Samatova A.I., Senior Laboratory Assistant, Research Institute of Immunology South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation;
Nokhrin D.Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation;
Nikushkina K.V., PhD (Medicine), Leading Researcher, Research Institute of Immunology South Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЛАГЕЛЛИНА С *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

А.П. Жеребцов, И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, Н.А. Михайлова

ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Резюме. Важным фактором вирулентности в патогенезе инфекций, вызванных *Pseudomonas aeruginosa*, является флагеллин: он служит главным структурным компонентом жгутика бактерии и акцептором для TLR5 рецептора врожденной иммунной системы. Толл-подобный рецептор 5 способен связывать флагеллин бактерий и активировать противовоспалительный фактор транскрипции NF-κB через адаптерный белок MyD88, который вызывает продукцию противовоспалительных цитокинов. Включение флагеллина в состав рекомбинантных белков увеличивало способность стимулировать продукцию противовоспалительных цитокинов и активировать антигенпрезентирующие клетки. Ряд экспериментов показали, что использование флагеллина в качестве молекулярного адьюванта в составе вакцин повышает экспрессию молекул CD80, CD83, CD86 и МНС II на поверхности дендритных клеток, а также приводит к увеличению секреции IFNγ и α-дефензинов дендритными и НК-клетками; Т-клеточную пролиферацию и активацию антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, а также повышенную индукцию антиген-специфических IgG и IgA антител. Из-за природной и приобретенной резистентности *P. aeruginosa* к антибиотикам доступный выбор антисинегнойных препаратов сокращается, в связи с чем проблема разработки эффективных терапевтических препаратов для защиты от данной инфекции приобретает высокую медико-социальную значимость. С данной целью представляется перспективным изучение иммунобиологических свойств флагеллина *P. aeruginosa* как возможного компонента вакцины. Исходя из этого, в лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова был получен рекомбинантный флагеллин С (FliC) *P. aeruginosa*, доказана его иммуногенность и протективные свойства. Однако открытым остается вопрос стандартизации методов скрининга и контроля получаемого рекомбинантного белка FliC. Для решения данного вопроса были получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела (МКА) заданной специфичности, изучены основные иммунохимические свойства МКА и оценена возможность их использования в качестве реагентов при конструировании тест системы для выявления и стандартизации рекомбинантного белка FliC при его получении. Цель работы: получение моноклональных антител к рекомбинантному белку флагеллину С *P. aeruginosa*, изучение их основных иммунохимических свойств и оценка возможности использования для скрининга и контроля рекомбинантного белка FliC.

Ключевые слова: *P. aeruginosa*, флагеллин, рекомбинантный белок FliC, моноклональные антитела, МКА, гибридом-продуценты.

Адрес для переписки:

Жеребцов Антон Павлович
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (968) 499-64-85.
E-mail: antonzherebtsov@yandex.ru

Contacts:

Anton P. Zherebtsov
105064, Russian Federation, Moscow, Maly Kazenny lane, 5a,
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (968) 499-64-85.
E-mail: antonzherebtsov@yandex.ru

Для цитирования:

Жеребцов А.П., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф., Михайлова Н.А.
Получение моноклональных антител для детекции рекомбинантного
флагеллина С *Pseudomonas aeruginosa* // Инфекция и иммунитет. 2024.
Т. 14, № 3. С. 551–556. doi: 10.15789/2220-7619-POM-16865

Citation:

Zherebtsov A.P., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F., Mikhailova N.A. Preparation
of monoclonal antibodies for detection of recombinant flagellin C from
Pseudomonas aeruginosa // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 551–556. doi: 10.15789/2220-
7619-POM-16865

PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR DETECTION OF RECOMBINANT FLAGELLIN C FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Zherebtsov A.P., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F., Mikhailova N.A.

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. An important virulence factor in the pathogenesis of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* is flagellin: it serves as the main structural component of the bacterial flagellum and an acceptor for the TLR5 receptor of the innate immune system. Toll-like receptor 5 is able to bind bacterial flagellin and activate the anti-inflammatory transcription factor NF- κ B through the adapter protein MyD88, which induces the production of anti-inflammatory cytokines. The inclusion of flagellin in recombinant proteins increased the ability to stimulate the production of anti-inflammatory cytokines and activate antigen-presenting cells. A number of experiments have shown that the use of flagellin as a molecular adjuvant in vaccines increases the expression of CD80, CD83, CD86 and MHC II molecules on the surface of dendritic cells, and also leads to an increase in the secretion of IFN γ and α -defensins by dendritic and NK cells; T cell proliferation and activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes, as well as increased induction of antigen-specific IgG and IgA antibodies. Due to the natural and acquired resistance of *P. aeruginosa* to antibiotics, the available choice of antipseudomonas drugs is decreasing, and therefore the problem of developing effective therapeutic drugs to protect against this infection is of high medical and social importance. For this purpose, it seems promising to study the immunobiological properties of *P. aeruginosa* flagellin as a possible vaccine component. Based on this, in the Laboratory of Protective Antigens of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, recombinant flagellin C (FliC) of *P. aeruginosa* was obtained, and its immunogenicity and protective properties were proven. However, the question of standardizing methods for screening and monitoring the resulting recombinant FliC protein remains open. To solve this issue, hybridomas producing monoclonal antibodies (mAb) of a given specificity were obtained, the basic immunochemical properties of mAbs were studied, and the possibility of using them as reagents in constructing a test system for identifying and standardizing the recombinant FliC protein upon its production was assessed. Purpose of the work: to obtain monoclonal antibodies to the recombinant flagellin C protein of *P. aeruginosa*; to study their basic immunochemical properties and to evaluate the possibility of using the recombinant FliC protein for screening and control.

Key words: *P. aeruginosa*, flagellin, recombinant FliC protein, monoclonal antibodies, mAb, hybridoma-producer.

Введение

Pseudomonas aeruginosa является одним из наиболее распространенных источников внутрибольничных инфекций и может вызывать серьезные заболевания у пациентов с ослабленным иммунитетом, такие как вентилятор-ассоциированная пневмония (ВАП) и первичные инфекции кровотока [13]. Синегнойная палочка в высоком проценте случаев является причиной внутрибольничных пневмоний, первичных бактериемий, инфекций мочеполовой системы, гнойных послеоперационных и ожоговых инфекций. Данные заболевания сопровождаются тяжелыми осложнениями и связаны с высокой летальностью [8].

Важным фактором вирулентности в патогенезе инфекций, вызванных *P. aeruginosa*, является флагеллин: он служит главным структурным компонентом жгутика бактерии и акцептором для TLR5 рецептора врожденной иммунной системы [11]. Толл-подобный рецептор 5 связывает флагеллин бактерий и активирует противовоспалительный фактор транскрипции NF- κ B через адаптерный белок MyD88, который вызывает продукцию противовоспалительных цитокинов. Из-за способности вызывать иммунные реакции флагеллины

играют роль адъювантов при разработке вакцин [3, 6, 9]. Показано, что введение флагеллина *S. typhimurium* мышам оказывает защитный эффект в отношении токсических воздействий бактерий, вирусов и радиаций [10], свойства же флагеллина *P. aeruginosa* остаются до конца не изученными.

Разработанная Жоржем Келлером и Цезарем Мильштейном технология получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела заданной специфичности, открыла новые пути в методах иммунологических исследований [1]. Клеточные гибриды на основе клеток миеломы и антителопродуцирующих лимфоцитов мышей линии BALB/c используются для получения моноклональных антител к различным антигенам, включая антигены вирусов, бактерий, паразитов, клеток крови, а также к различным классам иммуноглобулинов. Гибридомы являются стабильным продуцентом антител строго определенной специфичности, одного изотипа, направленных к одному эпитопу антигена. В связи с этим к антигену с несколькими эпитопами можно получить столько МКА, сколько имеется антигенных детерминант, и в дальнейшем отобрать клоны лимфоцитов, которые будут продуцировать антитела нужной специфичности.

В литературе имеются данные о получении моноклональных антител к флагеллину *P. aeruginosa*. Мышиные моноклональные антитела к флагеллину синегнойной палочки способны заметно повышать выживаемость мышей, инфицированных *P. aeruginosa*, в экспериментальной модели ожоговой инфекции [7]. Также широко известно применение моноклональных антител в диагностических целях. Применение моноклональных антител для выявления рекомбинантного флагеллина *S. P. aeruginosa* позволит разработать методы контроля и стандартизации препаратов для защиты от синегнойной инфекции.

Целью настоящей работы явилось получение моноклональных антител к флагеллину *S. P. aeruginosa*, изучение их иммунохимических свойств и оценка возможности их использования в качестве реагентов при конструировании тест-системы для выявления и стандартизации рекомбинантного белка FliC при его получении.

Материалы и методы

В работе использованы традиционные методы гибридной технологии, иммунохимические, биохимические и микробиологические методы исследования.

Для получения иммунных спленоцитов использовали самок мышей линии BALB/c массой 15–18 г. Мышей получали из питомника «Филиал Андреевка ФГБУН НЦБМТ ФМБА России», Московской области. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен Локальным советом по Этике при ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол Учреждения № 7 от 29.09.2022).

Для получения рекомбинантного флагеллина *S. P. aeruginosa* последовательность гена *fliC* была встроена в плазмидный вектор pQE-30 под контроль регуляторных участков для экспрессии в клетках *Escherichia coli* штамма M15 (Qiagen). Отбор клонов проводили при помощи рестриктового анализа и секвенирования. В результате культивирования штамма-продуцента с экспрессией гена *fliC*, индукция которой осуществлялась добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид, происходил синтез рекомбинантного белка FliC с молекулярной массой 40,7 kDa, что соответствовало расчетным данным [4].

Очистку рекомбинантного флагеллина *S. P. aeruginosa* проводили в несколько этапов: выделение телец включения и их последующее растворение в буферных растворах, содержащих мочевины и гуанидин гидрохлорид, и дальнейший диализ против 50 mM Tris-HCl, pH 9,0 [5].

Схема иммунизации мышей включала в себя трехкратное внутрибрюшинное введение рекомбинантного FliC в дозе 50 мкг на мышью с двухнедельными интервалами. Последнюю иммунизацию проводили за 3 дня до гибридизации.

В качестве злокачественного партнера для гибридизации использовали клетки линии P3 X63 Ag8.653, дефектную по активности фермента ГДФРТ⁻, и, вследствие этого, не растущую на среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин, тимидин (НАТ). Миеломные и гибридные клетки культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США); селекцию гибридом проводили на среде с добавлением НАТ и переходной к обычной среде НТ. В качестве фидера в опыте и при клонировании культур использовали клетки перитонеального смыва мышей. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Гибридизацию клеток, последующее культивирование, первичный скрининг, массовое культивирование гибридом-продуцентов *in vitro*, криоконсервацию клеток, а также очистку МКА с помощью насыщенного раствора сульфата аммония проводили принятыми в лаборатории методами [2].

Контроль роста гибридных культур осуществляли визуально при помощи инвертированного микроскопа (Leitz, Германия). Антитела-продуцирующие гибридомы отбирали по результатам непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), проводимого на планшетах фирмы Costar Medium (США) в соответствии с общепринятыми принципами. Планшеты сенсibilizировали рекомбинантным FliC в концентрации 10 мкг/мл 0,05 M карбонатно-бикарбонатного буфера pH 9,6 в течение ночи при 4°C. После каждого этапа планшеты трехкратно отмывали от непрореагировавших компонентов раствором 0,15 M фосфатно-солевого буфера pH 7,2, содержащего 0,05% твин-20 (ФСБ-твин). После инкубации планшетов с образцами исследуемых МКА в течение часа при 37°C в лунки планшетов вносили конъюгат антител кролика к иммуноглобулинам мыши с пероксидазой в рекомендуемом разведении 1:5000 (ИМТЕК, Россия) в ФСБ-твин и также инкубировали в течение часа при 37°C. Реакцию проявляли однокомпонентным раствором тетраметилбензидина (Amresco, США). Отрицательным контролем служила среда культивирования не секретирующей иммуноглобулины линии клеток NP. В качестве положительного контроля использовали сыворотку крови взятой в опыт иммунизированной мыши.

Через 10 минут реакцию останавливали 0,5 М раствором серной кислоты. Результаты реакции оценивали по оптической плотности на спектрофотометре Thermo Fisher Scientific Multiskan FC (США) при длине волны 450 нм.

При первичном скрининге в ИФА образцы супернатантов культур тестировали в разведении 1:5. Культуры для последующей работы отбирали по значениям оптической плотности, равным или превышающим 1,0 ед. Для определения активности антителопродукции отобранных данным образом культур образцы супернатантов титровали двукратным шагом по горизонтальному ряду планшета, начиная с 1:10. За титр антител принимали предельное разведение образца, оптическая плотность которого в лунке планшета превышала значение ОП отрицательного контроля на 0,1 ед.

Для последующих исследований отбирались наиболее активные (титр антител не ниже 1:640) и стабильные (сохранение антителопродукции на всем сроке культивирования) продуценты.

Клонирование гибридом проводили методом предельных разведений в возможно ранние сроки для стабилизации свойства антителообразования. Все гибридные культуры, продуцирующие специфические антитела, подлежали криоконсервированию.

Гибридомы-продуценты моноклональных антител культивировали *in vitro*. По мере роста в питательной среде культуры пересевали с меньших объемов на большие. Во время всего процесса культивирования отбирали пробы на тестирование с целью определения стабильности антителопродукции.

Изучение иммунохимических свойств МКА проводили с использованием препаратов очищенных антител — γ -глобулиновых фракций, полученных из среды культивирования гибридом-продуцентов путем осаждения насыщенным раствором сульфата аммония. Концентрацию белка в препаратах глобулиновых фракций МКА определяли на спектрофотометре (Genesis, США) при 260–280 нм.

Определение изотипа МКА проводили методом ИФА. В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена козьи антитела к IgA, IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, Ig3 мыши (Thermo Fisher Sc., США) в предложенных разведениях.

Изучение специфичности полученных МКА к рекомбинантному FliC проводили методом иммуноблоттинга. Электрофоретическое разделение рекомбинантного FliC осуществляли в тонком слое 10% полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэммли (1970) [12]. После переноса белка на нитроцеллюлозную мембрану проводили

иммуноблоттинг с полученными моноклональными антителами к рекомбинантному FliC.

Для установления специфической направленности МКА к одному или разным эпитопам рекомбинантного FliC был применен ИФА, при котором в лунки с сорбированным на твердой фазе антигеном вносили на 1 час одни антитела в насыщающей концентрации, а после отмывки планшета — другие. Контролем служили лунки с внесенными антителами одного клона. Подбор условий для проведения данного варианта ИФА проводили, применяя метод шахматного титрования антигена и антител, направленного на определение минимальной концентрации антигена на твердой фазе и максимальной концентрации антител, специфически перекрывающих антигенные детерминанты. Оценку оптической плотности выполняли на спектрофотометре Thermo Fisher Scientific Multiskan FC (США) при длине волны 450 нм. Увеличение оптической плотности в лунках, содержащих смесь МКА, по отношению к контролю свидетельствовало о направленности МКА к разным эпитопам антигена.

Результаты и обсуждение

Для получения первичных гибридных культур мышей линии BALB/c иммунизировали рекомбинантным белком FliC *P. aeruginosa*. Оптимальная схема иммунизации включала в себя трехкратное внутрибрюшинное введение препарата в дозе 50 мкг в 0,5 мл физиологического раствора на мышь с двухнедельным интервалом, при этом титр специфических антител *in vivo* в ИФА составлял 1:512 000 — 1:1 024 000.

В результате гибридизации иммунных спленоцитов мышей и клеток миеломы по итогам первичного тестирования из 288 засеянных лунок были отобраны 32 культуры с наиболее высокими титрами антител (1:640–1:2560) к рекомбинантному белку FliC *P. aeruginosa*. При дальнейшем культивировании часть культур утратила способность к продукции антител, часть не отличалась устойчивой пролиферацией; такие культуры были выведены из эксперимента. На основании данных последующих тестирований и наблюдения за ростом культур для наработки МКА в препаративных количествах и дальнейшего исследования их иммунохимических свойств были отобраны три наиболее активных и стабильных антителопродуцента к рекомбинантному FliC *P. aeruginosa*: МКА-1, МКА-2 и МКА-3. Титр антител в ИФА составлял не менее 1:1280 на протяжении всего процесса культивирования гибридом.

Изучение иммунохимических свойств МКА проводили с использованием γ -глобулиновых фракций, полученных из среды культивирования гибридом-продуцентов.

При определении изотипов продуцируемых гибридами МКА установлено, что МКА-1 относятся к подклассу IgG1, а МКА-2 и МКА-3 — к подклассу IgG2b мыши.

Исследование взаимодействия полученных МКА с рекомбинантным FliC в иммуноблоттинге показало, что МКА-1 (трек 3) и МКА-2 (трек 4) абсолютной специфичностью взаимодействовали с рекомбинантным FliC. МКА-3 (трек 5) не выявлял FliC в данном типе анализа, что, возможно, связано с конформационными особенностями антигена (рис. 1). В качестве положительного контроля использовали сыворотку мышей, иммунизированных рекомбинантным FliC (трек 2), а в качестве отрицательного контроля — МКА к белку F наружной мембраны (OprF) *P. aeruginosa* (трек 6).

При установлении эпитопной направленности МКА в ИФА было продемонстрировано увеличение сигнала оптической плотности в лунках, где представлены оба варианта антигенов по сравнению с пробами, представленными одними антителами (рис. 2).

Отсутствие конкуренции между антителами за места связывания свидетельствовало о направленности МКА к пространственно удаленным эпитопам рекомбинантного белка FliC.

Определение сорбционных свойств МКА в прямом варианте ИФА при разных условиях (0,05 М карбонатно-бикарбонатный буфер pH 9,6 и 0,15 М фосфатно-солевой буфер pH 7,2) выявило высокую сорбционную активность МКА-2 независимо от состава буферного раствора и значений pH; МКА-1 и МКА-3 не связывались с твердой фазой при данных условиях. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования МКА-2 в качестве распознающих, а МКА-1 и МКА-3 в качестве детектирующих антител при конструировании сэндвич-варианта ИФА для выявления рекомбинантного белка FliC.

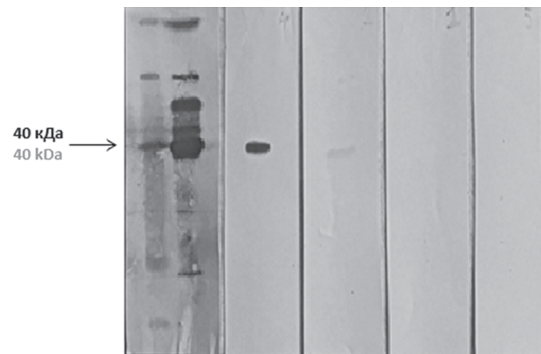


Рисунок 1. Исследование специфичности полученных МКА в иммуноблоттинге

Figure 1. Study of the specificity of the obtained mAbs in immunoblotting

Примечание. Треки: 1 — белковый маркер (молекулярные массы фрагментов маркера: 20, 30, 40, 50, 60, 70 kDa), 2 — сыворотка мышей иммунизированных рекомбинантным FliC, 3 — МКА-1, 4 — МКА-2, 5 — МКА-3, 6 — МКА к белку F наружной мембраны (OprF) *P. aeruginosa*.

Note. Track: 1 — protein marker (molecular masses of marker fragments: 20, 30, 40, 50, 60, 70 kDa), 2 — serum of mice immunized with recombinant FliC, 3 — mAb-1, 4 — mAb-2, 5 — mAb-3, 6 — mAb to the outer membrane protein F (OprF) of *P. aeruginosa*.

Заключение

В ходе экспериментов получено 3 штамма гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к разным антигенным детерминантам рекомбинантного белка FliC. Проведена разработка необходимых для проведения дальнейших исследований препаративных количеств моноклональных антител и изучены их основные иммунохимические свойства; показана возможность использования полученной панели МКА в качестве реагентов при конструировании тест-системы для выявления и контроля рекомбинантного белка FliC.

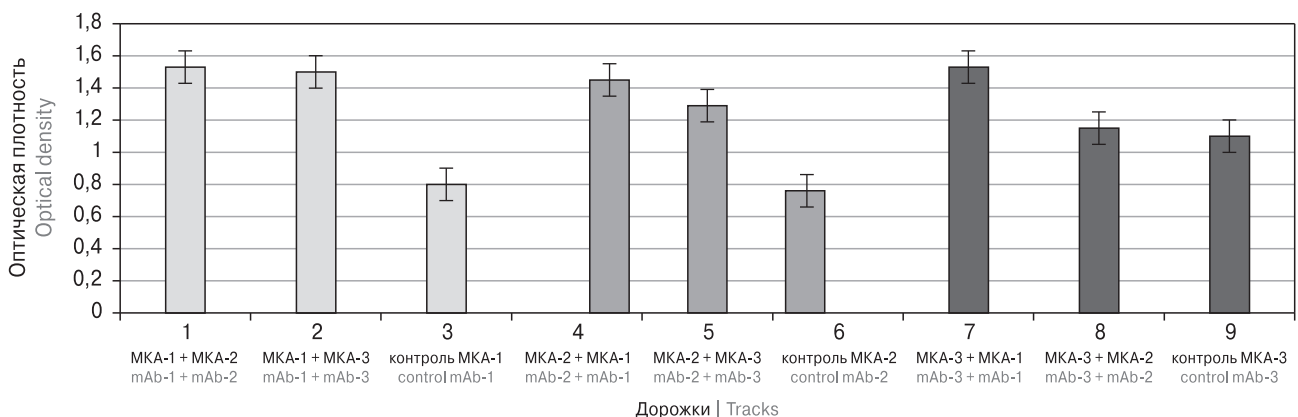


Рисунок 2. Определение эпитопной направленности полученных МКА

Figure 2. Determination of the epitope targeting of the obtained mAbs

Список литературы/References

1. Бурчанов Ю.И. Моноклональные антитела: от создания до клинического применения // Клиническая онкогематология, фундаментальные исследования и клиническая практика. 2016. Т. 9, № 3. С. 237–244. [Burchanov Yu.I. Monoclonal antibodies: from creation to clinical use. *Klinicheskaya onkogematologiya, fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology, Fundamental Research and Clinical Practice*, 2016, vol. 9, no. 3, pp. 237–244. (In Russ.)] doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-237-244
1. Волкова Н.П. Физико-химические свойства белков и методы их выделения / Биохимия: учебник; под ред. Е.С. Северина. 5-е изд., испр. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. С. 66–72. [Volkova N.P. Physico-chemical properties of proteins and methods of their isolation. In: *Biochemistry: textbook*. 5th ed. Moscow: GEOTAR-Media, 2019, pp. 66–72. (In Russ.)]
2. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Симбирцев А.С. Исследование протективной активности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 5. С. 417–424. [Dukhovlinov I.V., Bogomolova E.G., Fedorova E.A., Simbirtsev A.S. Protective activity study of a candidate vaccine against rotavirus infection based on recombinant protein FliCVP6VP8. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 5, pp. 417–424. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-417-424
3. Жеребцов А.П., Калошин А.А., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантного флагеллина *C* *Pseudomonas aeruginosa* и изучение его иммунобиологических свойств // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2024. Т. 24, № 1. С. 91–102. [Zherebtsov A.P., Kaloshin A.A., Mikhailova N.A. Production and immunological characterisation of recombinant flagellin *C* of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2024, vol. 24, no. 1, pp. 91–102. (In Russ.)] doi: 10.30895/2221-996X-2024-24-1-91-102
4. Патент № 2793753 Российская Федерация, МПК C12N 1/21 (2006.01), C12N 15/31 (2006.01), C12N 15/70 (2006.01). Рекомбинантная плазмидная ДНК pPA-FliC, кодирующая синтез рекомбинантного флагеллина-С *Pseudomonas aeruginosa*, штамм *Escherichia coli* PA-FliC — продуцент гибридного рекомбинантного белка и способ получения указанного белка: № 2022123813; заявлено 07.09.2022; опубликовано 05.04.2023 / Калошин А.А., Жеребцов А.П., Михайлова Н.А. Патентообладатель: ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. 18 с. [Patent No. 2793753 Russian Federation, Int. Cl. C12N 1/21 (2006.01), C12N 15/31 (2006.01), C12N 15/70 (2006.01). Recombinant plasmid DNA pPA-FliC encoding synthesis of recombinant flagellin *C* *Pseudomonas aeruginosa*, strain *Escherichia coli* PA-FliC — producer of the hybrid recombinant protein and a method for producing said protein. No. 2022123813; application: 07.09.2022; date of publication 05.04.2023 / Kaloshin A.A., Zherebtsov A.P., Mikhailova N.A. Proprietors: Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe nauchnoe uchrezhdenie «Nauchno-issledovatel'skij institut vaktsin i syvorotok im. I.I. Mechnikova» (FGBNU NIIVS im. I.I. Mechnikova). 18 p.]
5. Софронов Г.А., Мурзина Е.В., Болехан В.Н., Веселова О.М., Симбирцев А.С. Перспективные направления использования препаратов на основе рекомбинантного флагеллина // Медицинский академический журнал. 2017. Т. 17, № 2. С. 7–20. [Sofronov G.A., Murzina E.V., Bolekhan V.N., Veselova O.M., Simbirtsev A.S. Perspective direction of using flagellin based drugs. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2017, vol. 17, no. 2, pp. 7–20. (In Russ.)] doi: 10.17816/MAJ1727-20
6. Barnea Y., Carmeli Y., Neville L.F., Kahel-Reifer H., Eren R., Dagan S., Navon-Venezia S. Therapy with anti-flagellin A monoclonal antibody limits *Pseudomonas aeruginosa* invasiveness in a mouse burn wound sepsis model. *Burns*, 2009, vol. 35, no. 3, pp. 390–396. doi: 10.1016/j.burns.2008.08.014
7. Chiang H.-Y., Chen T.-C., Lin C.-C., Ho L.-C., Kuo C.-C., Chi C.-Y. Trend and predictors of short-term mortality of adult bacteremia at emergency departments: a 14-year cohort study of 14625 patients. *Open Forum Infect. Dis.*, 2021, vol. 8, no. 11: ofab485. doi: 10.1093/ofid/ofab485
8. Cui B., Liu X., Fang Y., Zhou P., Zhang Y., Wang Y. Flagellin as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines*, 2018, vol. 17, no. 4, pp. 335–349. doi: 10.1080/14760584.2018.1457443
9. Felgner S., Spöring I. The immunogenic potential of bacterial flagella for Salmonella-mediated tumor therapy. *Int. J. Cancer*, 2020, vol. 147, no. 2, pp. 448–460. doi: 10.1002/ijc.32807
10. Hajam I.A., Dar P.A., Shah Nawaz I., Jaume J.C., Lee J.H. Bacterial flagellin—a potent immunomodulatory agent. *Exp. Mol. Med.*, 2017, vol. 49, no. 9: e373. doi: 10.1038/emm.2017.172
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0
12. Spagnolo A.M., Sartini M., Cristina M.L. *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting. *Rev. Med. Microbiol.*, 2021, vol. 32, no. 3, pp. 169–175. doi: 10.1097/MRM.0000000000000271

Авторы:

Жеребцов А.П., научный сотрудник лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Яковлева И.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Гаврилова Н.Ф., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Михайлова Н.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией протективных антигенов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Zherebtsov A.P., Researcher, Laboratory of the Protective Antigens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Yakovleva I.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Therapeutic Vaccines, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Gavrilova N.F., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Therapeutic Vaccines, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Mikhailova N.A., DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of the Protective Antigens, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 01.04.2024
Принята к печати 03.04.2024

Received 01.04.2024
Accepted 03.04.2024

ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ШИГА-ТОКСИН 2 (Stx2) У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ЭШЕРИХИОЗОМ С ГЕМОЛИТИКО- УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

М.А. Шкуратова¹, А.Е. Хлынцева¹, О.В. Калмантаева¹, Н.Н. Карцев¹, А.Л. Музуров^{2,3},
В.В. Фирстова¹

¹ ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, п. Оболенск, Московская область, Россия

² ГБУЗ Детская городская клиническая больница святого Владимира Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

³ ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Резюме. Продуцирующие шига-токсин *Escherichia coli* (STEC) вызывают острые кишечные инфекции, а также являются причиной развития острой почечной недостаточности, особенно у детей. Шига-токсины (Stx) занимают центральное место в патогенезе гемолитико-уремического синдрома (ГУС) при эшерихиозах. В представленной работе проведен анализ эффективности лабораторной диагностики энтерогеморрагического эшерихиоза у больных на стадии проявления ГУС и/или острой почечной недостаточности (ОПН) с использованием микробиологических, иммунологических методов исследования и ПЦР-анализа. В исследовании использовали клинический материал от 30 пациентов педиатрического отделения интенсивной терапии ГБУЗ «Детская городская клиническая больница святого Владимира» города Москвы с симптомами ГУС в возрасте от 8 месяцев до 5 лет. В качестве контроля использовали сыворотки крови 20 здоровых доноров. В результате проведения ПЦР-анализа ДНК *stx2* было выявлено в 23,3% случаях. Бактериологическое исследование позволило высеять чистую культуру *Escherichia coli* O157:H7 только в 3,3% случаев. Поскольку развитие ГУС начинается у больных острой кишечной инфекцией вызванной шига-токсин-продуцирующими микроорганизмами начиная с 5 дня заболевания, когда уже проводится антибиотикотерапия, бактерии могут быть полностью уничтожены, что затрудняет их выявление бактериологическими методами, а также обнаружение генов, кодирующих шига-токсины в ПЦР-анализе. Обычно больные с ГУС поступают в отделение интенсивной терапии на 5–7 день от начала заболевания, когда в крови уже начинают циркулировать специфические к патогену иммуноглобулины класса G. В связи с этим использование иммунологических анализов может быть эффективным для подтверждения диагноза STEC-инфекции. В наших исследованиях иммуноферментный анализ позволил обнаружить антитела к Stx2A у 63,3%, а к Stx2B — у 43,3% больных.

Адрес для переписки:

Шкуратова Мария Андреевна
142279, Россия, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск,
Территория «Квартал А», 24, ФГУН Государственный научный
центр прикладной микробиологии и биотехнологии.
Тел.: 8 (4967) 36-00-03 (служебн.); 8 (903) 893-56-18 (моб.).
E-mail: shkuratova@obolensk.org

Contacts:

Maria A. Shkuratova
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,
Obolensk, State Research Center for Applied Microbiology
and Biotechnology.
Phone: +7 (4967) 36-00-03 (office); +7 (903) 893-56-18 (mobile).
E-mail: shkuratova@obolensk.org

Для цитирования:

Шкуратова М.А., Хлынцева А.Е., Калмантаева О.В., Карцев Н.Н.,
Музуров А.Л., Фирстова В.В. Гуморальный иммунный ответ на шига-
токсин 2 (Stx2) у детей, больных эшерихиозом с гемолитико-
уремическим синдромом // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3.
С. 557–563. doi: 10.15789/2220-7619-HIR-16859

Citation:

Shkuratova M.A., Khlyntseva A.E., Kalmantaeva O.V., Kartsev N.N.,
Muzurov A.L., Firstova V.V. Humoral immune response to shiga toxin 2 (Stx2)
in children with escherichiosis with hemolytic-uremic syndrome // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14,
no. 3, pp. 557–563. doi: 10.15789/2220-7619-HIR-16859

Работа выполнена в рамках Отраслевой программы Роспотребнадзора (№ 078).

The work was carried out within the framework of the Industry Programme of Rosпотребнадзор (No. 078).

© Шкуратова М.А. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-HIR-16859>

Методом иммуноблоттинга во всех сыворотках, полученных от больных, были обнаружены антитела к Stx2A и в 66,7% случаев к Stx2B. Иммуноблот-анализ характеризовался более высокой чувствительностью для выявления антител к Stx2, однако в связи с наличием иммунологической прослойки среди здоровых людей предпочтительно использовать ИФА-анализ. У здоровых доноров при наличии антител к Stx2 титр антител был достоверно ниже, чем у больных. Лабораторное подтверждение диагноза STEC-инфекции затруднено при проведении микробиологических и молекулярно-генетических исследований, что подтверждается в данной работе. Расширить эффективность лабораторной диагностики может постановка ИФА, направленного на выявление антител к Stx2A.

Ключевые слова: шига-токсин, *Escherichia coli*, гемолитико-уремический синдром, антитела, ПЦР, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ.

HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO SHIGA TOXIN 2 (Stx2) IN CHILDREN WITH ESCHERICHIOSIS WITH HEMOLYTIC-UREMIC SYNDROME

Shkuratova M.A.^a, Khlyntseva A.E.^a, Kalmantaeva O.V.^a, Kartsev N.N.^a, Muzurov A.L.^{b,c}, Firstova V.V.^a

^a State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

^b Moscow Clinical Municipal Children Hospital St. Vladimir, Moscow, Russian Federation

^c Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health, Moscow, Russian Federation

Abstract. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) causes acute intestinal infections and also causes acute renal failure, especially in children. Shiga toxins (Stx) occupy a central place in the pathogenesis of hemolytic uremic syndrome (HUS) in Escherichiosis. The presented work analyzes the effectiveness of laboratory diagnostics of enterohemorrhagic escherichiosis in patients at the stage of manifestation of HUS and/or acute renal failure using microbiological, immunological research methods and PCR analysis. The study used clinical material from 30 patients in the pediatric intensive care unit of the St. Vladimir Children's City Clinical Hospital in Moscow with symptoms of HUS aged from 8 months to 5 years. Blood sera from 20 healthy donors were used as control. As a result of PCR analysis, *stx2* DNA was detected in 23.3% of cases. Bacteriological research made it possible to sow a pure culture of *Escherichia coli* O157:H7 in only 3.3% of cases. Since the development of HUS begins in patients with acute intestinal infection caused by Shiga toxin-producing microorganisms starting from the 5th day of the disease, when antibiotic therapy is already carried out, the bacteria can be completely destroyed, which makes it difficult to identify them by bacteriological methods, as well as to detect genes encoding Shiga toxin in PCR analysis. Typically, patients with HUS are admitted to the intensive care unit 5–7 days after the onset of the disease, when class G immunoglobulins specific to the pathogen are already beginning to circulate in the blood. In this regard, the use of immunological tests can be effective to confirm the diagnosis of STEC infection. In our studies, enzyme immunoassay allowed us to detect antibodies to Stx2A in 63.3% and to Stx2B in 43.3% of patients. Using immunoblotting, antibodies to Stx2A were detected in all sera obtained from patients and in 66.7% of cases to Stx2B. Immunoblot analysis was characterized by higher sensitivity for detecting antibodies to Stx2, however, due to the presence of an immunological layer among healthy people, it is preferable to use ELISA analysis. In healthy donors with antibodies to Stx2, the antibody titer was significantly lower than in patients. Laboratory confirmation of the diagnosis of STEC infection is difficult when conducting microbiological and molecular genetic studies, which is confirmed in this work. The effectiveness of laboratory diagnostics can be expanded by performing an ELISA aimed at detecting antibodies to Stx2A.

Key words: Shiga toxin, *Escherichia coli*, hemolytic-uremic syndrome, antibodies, PCR, immunoblotting, enzyme-linked immunosorbent assay.

Введение

Прогрессирование кишечной инфекции, вызванной продуцирующими шига-токсин штаммами *Escherichia coli* (STEC) — эшерихиоза, может приводить к тяжелым для жизни осложнениям, таким как гемолитико-уремический синдром (ГУС), который представляет собой тромботическую микроангиопатию, характеризующуюся острой почечной недостаточностью, тромбоцитопенией и гемолитической анемией [4].

Во всем мире на долю STEC-инфекций ежегодно приходится 2,8 млн острых заболева-

ний, из которых 3890 случаев сопровождается развитием ГУС [6, 8, 10]. Ассоциированный со STEC-штаммами ГУС составляет до 90% случаев ГУС у детей и является самой частой причиной острой почечной недостаточности в детском возрасте. В России вспышки STEC-ГУС и спорадические случаи регистрируются в Московском, Поволжском регионах, Омске, Иваново, Оренбурге. Наиболее часто встречающимся серотипом, вызывающим серьезные вспышки и спорадические случаи типичного ГУС, является штамм *E. coli* O157:H7 (реже O111, O103, O121 и др.) [3].

Патогенность STEC-штаммов обусловлена продукцией шига-токсинов (Stx), вызывающих гибель клеток вследствие инактивации рибосом и прекращения синтеза белка. Семейство Stx включает два типа белков (Stx1 и Stx2) [8]. Известно, что при заболеваниях, вызванных штаммами, продуцирующими Stx2, ГУС развивается в 6,8 раз чаще, чем при инфекциях, вызванных штаммами, продуцирующими Stx1 или одновременно Stx1 и Stx2 [3]. Данные белки имеют структуру АВ5 и состоят из одной ферментативно-активной субъединицы А (32 kDa), связанной с пентамером субъединиц В (8 kDa). Шига-токсины вырабатываются во время колонизации бактериями *E. coli* слизистой оболочки кишечника, где проникают в кровоток [11]. Защитный иммунитет к инфекции STEC, вероятно, обеспечивается антителами, которые ингибируют колонизацию кишечника, и антителами, которые нейтрализуют Stx [9].

«Золотым» стандартом диагностики энтерогеморрагического эшерихиоза является микробиологический высев чистой культуры шига-токсин продуцирующего штамма *E. coli*. Однако в связи с широким использованием антибиотиков, а также с поздним поступлением в ряде случаев больного в стационар это не всегда осуществимо. Еще одним подходом к диагностике является использование метода амплификации нуклеиновых кислот для выявления генетических маркеров энтерогеморрагических *E. coli* (ЕНЕС) O157, *stx1*, *stx2*, *eae*. В результате STEC-инфекции в организме формируются антитела, которые можно выявить в ИФА или иммуноблоте.

Цель настоящего исследования — провести микробиологические, иммунологические исследования и ПЦР-анализ клинического материала, выделенного от больных детей с ГУС, развившемся на фоне острой кишечной инфекции (ОКИ), для обнаружения шига-токсин продуцирующего штамма *Escherichia coli*, антител к Stx2 и/или генов *stx2*.

Материалы и методы

Исследуемые образцы. Клинический материал был получен от 30 пациентов в возрасте от 8 месяцев до 5 лет с типичными симптомами ГУС, в острой фазе кишечной инфекции. У всех пациентов ГУС развился после гастроэнтерита с продромальным периодом диареи в среднем 7,5 дней. Образцы клинического материала (фекалии, сыворотка крови) были получены в педиатрическом отделении интенсивной терапии города Москвы (ГБУЗ «Детская городская клиническая больница святого Владимира») в 2023 г. В качестве контроля использовали образцы сыворотки 20 здоровых доноров без признаков инфекционного заболевания или

симптомов желудочно-кишечных расстройств, по крайней мере, в течение предшествующих 30 дней. До проведения экспериментов образцы сохранялись в условиях низкотемпературной заморозки (–68...–70°C). Родители дали информированное согласие на участие своих детей в исследовании.

Рекомбинантные субъединицы А и В шига-токсина 2 типа (Stx2А и Stx2В) были получены ранее в нашей лаборатории [2].

Иммуноблоттинг. Для постановки иммуноблоттинга (ИБ) проводили электрофорез рекомбинантных субъединиц шига-токсина 2 типа в 15% полиакриламидном геле по методу Леммли, на дорожку вносили 3 мкг/лунку каждого белка в невозстанавливающих условиях. Переносили гель на нитроцеллюлозную мембрану с помощью полуэлектридной ячейки для переноса TransBlot SD SemiDry (Bio-Rad) по стандартному протоколу. После блокировки мембран в 1% молоке, инкубировали их с сыворотками в разведении 1:200 в течение 2 ч. В качестве положительного контроля использовали ПАТ против А- и В-субъединицы шига-токсина 2 типа; отрицательным контролем выступала сыворотка здорового человека. Второе антитело для детекции поликлональных антител было козым антимышиным, связанным с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США), и использовалось в разведении 1:5000, во всех остальных случаях — козым против гамма-цепи иммуноглобулина G человека, связанным с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США), и использовалось в разведении 1:5000. Для визуализации использовали в качестве субстрата 3,3-диаминобензидин тетрагидрохлорид (ДАБ, Sigma).

Иммуноферментный анализ. Для тестирования использовали 96-луночные планшеты (Costar, США), сенсibilизированные рекомбинантными белками Stx2А и Stx2В в концентрации 10 мкг/мл. Для анализа использовали двукратные разведения образцов сыворотки в диапазоне от 1:20 до 1:2560. В качестве отрицательного контроля были взяты сыворотки крови здоровых доноров. В рабочем разведении применяли конъюгат человеческих иммуноглобулинов с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США). Реакцию проявляли раствором субстрата — 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ, Sigma). Оптическую плотность измеряли на фотометре Multiskan (Labsystems, США) при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀). Каждый образец сыворотки тестировали минимум дважды и определяли среднюю ОП.

Микробиологический анализ. Бактериологическое исследование образцов проводили с использованием среды обогащения (бульон, Мак-Конки) с последующим высевом на содержащие сорбитол среды.

ПЦР-анализ. Идентификацию генов *stx2* осуществляли в соответствии с методиками референс-лаборатории Европейского Союза (EU-RL VTEC_Method_02_Rev 0 и EU-RL VTEC_Method_006_Rev 1, EU Reference Laboratory VTEC, Рим, Италия).

Статистический анализ. В ходе обработки результатов, полученных методом ИФА, определяли пороговое значение для данных с учетом максимальной чувствительности и специфичности, а также с использованием кривой рабочей характеристики приемника (ROC).

Результаты и обсуждение

ПЦР-анализ испражнений, выделенных у детей с типичными симптомами ГУС, в острой фазе кишечной инфекции, позволил выявить гены *stx2* в 23,3% случаев. Бактериологические

исследования позволили высеять чистую культуру *E. coli* O157:H7 только в 1 образце (3,3%). Данные результаты могут быть обусловлены, прежде всего, активной антибиотикотерапией, приводящей к быстрому уничтожению патогена и выведению его из организма.

Результаты иммуноблота выявили наличие антител одновременно к обеим субъединицам шига-токина 2 в сыворотке крови у 66,7% пациентов с ГУС. Однако у 20% здоровых доноров также были выявлены антитела одновременно к обеим субъединицам шига-токина 2. В 100% случаев у больных были обнаружены антитела к субъединице А и у 50% здоровых доноров были обнаружены антитела к А-субъединице Stx2. Антитела, реагирующие только с субъединицей В (без наличия антител к А субъединице), не были обнаружены в сыворотках крови доноров. Репрезентативный ответ IgG на Stx2, обнаруженный с помощью ИБ в сыворотке пациентов с ГУС и доноров контрольной группы, показан на рис. 1.

Шестнадцать пациентов с ГУС (53,3%), у которых по данным ИБ были обнаружены антитела к субъединицам А или АВ, также были положительными в ИФА. У 7 здоровых доноров (35%), у которых по данным ИБ были выявлены IgG к субъединицам А или АВ Stx2, были положительными и по данным ИФА. Сравнение данных оптической плотности, полученных в результате ИФА с сыворотками крови к Stx2A и Stx2B у пациентов с ГУС и здоровых доноров представлены на рис. 2.

По данным ИФА у 60% пациентов с типичными симптомами ГУС, в острой фазе кишечной инфекции, были выявлены антитела к А-субъединице Stx2. Среди здоровых доноров антитела к Stx2 А-субъединице были обнаружены у 35% исследуемых, уровень оптической плотности не превышал значения 2,2. В группе больных показатели оптической плотности колебались в районе 2,3–3, то есть титры антител к Stx2 А-субъединице были выше. В 43,3% случаев у больных в сыворотке крови были выявлены титры к субъединице В Stx2 и только в 10% — у здоровых доноров с низким уровнем оптической плотности детектировались антитела к субъединице В Stx2. Среднее значение ОП было в группе больных составило 1,80 для Stx2A и 1,51 — для Stx2B, в группе контроля 1,091 для Stx2A и 0,65 для Stx2B.

Наличие антител к Stx снижают риск ГУС. Подтверждением того, что эти антитела к Stx играют роль в защитном иммунитете, основано на экспериментальных и клинических данных [9]. Ряд исследований выявили увеличение вероятности обнаружения антител к Stx у людей старшего возраста, которые устойчивы к ГУС-индуцирующим эшерихиозам [5, 9]. Кроме того,

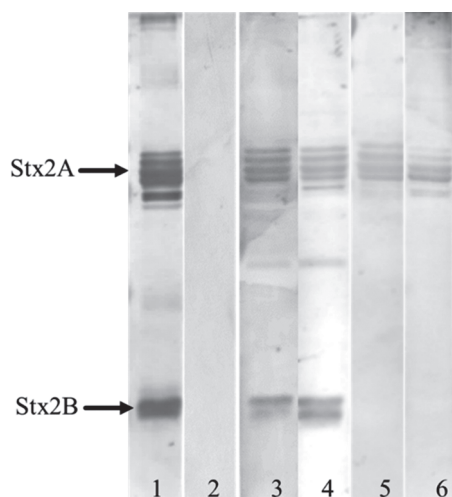


Рисунок 1. Примеры результатов выявления методом иммуноблот-анализа IgG антител к Stx2A и Stx2B в сыворотках крови больных с типичными симптомами ГУС, в острой фазе кишечной инфекции

Figure 1. Examples of the results of detection of IgG antibodies to Stx2A and Stx2B by immunoblot analysis in the blood sera of patients with typical symptoms of HUS, in the acute phase of intestinal infection

Примечание. Дорожка 1 — положительный контроль, мышиные поликлональные антитела; дорожка 2 — отрицательный контроль — здоровый донор; дорожки 3–6 — больные с типичными симптомами ГУС, в острой фазе кишечной инфекции (образцы № 2, 3, 19, 30 соответственно; данные по другим образцам не представлены)

Note. Lane 1 — positive control, mouse polyclonal antibodies; lane 2 — negative control — healthy donor; lanes 3–6 — patients with typical symptoms of HUS, in the acute phase of intestinal infection (samples No. 2, 3, 19, 30, respectively; data on other samples are not presented)

иммунизация лабораторных животных субъединицей В Stx и слитыми белками индуцирует нейтрализующие антитела, которые защищают мышей от заражения *E. coli* O157:H7 или токсинов [7].

Несмотря на высокую частоту выявления антител IgG против Stx2 среди здоровых доноров в настоящем исследовании, мы заметили, что среднее значение оптической плотности, полученное с помощью ИФА, было выше у больных доноров. Наличие антител к Stx2 у некоторых здоровых доноров указывает на его недавний контакт с патогенными *E. coli*, но благодаря иммунологической памяти развития инфекционного процесса не произошло. Наличие антител IgG к Stx2, среди здоровых доноров может быть обусловлено предшествующей инфекцией других шигатоксин-продуцирующих патогенов [1]. Высокие титры антител (увеличение оптической плотности в ИФА) у больных отражают развитие инфекционного процесса и формирование защитного иммунного ответа.

Сравнение информативности ПЦР-анализа и бактериологического, а также иммунологических исследований представлены в табл.

Таким образом, мы провели микробиологические, иммунологические исследования и ПЦР-анализ клинического материала, выделенного от детей больных ОКИ с ГУС, для обнаружения шига-токсин продуцирующего штамма *Escherichia coli*, антител к Stx2 и/или генов *stx2*. В результате постановки ИБ и проведения ИФА были выявлены антитела IgG к Stx2 в сыворотках детей больных острой кишечной инфекцией с ГУС. В настоящем исследовании было показано, что у всех больных детей к 7–8 дню от начала заболевания выявлялись антитела IgG к субъединице А Stx2. Антитела сывороток пациентов с ГУС и доноров из контрольной группы реагировали преимущественно с субъединицей А Stx2. При этом было также обнаружено, что в сыворотке крови могут находиться антитела только к субъединице А Stx2 или к обеим субъединицам (А и В) Stx2 одновременно, но не было выявлено ни одной сыворотки в которой содержались бы только антитела к субъединице В Stx2. Это позволяет предположить более важную роль антител к субъединице А Stx2 в формировании протективного иммунитета против STEC-инфекций.

Между результатами ИБ и ИФА наблюдалась средняя корреляция (0,53) по шкале Чеддока. Иммуноблот является более чувствительной реакцией по сравнению с ИФА, однако наличие иммунной прослойки людей затрудняет постановку диагноза STEC-инфекции на основании данных ИБ.

ГУС формируется как осложнение острой кишечной инфекции и, как правило, к моменту

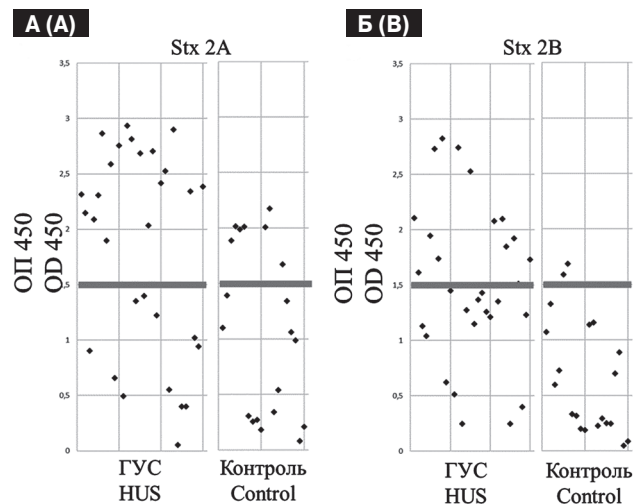


Рисунок 2. Значения оптической плотности, отражающие наличие и уровень IgG к субъединицам Stx2 у больных с типичными симптомами ГУС, в острой фазе кишечной инфекции

Figure 2. Optical density values reflecting the presence and level of IgG to Stx2 subunits in patients with typical symptoms of HUS in the acute phase of intestinal infection

Примечание. Сравнение данных оптической плотности, полученных в результате ИФА с сыворотками крови к Stx2A (А) и Stx2B (Б) у пациентов с ГУС и здоровых доноров (контроль). Значения оптической плотности, представляющие уровень IgG против Stx2, показаны индивидуально и соответствуют средней ОП двух независимых анализов, выполненных в двух лунках. Горизонтальная линия (ОП = 1,498) представляет пороговое значение, определенное с помощью кривой ошибок.

Note. Comparison of optical density data obtained as a result of ELISA with blood sera to Stx2A (A) and Stx2B (B) in patients with HUS and healthy donors (control). Optical density values representing anti-Stx2 IgG levels are shown individually and correspond to the average OD of two independent assays performed in two wells. The horizontal line (OP = 1.498) represents the threshold value determined using the error curve.

поступления пациента в отделение интенсивной терапии уже ведется активное лечение антибиотиками. В связи с этим бактериологические высеив из клинического материала для получения чистой культуры патогена малоэффективны. То же самое относится к эффективности применения ПЦР-анализа для подтверждения STEC-инфекции, который также на 7–8 день от начала проявления острого кишечного заболевания становится малоинформативным. Для подтверждения диагноза STEC-инфекции, важно проводить комплексный анализ, в том числе с использованием иммунологических методов, которые могут способствовать выявлению причины заболевания при отсутствии бактерий и/или генов патогенных микроорганизмов в клиническом материале.

Таблица. Сравнение информативности методов исследований для подтверждения STEC-инфекции у пациентов с острой кишечной инфекцией (ОКИ) на стадии развития ГУС

Table. Comparison of the information content of research methods for confirming STEC infection in patients with acute intestinal infection (AIE) at the stage of HUS development

Выявление Identification	Метод исследования Research method	Больные ГУС Patients with HUS	Здоровые Healthy
IgG к Stx2A IgG to Stx2A	ИБ WB		
IgG к Stx2B IgG to Stx2B	ИФА ELISA		
<i>E. coli</i> O157:H7	Микробиологические исследования Microbiological studies		
Ген stx2 stx2 gene	ПЦР PCR		

Примечание. ■ — процент положительных результатов; □ — процент отрицательных результатов.
 Note. ■ — percentage of positive results; □ — percentage of negative results.

Заключение

Представлены результаты исследования клинических образцов на наличие маркеров STEC-штаммов. Иммунологические анализы, направленные на выявление специфических антител к Stx2, являются высокоинформативными для подтверждения диагноза у пациентов с острой кишечной инфекцией на стадии развития ГУС. Иммуноблот-анализ характеризовался более высокой чувствительностью для выявления антител к Stx2, однако в связи с наличием иммунологической прослойки среди

здоровых людей предпочтительно использовать ИФА-анализ. У здоровых доноров при наличии антител к Stx2 титр антител был достоверно ниже, чем у больных.

Лабораторное подтверждение диагноза STEC-инфекции затруднено при проведении микробиологических и молекулярно-генетических исследований, что подтверждается в данной работе. Расширить эффективность лабораторной диагностики может постановка ИФА, направленного на выявление антител к Stx2A.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Малов В.А., Малеев В.В., Козловская Н.Л., Цветкова Н.А., Сметанина С.В., Горобченко А.Н., Серова В.В., Ченцов В.Б., Волков А.Г., Фаллер А.П. Трудности диагностики гемолитико-уремического синдрома, ассоциированного с диареей, у взрослых // Терапевтический архив. 2017. Т. 89, № 11. С. 69–78. [Malov V.A., Maleev V.V., Kozlovskaya N.L., Tsvetkova N.A., Smetanina S.V., Gorobchenko A.N., Serova V.V., Chentsov V.B., Volkov A.G., Faller A.P. Difficulties in the diagnosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in adults. *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic Archive*, 2017, vol. 89, no. 11, pp. 69–78 (In Russ.)] doi: 10.17116/terarkh2017891169-78
2. Шкуратова М.А., Марьин М.А., Рогозин М.М., Сурин А.К., Коломбет Л.В., Фирстова В.В. Получение и масс-спектрометрическая характеристика рекомбинантных субъединиц шига-токсинов первого и второго типов (Stx1

- и Stx2) *Escherichia coli* // Бактериология. 2021. Т. 6, № 4. С. 30–38. [Shkuratova M.A., Maryin M.A., Rogozin M.M., Surin A.K., Kolombet L.V., Firstova V.V. Preparation and mass-spectrometric characteristics of recombinant shiga-toxin units of the first and second types (Stx1 and Stx2) *Escherichia coli*. *Bacteriologiya = Bacteriology*, 2021. vol. 6, no. 4, pp. 30–38. (In Russ.)] doi: 10.20953/2500-1027-2021-4-30-38
3. Эмирова Х.М., Толстова Е.М., Каган М.Ю., Орлова О.М., Абасеева Т.Ю., Панкратенко Т.Е., Шпикалова И.Ю. Гемолитико-уремический синдром, ассоциированный с шига-токсин-продуцирующей *Escherichia coli* // Нефрология. 2016. Т. 20, № 2. С. 18–32. [Emirova Kh., Tolstova E.M., Kagan O.M., Orlova M.Yu., Abaseeva T., Pancratenko T.E., Shpikalova I.Yu. Hemolytic uremic syndrome associated with shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Nefrologiya = Nephrology (Saint-Petersburg)*, 2016, vol. 20, no. 2, pp. 18–32. (In Russ.)]
 4. Ariceta G. Hemolytic uremic syndrome. *Curr. Treat. Options Pediatr.*, 2020, vol. 6, no. 4, pp. 252–262. doi: 10.1007/s40746-020-00216-1
 5. Barrett T.J., Green J.H., Griffin P.M., Pavia A.T., Ostroff S.M., Wachsmuth L.K. Enzyme linked immunosorbent assays for detecting antibodies to Shiga-like toxin I, Shiga-like toxin II, and *Escherichia coli* O157:H7 lipopolysaccharide in human serum. *Curr. Microbiol.*, 1991, vol. 23, pp. 189–195. doi: 10.1007/BF02092278
 6. Bruyand M., Mariani-Kurkdjian P., Le Hello S., King L.A., Van Cauteren D., Lefevre S., Gouali M., Jourdan-da Silva N., Mailles A., Donguy M.P., Loukiadis E., Sergentet-Thevenot D., Loirat C., Bonacorsi S., Weill F.X., De Valk H.; Réseau Français Hospitalier de Surveillance du Shu Pédiatrique. Paediatric haemolytic uraemic syndrome related to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, an overview of 10 years of surveillance in France, 2007 to 2016. *Euro Surveill.*, 2019, vol. 24, no. 8: 1800068. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.8.1800068
 7. Cai K., Gao X., Li T., Wang Q., Hou X., Tu W., Xiao L., Tian M., Liu Y., Wang H. Enhanced immunogenicity of a novel Stx2Am-Stx1B fusion protein in a mice model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine*, 2010, vol. 29, no. 5, pp. 946–952. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.11.035
 8. Joseph A., Cointe A., Mariani Kurkdjian P., Rafat C., Hertig A. Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. *Toxins (Basel)*, 2020, vol. 12, no. 2, pp. 67. doi: 10.3390/toxins12020067
 9. Karmali M.A., Mascarenhas M., Petric M., Dutil L., Rahn K., Ludwig K., Arbus G.S., Michel P., Sherman P.M., Wilson J., Johnson R., Kaper J.B. Age-specific frequencies of antibodies to *Escherichia coli* verocytotoxins (Shiga toxins) 1 and 2 among urban and rural populations in southern Ontario. *J. Infect. Dis.*, 2003, vol. 188, no. 11, pp. 1724–1729. doi: 10.1086/379726
 10. Majowicz S.E., Scallan E., Jones-Bitton A., Sargeant J.M., Stapleton J., Angulo F.J., Yeung D.H., Kirk M.D. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2014, vol. 11, no. 6, pp. 447–455. doi: 10.1089/fpd.2013.1704
 11. O'Brien A.D., Tesh V.L., Donohue-Rolfé A., Jackson M.P., Olsnes S., Sandvig K., Lindberg A.A., Keusch G.T. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1992, vol. 180, pp. 65–94. doi: 10.1007/978-3-642-77238-2_4

Авторы:

Шкуратова М.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;
Хлынцева А.Е., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;
Калмантаева О.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;
Карцев Н.Н., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;
Музуров А.Л., к.м.н., зав. отделением Центра гравитационной хирургии крови и гемодиализа ГБУЗ Детская городская клиническая больница святого Владимира Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия; доцент кафедры анестезиологии, реаниматологии и токсикологии детского возраста ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия;
Фирстова В.В., д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия.

Authors:

Shkuratova M.A., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;
Khlyntseva A.E., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;
Kalmantaeva O.V., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;
Kartsev N.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Antimicrobial Agents Laboratory, Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;
Muzurov A.L., PhD (Medicine), Head of Department of Center of Gravitational Blood Surgery and Hemodialysis, Moscow Clinical Municipal St. Vladimir Children Hospital, Moscow, Russian Federation; Associate Professor, Department of Pediatric Anesthesiology, Critical Care Medicine and Toxicology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russian Federation;
Firstova V.V., DSc (Biology), Head Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 01.04.2024
 Отправлена на доработку 03.04.2024
 Принята к печати 06.04.2024

Received 01.04.2024
 Revision received 03.04.2024
 Accepted 06.04.2024

ЭФФЕКТ ВВЕДЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ БАКТЕРИИ *AKKERMANSIA MUCINIPHILA* В НОРМЕ И ПРИ DSS-ИНДУЦИРОВАННОМ ВОСПАЛЕНИИ У МЫШЕЙ

А.Д. Шейнова^{1,2}, О.А. Подосокорская³, Е.О. Губернаторова⁴

¹ ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

⁴ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва, Россия

Резюме. *Akkermansia muciniphila* — грамтрицательная анаэробная бактерия, компонент нормальной кишечной микробиоты человека. Снижение представленности этой бактерии связывают с развитием метаболических нарушений, воспаления кишечника и колоректального рака. Так, пробиотик с *A. muciniphila* одобрен к применению для больных диабетом и ожирением. В последние годы появляются работы, посвященные роли этой бактерии в контроле воспаления кишечника и колоректального рака. Точные механизмы действия *A. muciniphila* остаются не установленными, так, применение различных протоколов введения бактерии показывает разные результаты в мышиных моделях. Ранее мы показали, что *A. muciniphila* по-разному влияет на продукцию муцинов в кишечнике в зависимости от формы перорально вводимой бактерии — живой или пастеризованной. В настоящей работе мы решили выяснить, как доза вводимой бактерии повлияет на чувствительность мышей к индукции острого воспаления кишечника. Для этого мышам дикого типа ежедневно в течение двух недель с помощью зонда вводили в желудок живую *A. muciniphila* в количестве 10^8 CFU или 10^9 CFU. Контрольной группе вводили PBS. После этого у части животных извлекали толстый кишечник и определяли экспрессию генов, связанных с поддержанием гомеостаза в кишечнике, а часть животных подвергали индукции острого колита с добавлением 7% DSS в питьевую воду в течение пяти дней с последующей морфометрической оценкой. Было установлено, что мыши, получавшие высокую дозу *A. muciniphila*, защищены от развития тяжелого колита. При этом RT-PCR анализ на тканях толстого кишечника мышей, получавших высокую дозу бактерии, показал увеличение экспрессии генов, ответственных за поддержание гомеостаза, в частности, антимикробных пептидов, а также IL-17A и IL-17F. Повышение экспрессии молекул, усиливающих барьерные функции кишечника, может сдерживать проникновение микробиоты вглубь тканей и, таким образом, способствовать снижению воспаления при остром колите. Интересно также, что защитный эффект бактерии наблюдался только при введении высокой, но не низкой дозы *A. muciniphila*. Полученные

Адрес для переписки:

Шейнова Анна Дмитриевна
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32,
ФГБУН Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта РАН.
Тел.: 8 (499) 135-23-11. Факс: 8 (499) 135-14-05.
E-mail: isinfo@eimb.ru

Contacts:

Anna D. Sheynova
119991, Russian Federation, Moscow, Vavilova str., 32,
V. Engelhardt Institute of Molecular Biology.
Phone: +7 (499) 135-23-11. Fax: +7 (499) 135-14-05.
E-mail: isinfo@eimb.ru

Для цитирования:

Шейнова А.Д., Подосокорская О.А., Губернаторова Е.О. Эффект введения пробиотической бактерии *Akkermansia muciniphila* в норме и при DSS-индуцированном воспалении у мышей // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 564–568. doi: 10.15789/2220-7619-TEO-16882

Citation:

Sheynova A.D., Podosokorskaya O.A., Gubernatorova E.O. The effect of the probiotic bacteria *Akkermansia muciniphila* in intestinal homeostasis and dss-induced inflammation in mice // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 564–568. doi: 10.15789/2220-7619-TEO-16882

Работа выполнена при финансовой поддержке Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (Соглашение № 075-15-2019-1660).

The study was financially supported by the Centre for High Precision Editing and Genetic Technologies for Biomedicine (Agreement No. 075-15-2019-1660).

© Шейнова А.Д., Подосокорская О.А., Губернаторова Е.О., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-TEO-16882>

результаты свидетельствуют в пользу защитного эффекта *A. muciniphila* при воспалении кишечника и подчеркивают важность подбора дозы бактерии для корректной интерпретации данных опытов на мышах с экспериментально индуцированными заболеваниями.

Ключевые слова: *Akkermansia muciniphila*, микробиота, воспаление кишечника, DSS колит, пробиотик, анимикробные пептиды.

THE EFFECT OF THE PROBIOTIC BACTERIA *AKKERMANSIA MUCINIPHILA* IN INTESTINAL HOMEOSTASIS AND DSS-INDUCED INFLAMMATION IN MICE

Sheynova A.D.^{a,b}, Podosokorskaya O.A.^c, Gubernatorova E.O.^d

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Moscow, Russian Federation

Abstract. *Akkermansia muciniphila* is a Gram-negative anaerobic bacterium, a component of the normal human intestinal microbiota. A decrease in the presence of this bacterium is associated with pathologies, including metabolic disorders, intestinal inflammation and colorectal cancer. *A. muciniphila* is a probiotic approved for patients with diabetes and obesity. In recent years, *A. muciniphila* was studied in the control of intestinal inflammation and colorectal cancer. The exact mechanisms of *A. muciniphila* action remain unclear, while the use of different administration protocols shows different effects in mouse models of colitis and colorectal cancer. We reported that *A. muciniphila* has distinct effects on intestinal mucin production depending on viable or pasteurized form of bacteria. Another factor affecting the outcome of the *A. muciniphila* administration is the number of bacteria. To address how the dose of bacteria may affect the severity of acute intestinal inflammation wild-type mice were subjected to daily oral injections with 10^8 CFU or 10^9 CFU of viable *A. muciniphila* for two weeks; the control group was injected with PBS. After that, groups were subjected to the induction of acute colitis by adding 7% DSS to drinking water for five days. 8 days after the onset of colitis induction, a morphometric assessment of the colitis severity was performed. Mice given a high dose of *A. muciniphila* (10^9 CFU) were found to be protected from developing severe colitis. RT-PCR analysis of colon samples from mice receiving a high dose of bacteria showed an increase in the gene expression of antimicrobial peptides, IL-17A, IL-17F. Interestingly, the protective effect of *A. muciniphila* was observed only in a high dose group, but not in a low dose group. Our data suggest that *A. muciniphila* provides the protective effect in colitis and highlight the importance of selecting the dose of the bacterium for proper interpretation.

Key words: *Akkermansia muciniphila*, microbiota, inflammatory bowel disease, DSS colitis, probiotic, antimicrobial peptides.

Введение

Akkermansia muciniphila — грамотрицательная, анаэробная бактерия, входящая в состав комменсальной микробиоты кишечника, использует муцин в качестве источника углерода и азота. Известно, что *A. muciniphila* оказывает иммуномодулирующее воздействие в кишечнике. Так, показано, что *A. muciniphila* увеличивает экспрессию белков плотных контактов в ответ на нарушение целостности эпителия, увеличивает пролиферацию стволовых клеток кишечных крипт, дифференцировку клеток Панета и бокаловидных клеток, что приводит к повышенной продукции слизи [6].

В последние годы появляется все больше данных о защитной роли *A. muciniphila* при нарушении обмена веществ, а также злокачественных новообразованиях, что делает эту бактерию перспективной для использования в качестве пробиотика. Однако на данный момент существуют разногласия относительно влияния *A. muciniphila* на воспалительные заболевания кишечника. Было установлено, что пероральное введение данного микроорганизма как в низких, так и в высоких дозах снижало тяжесть колита [1,

5, 7]. В работе Siwen Qu и соавт., 2021 введение *A. muciniphila* уменьшало инфильтрацию воспалительных клеток и увеличивало количество бокаловидных клеток и экспрессию *Muc2* и *Muc3* [5]. Rui Zhai и соавт., 2021 сообщали о защитной роли *A. muciniphila* в модели колита, индуцированного DSS, их данные свидетельствуют о снижении уровня провоспалительных цитокинов, таких как TNF, IL-6 и IL-1 β в толстом кишечнике у мышей, принимавших *A. muciniphila* [9]. Однако в ряде других работ *A. muciniphila* усугубляла симптомы колита. Например, Chil-sung Kang и соавт., 2013 объясняют более тяжелое течение колита при приеме *A. muciniphila* нарушением кишечного барьера вследствие ускоренного обновления слоя слизи, при этом микробиота приобретает возможность проникать вглубь тканей кишечника и провоцировать воспаление [3].

Ранее мы показали, что *A. muciniphila* по-разному влияет на продукцию муцинов в кишечнике в зависимости от формы перорально вводимой бактерии — живой или пастеризованной [2]. Анализ экспериментальных протоколов приведенных работ позволяет сделать предположение, что еще одним фактором, потенциально влияющим на результат введения, является количество

вводимой бактерии — введение *A. muciniphila* в высоких и низких концентрациях может по-разному воздействовать на барьерные функции кишечника и либо усугублять воспаление, либо ослаблять его. В нашем исследовании мы изучали влияние высоких и низких доз *A. muciniphila* как на наивных мышах, с целью выявить механизмы, при помощи которых данный микроорганизм способен влиять на иммунную систему кишечника в качестве пробиотика, так и в модели острого DSS-индуцированного колита.

Материалы и методы

Животные. Мышей линии C57BL/6 в возрасте 6–9 недель содержали на базе Автономного экспериментально-биологического комплекса для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1660). Все манипуляции с животными были выполнены в соответствии с протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике ИМБ РАН (Протокол № 3 от 27.10.2022).

Введение *A. muciniphila*. *A. muciniphila* выращивали в анаэробных условиях на среде с добавлением свиного муцина («Sigma») и гемина («Sigma»). Бактериальный раствор собирали в концентрации $7-8 \times 10^9$ CFU/мл, делили на аликвоты по 1 мл и замораживали при -80°C . Мышей C57BL/6 случайным образом разделяли на три группы по 12 особей, а затем ежедневно перорально вводили PBS, 10^8 CFU *A. muciniphila* или 10^9 CFU *A. muciniphila* в течение 2-х недель. На 14-й день каждую группу делили на две равные подгруппы, состоящие из 6 мышей. Одну подгруппу терминировали на 14-й день, а остальным мышам индуцировали острый колит.

Процессирование кишечника. Группа, получавшая *A. muciniphila* в течение двух недель, была умерщвлена на 14-й день с помощью шейной дислокации. Далее проводили вскрытие брюшной полости и выделяли комплекс, включавший в себя толстый кишечник и слепую кишку. Толстый кишечник и слепую кишку по отдельности промывали PBS с помощью гаважной иглы, а затем отрезали тонкую полоску ткани из каждого отдела для последующего выделения РНК.

Модель острого DSS-индуцированного колита. Индукцию острого колита у мышей осуществляли путем замены питьевой воды на 7% раствор DSS (Thermo Scientific™ Dextran Sulfate Sodium Salt, 40–50 kDa) на пятидневный срок, после чего мышам возвращали питьевую воду на три дня.

На пике заболевания на 8 день мышей умерщвляли, извлекали комплекс, состоящий из толстого кишечника и слепой кишки, а также селезенку и переносили в 6-луночный планшет с раствором PBS на лед. Селезенки взвешивали. Комплекс толстого кишечника и слепой кишки подвергали морфометрической оценке и фотографировали.

Макроскопическая оценка тяжести заболевания. В ходе проведения морфометрической оценки измеряли следующие параметры: длину толстого отдела кишечника, длину слепой кишки и тяжесть индуцированного колита. Тяжесть индуцированного колита оценивали в условных единицах измерения по шкале от 0 до 13, согласно которой 0 баллов присваивали животному без видимых признаков заболевания, а 13 — мышам с наиболее высокой степенью повреждения кишечника. Данное значение включало в себя сумму трех параметров: выраженности ректального кровотечения, также консистенции и структурированности фекалий, а также оценку максимальной потери веса.

Измерение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени. Анализ экспрессии генов проводили для групп, получавших PBS и *A. muciniphila*

Таблица. Последовательности праймеров, использованных для qRT-PCR анализа

Table. Sequences of primers used for qRT-PCR analysis

Ген Gene	Прямая последовательность Forward primer sequence	Обратная последовательность Reverse primer sequence
Actb	CTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTG	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
Muc1	TCGTCTATTTCTTGCCCTG	ATTACCTGCCGAAACCTCCT
Muc2	CCCAGAAGGGACTGTGTATG	TTGTGTTCGCTCTTGGTCAG
Muc3	TGGTCAACTGCGAGAATGGA	TACGCTCTCCACCAGTTTCT
Muc4	GTCTCCCATCACGGTTTCACT	TGTCATTCCACACTCCCAGA
IL-17a	GGACTCTCCACCGCAATGA	GGCACTGAGCTTCCCAGATC
IL-17f	CCTCCCCTGGAGGATAACAC	CATGGGGAAGTGGAGCGGTT
IL-22	TCCGAGGAGTCAGTGCTAAA	AGAACGTCTTCCAGGGTGAA
IL-23	CGGGACATATGAATCTACTAAGAG	GTGTCTCTTGTAGTCTTGTG
Reg3g	ATGGCTCCTATTGCTATGCC	GATGTCTGAGGGCCTCTT
Reg3b	ATGGCTCCTATTGCTATGCC	GATGTCTGAGGGCCTCTT
IL-22ra	GAAGGTCCGATTTCAAGTCCA	TGGTCAGGTCACAGAAGAGG
IL-10	CCAGTTTTACCTGGTAGAAGTATG	TGTCTAGGTCTGGAGTCCAGCAGACTCAA

в низкой и высокой концентрациях, у которых не был индуцирован острый колит. РНК образцов толстого кишечника и слепой кишки подвергали обратной транскрипции для синтеза кДНК с использованием набора для синтеза кДНК RevertAid First Strand (Thermo, США). Измерение экспрессии генов проводили с использованием qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Анализ экспрессии генов проводили с использованием Thermo Quant studio 6 и набора праймеров, представленных в табл.

Статистический анализ. Статическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 6.0 при помощи t-критерия Стьюдента, однопараметрического или двухпараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) для данных, соответствующих нормальному распределению. Для статистического анализа непараметрических данных в случае двух групп был использован тест Манна–Уитни, а при большем количестве групп — тест Краскела–Уолеса. Статистически достоверными считали различия между группами при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для того, чтобы выяснить, как доза вводимой бактерии влияет на чувствительность мышей к индукции острого воспаления кишечника, мышам дикого типа ежедневно в течение двух недель с помощью желудочного зонда вводили 10^8 CFU или 10^9 CFU живой *A. muciniphila*. Контрольной группе вводили PBS.

После этого часть животных подвергали индукции острого воспаления кишечника добавлением 7% DSS в питьевую воду в течение пяти дней, и через 8 дней после индукции колита проводили морфометрическую оценку тяжести развиваемого заболевания (рис. 1А, II обложка). Оценка тяжести индуцированного колита выявила разницу в восприимчивости к заболеванию у мышей из группы, получавших высокую дозу *A. muciniphila* (10^9 CFU), по сравнению с группой, получавшей низкую дозу (10^8 CFU), и с контрольной группой (PBS). Мыши, получавшие 10^8 CFU *A. muciniphila*, как и мыши из контрольной группы, демонстрировали ярко выраженное разжижение стула и ректальное кровотечение по сравнению с группой, получавшей 10^9 CFU *A. muciniphila* (рис. 1Б, В, II обложка). Морфометрия толстого отдела кишечника и слепой кишки также свидетельствуют о защитной роли высокой дозы *A. muciniphila*. Известно, что в модели острого колита длина как слепой кишки, так и тонкого и толстого отделов кишечника, уменьшается. Наши измерения показывают, что при приеме низкой дозы *A. muciniphila*, а также в контрольной группе, длина толстого отдела кишечника и слепой кишки значительно умень-

шалась по сравнению с группой, получавшей *A. muciniphila* в высокой дозе (рис. 1Д, Е, II обложка). Еще одним маркером системного воспаления в организме служит отношение массы селезенки к весу животного, однако значимых отличий при измерении этого параметра в трех группах мышей обнаружено не было (рис. 1Г, II обложка), что, вероятнее всего, связано с непродолжительностью действия DSS в выбранной модели. Таким образом, данные, полученные в ходе морфометрического анализа, свидетельствуют о том, что прием 10^9 CFU *A. muciniphila* оказывает защитное действие в модели острого DSS-индуцированного колита.

Результаты анализа экспрессии генов в толстом кишечнике в подгруппе наивных мышей, без индукции острого колита, также свидетельствуют о защитном эффекте высокой дозы *A. muciniphila*. Так как один из иммуномодулирующих механизмов *A. muciniphila* связан с дифференцировкой клеток Панета, нами были измерены уровни экспрессии антимикробных пептидов, продуцируемых главным образом этим типом клеток. Оказалось, что прием высокой дозы бактерии (10^9 CFU) способствовал выработке пептидов Reg3 γ и Reg3 β в толстой и слепой кишке (рис. 2А, III обложка). Еще один механизм, поддерживающий барьерные функции кишечника — выработка муцинов — также может подвергаться изменениям под действием муцинередукцирующей *A. muciniphila*. Нами было установлено, что при непродолжительном введении в течение двух недель *A. muciniphila* не изменяет достоверно уровень экспрессии основных муцинов в кишечнике (рис. 2Б, III обложка).

Результаты ряда исследований свидетельствуют о важной роли микробиоты в поддержании баланса в кишечнике между воспалением в ответ на патогенные сигналы и толерантностью к комменсальным микроорганизмам [4, 8]. Для определения влияния *A. muciniphila* на регуляцию воспаления нами был измерен уровень цитокинов, продуцируемых, преимущественно, ROR γ ⁺ клетками — IL-17А, IL-17F, IL-23 и IL-22 (рис. 2В, III обложка). Было показано, что уровень экспрессии генов *Il17a*, *Il17f*, но не *Il23* и *Tnf*, достоверно повышался у мышей, получавших *A. muciniphila* в высокой дозе по сравнению с контрольной группой и группой мышей, получавших *A. muciniphila* в низкой дозе. IL-17А необходим для индукции IL-22, который регулирует пролиферацию стволовых клеток эпителия кишечника, выработку слизи и антимикробных пептидов. Несмотря на то, что выявить достоверную разницу в относительной экспрессии *Il22* нам не удалось, на уровне тенденции количество *Il22* повышалось в группе, принимавшей *A. muciniphila* в высокой концентрации, по сравнению с остальными группами. В то же время

экспрессия гена *Il22ra2*, кодирующего белок-гомолог растворимого рецептора IL-22, повышалась в группе мышей, получавшей высокую дозу бактерии. Данный механизм, с одной стороны, может способствовать снижению доступного IL-22 в этой группе мышей, а с другой, дополнительно свидетельствовать о влиянии *A. muciniphila* на поддержание гомеостаза кишечника.

Заключение

На сегодняшний день в литературе отсутствует консенсус по поводу роли *A. muciniphila* в модели острого колита: одни работы демонстрируют защитную роль муцинредуцирующей *A. muciniphila*, в то время как другие показывают усугубление течения заболевания, опосредованное приемом этой бактерии. Полученные нами данные позволяют предположить, что пероральное введение *A. muciniphila* в высокой (10^9 CFU), но не в низ-

кой (10^8 CFU) дозе способно защищать мышей в модели острого DSS-индуцированного колита, влияя на повышение уровня экспрессии молекул, поддерживающих барьерную функцию кишечника. Таким образом, можно предположить, что снижение воспаления кишечника, опосредованное введением *A. muciniphila*, может способствовать защите от колоректального рака, ассоциированного с воспалением. Тем не менее точные механизмы действия *A. muciniphila* на иммунитет кишечника, в том числе, в контексте воспаления и колоректального рака только предстоит установить. Большинство работ, изучающих эффекты введения этой бактерии, сосредоточено на ее влиянии на барьерные функции кишечника, а также адаптивное звено иммунного ответа. Функции же *A. muciniphila* в модуляции миелоидного звена иммунного ответа, а также последствия этой модуляции в контексте воспаления кишечника только предстоит установить.

Список литературы/References

- Chen T., Wang R., Duan Z., Yuan X., Ding Y., Feng Z., Bu F., Liu L., Wang Q., Zhou J., Zhu L., Ni Q., Shi G., Chen Y. Akkermansia muciniphila Protects Against Psychological Disorder-Induced Gut Microbiota-Mediated Colonic Mucosal Barrier Damage and Aggravation of Colitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021, vol. 11: 723856. doi: 10.3389/fcimb.2021.723856]
- Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Bondareva M.A., Podosokorskaya O.A., Sheynova A.D., Yakovleva A.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Nedospasov S.A., Kruglov A.A., Drutskaya M.S. Akkermansia muciniphila — friend or foe in colorectal cancer? *Front. Immunol.*, 2023, vol. 14: 1303795. doi: 10.3389/fimmu.2023.1303795]
- Kang C.S., Ban M., Choi E.J., Moon H.G., Jeon J.S., Kim D.K., Park S.K., Jeon S.G., Roh T.Y., Myung S.J., Gho Y.S., Kim J.G., Kim Y.K. Extracellular vesicles derived from gut microbiota, especially Akkermansia muciniphila, protect the progression of dextran sulfate sodium-induced colitis. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 10: e76520. doi: 10.1371/journal.pone.0076520
- Kruglov A.A., Grivennikov S.I., Kuprash D.V., Winsauer C., Prepens S., Seleznik G.M., Eberl G., Littman D.R., Heikenwalder M., Tumanov A.V., Nedospasov S.A. Nonredundant function of soluble LTalpha3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science*, 2013, vol. 342, no. 6163, pp. 1243–1246. doi: 10.1126/science.1243364
- Qu S., Fan L., Qi Y., Xu C., Hu Y., Chen S., Liu W., Liu W., Si J. Akkermansia muciniphila Alleviates Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Acute Colitis by NLRP3 Activation. *Microbiol. Spectr.*, 2021, vol. 9, no. 2: e0073021. doi: 10.1128/Spectrum.00730-21
- Rodrigues V.F., Elias-Oliveira J., Pereira I.S., Pereira J.A., Barbosa S.C., Machado M.S. G., Carlos D. Akkermansia muciniphila and Gut Immune System: A Good Friendship That Attenuates Inflammatory Bowel Disease, Obesity, and Diabetes. *Front. Immunol.*, 2022, vol. 13: 934695. doi: 10.3389/fimmu.2022.934695
- Wang X., Lin S., Wang L., Cao Z., Zhang M., Zhang Y., Liu R., Liu J. Versatility of bacterial outer membrane vesicles in regulating intestinal homeostasis. *Sci. Adv.*, 2023, vol. 9, no. 11: eade5079 doi: 10.1126/sciadv.ade5079
- Wu H.J., Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*, 2012, vol. 3, no. 1, pp. 4–14. doi: 10.4161/gmic.19320
- Zhai R., Xue X., Zhang L., Yang X., Zhao L., Zhang C. Strain-Specific Anti-inflammatory Properties of Two Akkermansia muciniphila Strains on Chronic Colitis in Mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2019, vol. 9: 239. doi: 10.3389/fcimb.2019.00239

Авторы:

Шейнова А.Д., старший лаборант лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; студент магистратуры кафедры иммунологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Подосокорская О.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Губернаторова Е.О., к.б.н., старший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва, Россия.

Authors:

Sheynova A.D., Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation; Master's Student of the Department of Immunology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

Podosokorskaya O.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Extremophiles Metabolism Laboratory, Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

Gubernatorova E.O., PhD (Biology), Senior Researcher, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 03.04.2024
Принята к печати 04.04.2024

Received 03.04.2024
Accepted 04.04.2024

ИЗУЧЕНИЕ АДЬЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ БЕТА-ГЛЮКАНОВ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Е.А. Волосникова, Д.Н. Щербаков, Н.В. Волкова, Т.И. Есина, А.В. Зайковская,
Г.Г. Шими́на, Е.Д. Даниленко

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово, Россия

Резюме. Для увеличения эффективности и иммуногенности вакцин, особенно субъединичных, необходимо использование адъювантов. Полисахариды в силу своей безопасности и биосовместимости являются желательными кандидатами для создания вакцинных адъювантов. Наша работа посвящена разработке способа получения препарата бета-глюканов из клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и изучению их адъювантных свойств. Высокой чистоты полученного препарата и отсутствия токсичности удалось достичь, используя при очистке ферментные комплексы целлюлазы и протеазы в сочетании с обработкой ультразвуком с частотой 22 кГц. Разработанная схема позволяет получать препарат бета-глюканов с выходом до 2 г из 100 г биомассы влажных клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Для изучения адъювантных свойств бета-глюканов использовали 50 самцов мышей линии BALB/c массой 16–18 г. Иммунизацию проводили двукратно с интервалом 14 суток, внутримышечно по 200 мкл на животное. В качестве антигена для иммунизации использовали рекомбинантный белок RBD (рецептор-связывающий домен поверхностного S-белка коронавируса SARS-CoV-2, вариант (Wuhan-Hu-1) и B.1.617.2 (Delta)) в дозе 50 мкг на животное. Группе положительного контроля вводили антиген с гидроокисью алюминия. В качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым вводили физиологический раствор. Титры специфических антител в сыворотках крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием в качестве антигена рекомбинантного RBD поверхностного белка SARS-CoV-2 (вариант (Wuhan-Hu-1) и B.1.617.2 (Delta)) и рекомбинантного спайкового белка (вариант Wuhan-Hu-1, B.1.617.2 (Delta) и B.1.1.529 (Omicron)). Титр вируснейтрализующих антител определяли при помощи реакции вируснейтрализации с использованием штаммов вируса SARS-CoV-2: Wuhan-hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (WuhanHu-1), Delta-hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (Delta (B.1.617.2)) и Omicron 1-hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (Omicron (B.1.1.529)). В ходе работы показано, что бета-глюканы обладают способностью усиливать выработку специфических и вируснейтрализующих антител у мышей, иммунизированных RBD. Титры специфических и вируснейтрализующих антител сравнимы с их уровнем в группе, иммунизированной RBD с Al(OH)₃. В эксперименте на белых аутбредных мышах ICR показано, что препарат относится к практически нетоксичным веществам. Таким образом, можно заключить, что использование

Адрес для переписки:

Волосникова Екатерина Александровна
630559, Россия, НСО, р. п. Кольцово, ФБУН «Государственный
научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (383) 363-80-14. Факс: 8 (383) 363-80-16.
E-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru, kulenok84@mail.ru

Contacts:

Ekaterina A. Volosnikova
630559 Russian Federation, Koltsovo, Novosibirsk Region,
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector".
Phone: +7 (383) 363-80-14. Fax: +7 (383) 363-80-16.
Email: volosnikova_ea@vector.nsc.ru, kulenok84@mail.ru

Для цитирования:

Волосникова Е.А., Щербаков Д.Н., Волкова Н.В., Есина Т.И.,
Зайковская А.В., Шими́на Г.Г., Даниленко Е.Д. Изучение адъювантных
свойств бета-глюканов из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* //
Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 569–574. doi: 10.15789/2220-
7619-SOT-16685

Citation:

Volosnikova E.A., Shcherbakov D.N., Volkova N.V., Esina T.I.,
Zaikovskaya A.V., Shimina G.G., Danilenko E.D. Study of the adjuvant
properties of beta-Glucans from *Saccharomyces cerevisiae* yeast // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14,
no. 3, pp. 569–574. doi: 10.15789/2220-7619-SOT-16685

Работа выполнена в рамках Государственного задания, тема ГЗ-1/22 «Поиск и фармако-токсикологическое исследование новых вакцинных адъювантов».

The work was performed within the framework of the State task, theme GZ-1/22 "Search and pharmacotoxicological study of new vaccine adjuvants".

© Волосникова Е.А. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-SOT-16685>

бета-глюканов в качестве адъювантов может стать альтернативой адъювантам на основе солей алюминия, при этом бета-глюканы являются биосовместимыми, биodeградируемыми и нетоксичными веществами, а производство их не отличается трудоемкостью.

Ключевые слова: адъювант, бета-глюканы, белок S, иммунный ответ, мыши, иммунизация.

STUDY OF THE ADJUVANT PROPERTIES OF BETA-GLUCANS FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* YEAST

Volosnikova E.A., Shcherbakov D.N., Volkova N.V., Esina T.I., Zaikovskaya A.V., Shimina G.G., Danilenko E.D.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo, Russian Federation

Abstract. To increase the effectiveness and immunogenicity of modern vaccines, especially subunit ones, it is required to use adjuvants. Polysaccharides, due to their safety and biocompatibility, are desirable candidates for the creation of vaccine adjuvants. The aim of our study was to develop a method for obtaining beta-Glucans from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall, and evaluate their adjuvant properties. The high purity and non-toxicity of the resulting preparation was achieved by using enzyme complexes of cellulase and protease in combination with ultrasound (22 kHz) at the purification stage. The developed scheme allows for the yield of beta-Glucans up to 2 g from 100 g of the biomass of wet cells. The adjuvant properties of beta-Glucans were studied in 50 male BALB/c mice, weighing 16–18 g. Immunization was performed twice, with a 14-day interval, intramuscularly, 200 µl per animal. The recombinant receptor-binding domain (RBD) of the surface S protein of the SARS-CoV-2 virus (Wuhan-Hu-1 and B.1.617.2 (Delta)) was used as an antigen, at a dose of 50 µg per animal. A positive control group was administered with the antigen combined with aluminum hydroxide. As a negative control, mice injected with the saline solution were used. The titers of specific antibodies in the blood sera were determined by ELISA assays. RBD (Wuhan-Hu-1 and Delta), and S protein (Wuhan-Hu-1, Delta and Omicron) were used as antigens. The titers of virus-neutralizing antibodies were measured in neutralization tests using SARS-CoV-2 virus strains Wuhan-Hu-1, Delta (B.1.617.2) and Omicron (B.1.1.529). The results of the study have shown that beta-Glucans have the ability to enhance the production of specific and virus-neutralizing antibodies in mice immunized with RBD. The titers of specific and virus neutralizing antibodies are comparable to their levels in the group immunized with RBD and Al(OH)₃. It has been found in the experiments in white outbred ICR mice that the preparation belongs to practically non-toxic substances. Therefore, it can be concluded that the use of beta-Glucans could become a preferable alternative to the conventional adjuvants based on aluminum salts, being biocompatible, biodegradable and non-toxic substances of low labor-intensive production.

Key words: adjuvant, beta-Glucans, S protein, immune response, mice, immunization.

Введение

Субъединичные вакцины занимают важное место в системе современной вакцинопрофилактики. Обязательным компонентом таких вакцин, обеспечивающим повышение их иммуногенности, являются адъюванты. Классическими адъювантами, которые по-прежнему широко используются при разработке новых вакцин, являются адъюванты на основе солей алюминия. В то же время необходимость индукции, помимо гуморального, клеточного звена иммунитета, снижения побочных эффектов вакцин, заставляют искать другие варианты адъювантных систем.

Известно, что многие полисахариды, такие как альфа-, бета-глюканы, маннан и хитозан, обладают адъювантными свойствами [7, 6]. Адъюванты на основе полисахаридов совместимы с антигенами, полученными при помощи разных экспрессионных систем, безопасны, характеризуются минимальным риском образования токсических метаболитов, хорошо переносятся, кроме того, относительно легко нарабатываются в производственных масштабах [3].

Бета-глюканы — это группа полисахаридов, присутствующая во многих видах организмов, таких как грибы, дрожжи, овес, ячмень, морские водоросли, и обладающая разнообразной биологической активностью. При использовании бета-глюканов в качестве адъювантов было обнаружено, что в организме они распознаются целым рядом рецепторов, таких как дектин-1, рецептор комплемента 3 (CR3), CD5, лактозилцерамид и др. [8].

Цель данной работы заключалась в разработке способа получения бета-глюканов из клеточных стенок *Saccharomyces cerevisiae*, изучении их адъювантных и токсических свойств.

Материалы и методы

Получение бета-глюканов. Для получения препарата бета-глюканов использовали биомассу клеток *Saccharomyces cerevisiae* Y-448. Клетки подвергали механическому разрушению с помощью бус баллотини. Клеточный дебрис растворяли и подвергали ферментативному гидролизу, для чего к растворенному дебрису добавляли 40 г «Протосубтилин ГЗХ» и 3 мл «ЦеллоЛюксА» (ООО ПО «Сиббиофарм»), гид-

ролиз вели 15 часов при 60°C. Смесь охлаждали до температуры 20°C и центрифугировали (12 000g, 20 мин, 20°C). Осадок, содержащий целевой продукт бета-глюканов, отмывали 1%-ным раствором додецилсульфата натрия, деионизованной водой пятикратно и трижды подвергали воздействию ультразвука с частотой 22 кГц/с (5 мин). Далее проводили щелочной гидролиз и полупродукт отмывали деионизованной водой. Готовый продукт суспендировали в 50 мл деионизованной воды, разливали и сушили в термостате при 50°C.

Иммунизация животных. В качестве антигена для иммунизации использовали рекомбинантный белок RBD (рецептор-связывающий домен поверхностного S-белка коронавируса SARS-CoV-2, вариант B.1.617.2 (Delta)), полученный в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора с использованием клеток CHO-K1. Изучение адьювантных свойств проводили на самцах мышей линии BALB/c массой 16–18 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово Новосибирской области). Условия их содержания и проведения экспериментов были выполнены в соответствии с Федеральным законом «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» от 27.12.2018 № 498-ФЗ.

Первой группе животных внутримышечно, двукратно с интервалом 14 суток, вводили белок RBD, второй и третьей — RBD с препаратом бета-глюканов в дозе 1 мг или 50 мкг в объеме 0,2 мл на мышшь. В качестве положительного контроля использовали мышшь, которым по аналогичной схеме внутримышечно вводили белок RBD и гидроокись алюминия $Al(OH)_3$ в дозе 250 мкг. В качестве отрицательного контроля использовали мышшь, которым вводили 200 мкл физиологического раствора. Для определения титров специфических и вируснейтрализующих антител через 10 суток после второй иммунизации из ретроорбитального синуса отбирали образец крови, как описано в [1].

Анализ титров специфических антител. Титры специфических антител в сыворотках крови определяли методом иммуноферментного анализа. В качестве антигена использовали рекомбинантный RBD поверхностного белка SARS-CoV-2 (вариант (Wuhan-Hu-1) и B.1.617.2 (Delta)) и рекомбинантный спайковый белок (вариант (Wuhan-Hu-1), B.1.617.2 (Delta) и B.1.1.529 (Omicron)). Сорбцию антигенов (200 нг/лунку) проводили в буфере 0,1 М $NaHCO_3$. Для выявления антител использовали конъюгат антимышинных антител с пероксидазой хрена в рабочем разведении 1:2000 (SigmaAldrich, США). Для регистрации уровня оптической плотно-

сти после добавления субстрата и остановки реакции использовали мультимодальный ридер Thermo Scientific Varioskan LUX при длине волны 450 нм. Титр определяли по значению максимального разведения, при котором сигнал оптической плотности превышал значение оптической плотности лунок с отрицательным контролем более, чем в три раза.

Анализ титров вируснейтрализующих антител. Титры вируснейтрализующих антител определяли при помощи реакции вируснейтрализации. С этой целью были использованы штаммы вируса SARS-CoV-2 Wuhan-hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Wuhan-Hu-1), Delta-hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (Delta (B.1.617.2)) и Omicron 1-hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (Omicron (B.1.1.529)), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. К сывороткам в разных разведениях добавляли вирус в равной пропорции 1:1 и инкубировали 1 час при 37°C. Затем смесь вируса и сыворотки наносили в дублях на монослой культуры клеток Vero в объеме 100 мкл/лунку. Учет результатов проводили визуально. Любое специфическое поражение культуры клеток в лунке учитывали как цитопатическое действие (ЦПД). Титром считали последнее разведение, при котором регистрировали защиту монослоя культуры клеток в лунках от ЦПД вируса. В качестве положительного контроля использовали 20-кратное разведение образца сыворотки крови реконвалесцента COVID-19 с ранее установленным титром 1:80. В качестве отрицательного контроля использовали питательную среду.

Статистический анализ. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0, при этом $p < 0,05$ считали показателем статистической значимости. Статистическую значимость различий среди разных групп животных определяли с помощью двустороннего непараметрического U-критерия Манна-Уитни с 95% доверительным интервалом или критерия Краскела-Уоллиса (для более чем двух групп).

Метод определения параметров летальных доз. В эксперименте использовали 21 самца белых аутбредных мышшь ICR возрастом 7–8 недель, с массой тела 18–20 г. Исследование проводили экспресс-методом определения средней эффективной дозы и ее ошибки по методу Прозоровского [5]. Препарат вводили мышшам однократно внутрибрюшинно в дозах 2,0; 1,58; 1,26; 1,0; 0,79; 0,631; 0,51 мг/кг. В течение первых суток и один раз в день в течение 14 суток после введения проводили подсчет павших, животных взвешивали (весы электронные SCOUTII, OHAUS, США) и проводили клинический ос-

мотр. Клинический осмотр включал оценку следующих параметров: темперамент (вялость, агрессия), состояние шерстного покрова (выпадение, взъерошенность), состояние глаз (конъюнктивит, слезотечение, помутнение), мочеиспускание (потемнение, осветление), экскреция (диспепсия).

Результаты и обсуждение

Адьювантная активность природных полисахаридов хорошо известна и является предметом продолжающихся исследований. Одним

из таких природных полимеров являются бета-глюканы из клеточных стенок дрожжей. В работе для получения препарата бета-глюканов, наряду со стандартным подходом, были использованы ферментные комплексы целлюлазы и протеазы в сочетании с обработкой ультразвуком. Оптимизация процесса позволила получить препарат бета-глюканов высокой степени чистоты с выходом до 2 г из 100 г биомассы влажных клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

Оценка адьювантной активности препарата бета-глюканов на лабораторных мышах, иммунизированных белком RBD, показала, что

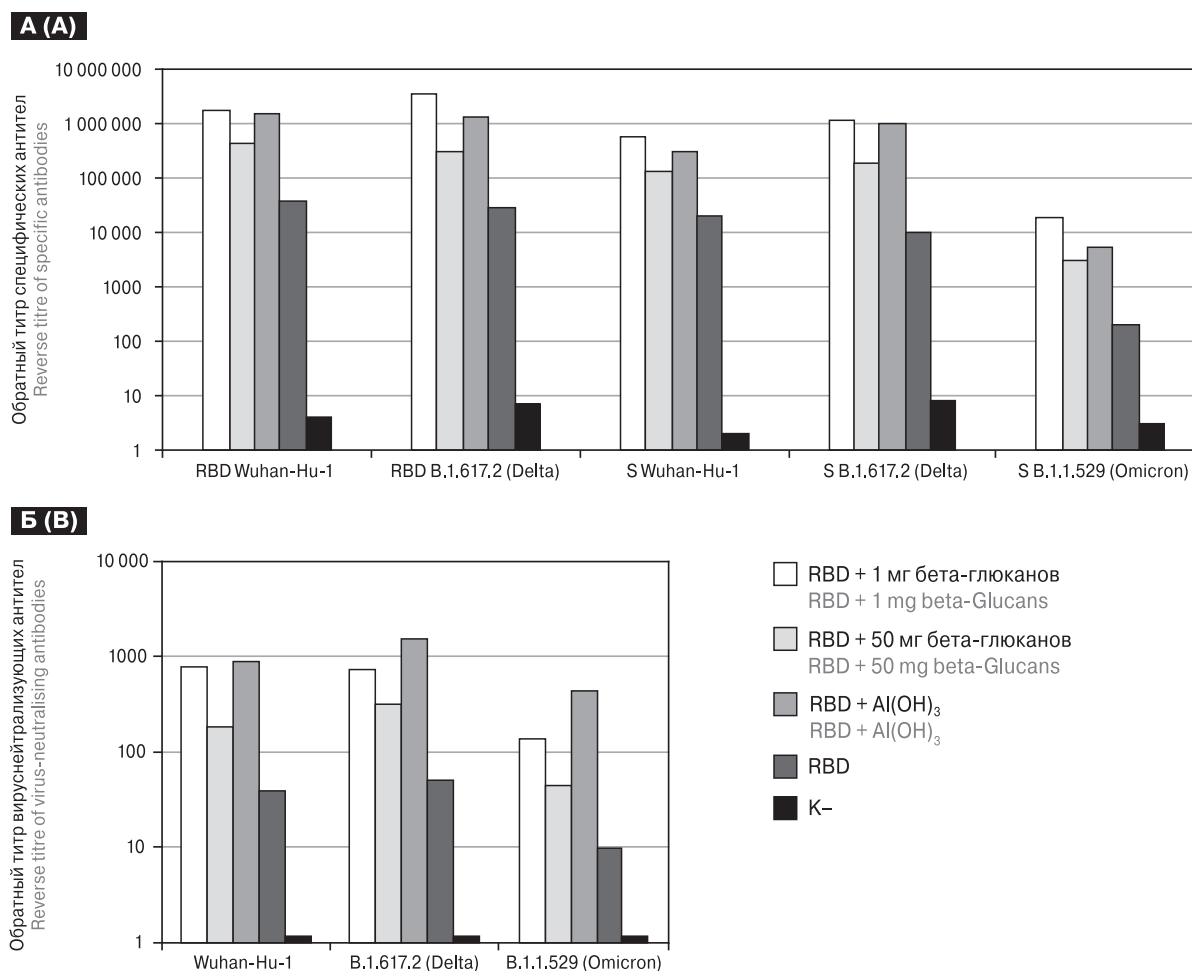


Рисунок. Анализ гуморального ответа мышей после двукратной иммунизации RBD в комплексе с бета-глюканами

Figure. Analysis of humoral immune response in mice after a double immunization with RBD in combination with beta-Glucans

Примечание. А — обратный титр специфических антител, в качестве антигенов использованы RBD вариантов Wuhan-Hu-1 и Delta (B.1.617.2) и спайковые S-белки вариантов Wuhan-Hu-1, Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529). Б — обратный титр вируснейтрализующих антител против штаммов вируса SARS-CoV-2: Wuhan-hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Wuhan-Hu-1), Delta-hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (Delta (B.1.617.2)) и Omicron 1-hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (Omicron (B.1.1.529)).

Note. A, reverse titers of the specific antibodies against S proteins of Wuhan (Wuhan-Hu-1), Delta (B.1.617.2) and Omicron (B.1.1.529) virus variants. B, reciprocal titers of the virus-neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 virus strains: Wuhan-hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Wuhan-Hu-1), Delta-hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (Delta (B.1.617.2)), and Omicron 1-hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (Omicron (B.1.1.529)).

бета-глюканы обладают способностью усиливать выработку специфических и вируснейтрализующих антител. В группе мышей, которым вводили адьювант в дозе 50 мкг, средний обратный титр специфических антител против гомологичного антигена (RBD, вариант Delta) составлял 178 740. В группе, получившей адьювант в дозе 1 мг, этот показатель был на порядок выше и составил 1 115 370. Полученные значения среднего обратного титра антител животных опытных групп близки к значениям параметра в группе, иммунизированной RBD с Al(OH)₃ (рис., А), при этом для дозы 1 мг они были несколько выше. Сходную картину наблюдали при тестировании сывороток с использованием RBD гетерологичного варианта Wuhan-Hu-1. Картина значительно не изменилась и при тестировании с использованием полноразмерных S-белков SARS-CoV-2, хотя в случае варианта Omicron наблюдалось снижение обратных титров в опытных группах мышей.

Анализ вируснейтрализующей активности сывороток показал, что титры нейтрализующих антител в крови мышей, иммунизированных RBD в сочетании с бета-глюканами, в отношении штаммов hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Wuhan) и hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (Delta) сравнимы, в то время как в отношении hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (Omicron) существенно ниже (рис., Б). Титры вируснейтрализующих антител в группе мышей, иммунизированной только RBD, были ниже, чем в группах с адьювантом. При этом наблюдалась схожая тенденция повышения значений показателя при увеличении дозы адьюванта с 50 мкг до 1 мг. Как и в случае специфических антител,

титры вируснейтрализующих антител были сравнимы с их уровнем в группе, иммунизированной RBD с Al(OH)₃.

Анализ токсичности препарата бета-глюканов показал, что среднесмертельная доза препарата (ЛД₅₀) составила 1,12 (1,0–1,26) г/кг, максимально переносимая доза (МПД) — 0,79 г/кг, а летальная доза (ЛД₁₀₀) — 1,58 г/кг. В соответствии с классификацией токсичности веществ при введении в брюшную полость животного (по К.К. Сидорову) [2, 4] можно констатировать, что препарат относится к практически нетоксичным веществам.

Заключение

В результате данной работы разработана схема получения препарата бета-глюканов из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Исследованы адьювантные свойства полученного препарата и показано, что наибольшая адьювантная активность достигается при использовании дозы бета-глюканов 1 мг/мышь. Обратные титры специфических антител крови мышей, иммунизированных RBD в сочетании с препаратом бета-глюканов, были сравнимы или превышали титры антител в группе животных, иммунизированных RBD с гидроксидом алюминия. Сыворотки крови, полученные от животных, иммунизированных RBD либо RBD в сочетании с бета-глюканами, нейтрализовали как гомологичные, так и гетерологичные штаммы SARS-CoV-2. Исследование токсических свойств препарата бета-глюканов показало, что препарат может быть отнесен к классу практически нетоксичных веществ.

Список литературы/References

1. Дьякон А.В., Хрыкина И.С., Хегай А.А., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Ивашев М.Н. Метод забора крови у животных // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013. Т. 11, № 2. С. 84–85. [Dyakon A.V., Hrykina I.S., Hegai A.A., Dyachenko I.A., Murashev A.N., Ivashev M.N. Method for blood sampling in animals. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2013, vol. 11, no. 2, pp. 84–85. (In Russ.)]
2. Измеров Н.Ф., Саноцкий И.В., Сидоров К.К. Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии (Справочник). М.: Медицина, 1977. 240 с. [Izmerov N.F., Sanotsky I.V., Sidorov K.K. Parameters of Toxicometry of Industrial Poisons with a Single Exposure (Reference Book). *Moscow: Meditsina*, 1977. 240 p. (In Russ.)]
3. Курашова С.С., Дзагурова Т.К., Ишмухаметов А.А., Егорова М.С., Баловнева М.В., Соцкова С.Е., Ткаченко Е.А. Адьюванты на основе углеводов для производства вакцин // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2018. Т. 18, № 2. С. 81–91. [Kurashova S.S., Dzagurova T.K., Ishmukhametov A.A., Egorova M.S., Balovneva M.V., Sotskova S.E., Tkachenko E.A. Carbohydrate-Based Adjuvants for Vaccine Production. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2018, vol. 18, no. 2, pp. 81–91. (In Russ.)]
4. Методические указания по оценке токсичности и опасности дезинфицирующих средств МУ 1.2.110502, утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ 10.02.2002. М., 2002. [Evaluation of the toxicity and hazards of disinfectants: guidelines 1.2.1105-02: approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation on 10.02.2002]. Moscow, 2002. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200030376/titles>
5. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.Н., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология, 1978. Т. 41, № 4. С. 497–502. [Prozorovsky V.B., Prozorovskaya M.P., Demchenko V.M. A rapid method for the determination of the median effective dose and its errors. *Farmakologiya i toksikologiya = Pharmacology and Toxicology*, 1978, vol. 41, no. 4, pp. 497–502. (In Russ.)]

6. Dmour I., Islam N. Recent advances on chitosan as an adjuvant for vaccine delivery. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2022, vol. 200, pp. 498–519.
7. Fesel P.H., Zuccaro A. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genet. Biol.*, 2016, vol. 90, pp. 53–60.
8. Jin Y., Li P., Wang F. β -glucans as potential immunoadjuvants: a review on the adjuvanticity, structureactivity relationship and receptor recognition properties. *Vaccine*, 2018, vol. 36, pp. 5235–5244.

Авторы:

Волосникова Е.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией получения и анализа биосубстанций ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово, Россия;
Щербakov Д.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово, Россия;
Волкова Н.В., к.б.н., научный сотрудник ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово, Россия;
Есина Т.И., младший научный сотрудник ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово, Россия;
Зайковская А.В., старший научный сотрудник ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово, Россия;
Шими́на Г.Г., научный сотрудник ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово, Россия;
Даниленко Е.Д., к.б.н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово, Россия.

Authors:

Volosnikova E.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Head, Laboratory of Obtaining and Analyzing Biosubstances, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo, Russian Federation;
Shcherbakov D.N., PhD (Biology), Leading Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo, Russian Federation;
Volkova N.V., PhD (Biology), Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo, Russian Federation;
Esina T.I., Junior Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo, Russian Federation;
Zaikovskaya A.V., PhD (Biology), Senior Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo, Russian Federation;
Shimina G.G., Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo, Russian Federation;
Danilenko E.D., PhD (Biology), Director of the Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.03.2024
Принята к печати 31.03.2024

Received 31.03.2024
Accepted 31.03.2024

ЭКСПРЕССИЯ PD-1 И Tim-3 РАЗЛИЧНЫМИ СУБПОПУЛЯЦИЯМИ МОНОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЧАСТО РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

И.М. Рашупкин, И.В. Меледина, М.А. Котова, О.И. Желтова

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

Резюме. Более половины населения Земли инфицированы вирусом простого герпеса. В большинстве случаев инфицирование не сопровождается симптомами, однако у некоторых людей заболевание протекает в форме хронической инфекции с частыми и тяжелыми рецидивами. Одной из наиболее вероятных причин этого может быть нарушение иммунной регуляции. В последние годы активно изучается роль ингибиторных сигнальных молекул, в частности, PD-1 и Tim-3, в регуляции иммунного ответа и функций иммунокомпетентных клеток. Ранее было показано, что активация сигнальных молекул на Т-клетках подавляет иммунный ответ. Помимо Т-лимфоцитов, PD-1 и Tim-3 экспрессируются также на других иммунных клетках, в частности, моноцитах. Исследование экспрессии данных молекул моноцитами при хронических вирусных инфекциях однако ранее не проводилось. Целью данного исследования явилось изучение субпопуляционного состава моноцитов и уровня экспрессии PD-1 и Tim-3 на различных популяциях моноцитов у больных с хронической часто рецидивирующей герпесвирусной инфекцией. В исследование было рекрутировано 26 пациентов. Все пациенты получили курс противовирусной и иммуномодулирующей терапии в условиях иммунологического отделения клиники иммунопатологии. Количество классических, промежуточных и неклассических моноцитов, а также экспрессия на моноцитах PD-1 и Tim-3 оценивались методом проточной цитофлуориметрии до и после проведения курса терапии. Моноциты выделяли из периферической крови, субпопуляции разделяли по уровню экспрессии CD14 и CD16. У больных герпесом наблюдалось сниженное в сравнении с условно-здоровыми донорами количество моноцитов, которое однако оставалось у всех пациентов в рамках референсных значений. Относительное количество PD-1-позитивных моноцитов, средняя интенсивность флуоресценции PD-1 и Tim-3, а также количество дубль-позитивных клеток было снижено у больных герпесом во всех трех исследованных субпопуляциях моноцитов. Спустя 3 месяца после проведенной терапии оценивался ответ на проведенную терапию, ответившими при этом считались пациенты, у которых за 3 месяца не регистрировалось ни одного рецидива герпеса. Ответившие пациенты отличались более низким исходным содержанием дубль-позитивных клеток среди промежуточных и неклассических моноцитов. Выявленное в настоящем исследовании снижение уровня позитивных по PD-1 и Tim-3 моноцитов при герпесвирусной инфекции может свидетельствовать о вовлечении в патогенез заболевания дефицитных по экспрессии ингибиторных сигнальных молекул моноцитов.

Ключевые слова: моноциты, герпесвирусная инфекция, PD-1, Tim-3, чек-пойнт молекулы, иммунотерапия.

Адрес для переписки:

Рашупкин Иван Михайлович
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14,
ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии.
Тел.: 8 (383) 236-03-29. E-mail: iwwwanbets@mail.ru

Contacts:

Ivan M. Rashchupkin
630099, Russian Federation, Novosibirsk, Yadrincevskaya str., 14,
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology.
Phone: +7 (383) 236-03-29. E-mail: iwwwanbets@mail.ru

Для цитирования:

Рашупкин И.М., Меледина И.В., Котова М.А., Желтова О.И. Экспрессия PD-1 и Tim-3 различными субпопуляциями моноцитов при хронической часто рецидивирующей герпесвирусной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 575–580. doi: 10.15789/2220-7619-PAT-16807

Citation:

Rashchupkin I.M., Meledina I.V., Kotova M.A., Zheltova O.I. PD-1 and Tim-3 expression on different subpopulations of monocytes in chronic often recurrent herpesvirus infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 575–580. doi: 10.15789/2220-7619-PAT-16807

Работа выполнена в рамках государственного задания FGMN 0415-2024-0011.
The study was performed under the state assignment FGMN 0415-2024-0011.

© Рашупкин И.М. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-PAT-16807>

PD-1 AND Tim-3 EXPRESSION ON DIFFERENT SUBPOPULATIONS OF MONOCYTES IN CHRONIC OFTEN RECURRENT HERPESVIRUS INFECTION

Rashchupkin I.M., Meledina I.V., Kotova M.A., Zheltova O.I.

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

Abstract. More than half of the world's population is infected with the herpes simplex virus. In most cases, infection is not accompanied by symptoms, but in some people the disease occurs as a chronic infection with frequent and severe relapses. One of the most likely reasons for this may be a dysregulation of the immune system. In recent years, the role of checkpoint molecules, in particular PD-1 and Tim-3, in the regulation of the immune response and the functions of immunocompetent cells has been actively studied. Activation of PD-1 and Tim-3 on T cells has previously been shown to suppress the immune response. PD-1 and Tim-3 are also expressed on other immune cells, in particular monocytes. However, the expression of these molecules on monocytes during chronic viral infections has not been previously studied. The study was aimed at assessing the level of PD-1 and Tim-3 expression on various populations of monocytes in patients with chronic often recurrent herpesvirus infection. Twenty-six patients were recruited into the study. All patients received antiviral and immunomodulatory therapy in the immunological department. The number of classical, intermediate, and non-classical monocytes and the expression of PD-1 and Tim-3 on monocytes, were assessed by flow cytometry before and after the therapy. Monocytes were isolated from peripheral blood, and subpopulations were divided according to the level of expression of CD14 and CD16. In patients with herpes, a reduced number of monocytes was observed in comparison with healthy donors. The relative number of PD-1-positive monocytes, the mean fluorescence intensity of PD-1 and Tim-3, and the number of double-positive cells were reduced in herpes patients in all three monocyte subpopulations examined. Three months after therapy, the response to the therapy was assessed; patients who did not have a single recurrence of herpes within 3 months were considered to respond. Responding patients had a lower initial content of double-positive cells among intermediate and non-classical monocytes. The decrease in the level of PD-1 and Tim-3 positive monocytes during herpesvirus infection revealed in the present study may indicate the involvement of monocytes deficient in the expression of checkpoint molecules in the pathogenesis of the disease.

Key words: monocytes, herpesvirus infection, PD-1, Tim-3, checkpoint molecules, immunotherapy.

Введение

Инфекции, вызываемые вирусом простого герпеса (herpes simplex) I и II типов (HSV-I и HSV-II), являются широко распространенными. Более половины населения Земли инфицированы вирусом простого герпеса [11]. У большинства людей, носителей вируса, инфицирование не сопровождается симптомами герпетической инфекции. Однако у 2–10% заболевание протекает в хронической форме с частыми рецидивами и выраженными симптомами [9]. Причиной этого может являться нарушение иммунного ответа. Основой терапии рецидивирующего герпеса являются противовирусные препараты, блокирующие репликацию вируса герпеса — ациклические нуклеозиды (ацикловир, валацикловир и др.). Полной элиминации вируса, впрочем, не происходит, вследствие чего рецидивы могут повторяться, чаще после отмены противовирусной терапии, но иногда и на фоне ее. Кроме того, в некоторых случаях противовирусная терапия и вовсе не приводит к положительным эффектам: тяжесть и частота рецидивов остаются прежними. В связи с этим активно разрабатываются новые методы терапии герпесвирусной инфекции, способные более отчетливо повлиять на течение заболевания. В иммунологическом отделении НИИФКИ разработан протокол лечения хронической часто рецидивирующей герпесвирусной инфекции,

сочетающий вируссупрессивную и иммуномодулирующую терапию. Данная схема показала хорошую эффективность: у большинства пациентов, получивших лечение, уменьшались тяжесть и частота рецидивов и увеличивался межрецидивный период, у некоторых больных до нескольких лет. Однако некоторые пациенты, получившие лечение по описанной схеме, не отмечали положительного эффекта, заболевание у них продолжало часто и тяжело рецидивировать. В связи с неоднородностью ответа на терапию различных пациентов представляется актуальным изучение потенциальных прогностических биомаркеров эффективности терапии герпесвирусной инфекции.

Различный ответ пациентов на курс иммуномодулирующей и противовирусной терапии может быть связан с индивидуальными особенностями иммунной системы и иммунного ответа. Важную роль в регуляции иммунных реакций, в частности, имеют чек-пойнт молекулы, наиболее изученными из которых являются PD-1 и Tim-3. Первоначально PD-1 и Tim-3 были обнаружены на Т-лимфоцитах, однако впоследствии выяснилось, что спектр клеток, экспрессирующих PD-1 и Tim-3, шире, в частности, эти молекулы экспрессируют и моноциты. Показано, что активация чек-пойнт молекул приводит к подавлению активности клеток и, как следствие, к подавлению Т-клеточного иммунного ответа [3, 4]. Оверэкспрессия PD-1

на лимфоцитах и моноцитах/макрофагах ассоциируется с повышенной частотой нозокомиальных инфекций, более высокой смертностью от сепсиса, что может быть связано с избыточной иммуносупрессивной активностью [1, 6]. Показано увеличение количества моноцитов, секретирующих IL-10 и TNF α , при блокаде PD-1 и Tim-3 [10]. Таким образом, PD-1 и Tim-3 участвуют в регуляции функций иммунных клеток, в частности, моноцитов, и их роль в настоящее время активно исследуется. Анализ экспрессии данных молекул на моноцитах при хронических вирусных инфекциях, однако, ранее не проводился.

Целью настоящего исследования явился анализ экспрессии PD-1 и Tim-3 различными субпопуляциями моноцитов у пациентов с хронической часто рецидивирующей герпетической инфекцией.

Материалы и методы

В исследование были рекрутированы 26 пациентов (26 женщин, в возрасте от 27 до 76 лет, медиана 42 года) с хронической часто рецидивирующей герпесвирусной инфекцией (частота обострений 4–36 в год, медиана 12), включая 15 с генитальной локализацией герпеса и 11 с лабиальной. Длительность заболевания варьировала от 2 до 50 лет (медиана 13 лет). В группу сравнения вошли 15 условно здоровых доноров (5 мужчин, 10 женщин, возраст 21–58 лет, медиана 35 лет). У всех пациентов и доноров, включенных в исследование, было получено письменное информированное согласие. Все пациенты получили стандартный курс терапии в условиях иммунологического отделения НИИФКИ продолжительностью в среднем 10 дней, включавший в себя противовирусные (валацикловир) и иммуномодулирующие (галавит, натрия нуклеинат, имунофан, полиоксидоний, тималин, ликопид, ронколейкин) препараты. Иммуномодулирующая терапия подбиралась индивидуально, с учетом показаний и противопоказаний на основе тяжести и длительности заболевания, иммунного статуса, сопутствующих заболеваний. После выписки из стационара пациенты продолжали принимать противовирусные препараты. Для оценки эффективности проведенной терапии проводился опрос пациентов спустя 3 месяца после выписки из стационара. Пациенты, у которых за 3 месяца не регистрировалось ни одного рецидива заболевания, считались ответившими на терапию, а те, у кого был хотя бы один рецидив — не ответившими.

Мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла-верографи-

на. Методом проточной цитофлуориметрии оценивали количество классических (CD14⁺⁺/CD16⁻; кМо), промежуточных (CD14⁺⁺/CD16⁺; пМо) и неклассических (CD14⁺/CD16⁺⁺; нМо) моноцитов, уровень экспрессии и среднюю интенсивность флуоресценции PD-1 и Tim-3 в каждой из субпопуляций моноцитов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc). Данные представлены в виде медианного значения и интерквартильного диапазона (IQR, 25–75% квантили). Для выявления достоверности различий сравниваемых показателей применяли непараметрический критерий Манна–Уитни и параметрический критерий Вилкоксона (для связанных выборок); различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Содержание моноцитов в периферической крови больных герпесвирусной инфекцией было снижено в сравнении со здоровыми донорами ($0,37 [0,3–0,45] \times 10^9/\text{мл}$ против $0,49 [0,43–0,53]$, $p = 0,003$), оставаясь, однако, у всех пациентов в пределах стандартных референсных значений. Абсолютное количество моноцитов всех трех исследованных субпопуляций также было значимо ниже в группе пациентов ($p < 0,05$). При этом относительное количество классических (кМо) и промежуточных (пМо) моноцитов между группами не различалось, в то время как процентное содержание неклассических (нМо) моноцитов в группе пациентов было снижено более, чем в 2 раза: $0,9\% [0,5–1,5]$ против $2\% [1,1–4]$ у доноров ($p = 0,004$) (табл. 1).

Как у доноров, так и у пациентов процент PD-1-позитивных клеток был выше в субпопуляциях пМо и нМо в сравнении с кМо, аналогичные различия выявлялись и по средней интенсивности флуоресценции (MFI) ($p < 0,05$). В то же время популяции пМо и нМо по указанным показателям между собой не различались. В группе доноров все субпопуляции моноцитов различались между собой как по относительному содержанию Tim-3-позитивных клеток, так и по средней интенсивности флуоресценции Tim-3 ($p < 0,05$). При этом наибольший процент Tim-3⁺-клеток и MFI регистрировался в пМо, а наименьший — в кМо. У пациентов различия между субпопуляциями моноцитов по Tim-3 оказались аналогичными таковым в донорской группе, за исключением отсутствия различий между пМо и нМо по MFI.

Анализ экспрессии PD-1 моноцитами показал снижение относительного содержания PD-1⁺-клеток и средней интенсивности флуоресценции PD-1 во всех трех субпопуляциях моноцитов больных с герпесвирусной инфекцией

Таблица. Экспрессия PD-1 и Tim-3 на различных субпопуляциях моноцитов у пациентов с часто рецидивирующей герпетической инфекцией

Table. Expression of PD-1 and Tim-3 on different monocyte subpopulations in patients with recurrent herpes infection

			Доноры (n = 15) Donors (n = 15)	Пациенты (n = 26) Patients (n = 26)	p_u
кМо (CD14⁺⁺/CD16⁻)		%	93,7 [86–95,6]	95,1 [92,5–96]	0,13
кМо	PD-1	%	24 [18–30]	12,1 [7,7–19,1]	0,001
		MFI	632 [607–694]	400 [292–454]	< 0,001
	Tim-3	%	73,9 [55–88]	68,2 [48,2–87,9]	0,44
		MFI	1158 [1077–1433]	890 [280–1210]	0,09
пМо (CD14⁺⁺/CD16⁺)		%	3,4 [2,1–4]	2,4 [1,5–3,5]	0,31
пМо	PD-1	%	56 [40–71]	28 [15–43,1]	< 0,001
		MFI	1138 [994–1591]	484 [357–740]	0,003
	Tim-3	%	95 [90–97,4]	92,7 [83,3–97,9]	0,31
		MFI	1911 [1537–2481]	1298 [321–1687]	0,004
нМо (CD14⁺/CD16⁺⁺)		%	2 [1,1–4]	0,9 [0,5–1,5]	0,004
нМо	PD-1	%	56 [41–64]	27,7 [13,4–36]	< 0,001
		MFI	987 [787–1312]	562 [452–837]	0,01
	Tim-3	%	87,8 [83–95]	83,5 [56,7–96,4]	0,31
		MFI	1649 [1492–1796]	1038 [376–1519]	0,006

Примечание. данные представлены в виде медианного значения и интерквартильного диапазона (IQR, 25–75%). p_u — достоверность различий между группами пациентов и доноров по U-критерию Манна-Уитни.

Note. data are presented as median and interquartile range (IQR, 25–75%). p_u — significance of differences between groups of patients and donors according to the Mann-Whitney U-test.

($p < 0,05$) (табл.) в сравнении с донорской группой. В то же время относительное содержание Tim-3-позитивных клеток у больных не снижалось ни в одной из популяций моноцитов. Средняя интенсивность флуоресценции Tim-3, однако, была снижена во всех популяциях: в пМо и нМо регистрировалось достоверное снижение ($p = 0,003$ и $p = 0,006$ соответственно), в кМо изменения были выражены на уровне тренда ($p = 0,09$) (табл.). Помимо этого, у больных во всех трех субпопуляциях моноцитов было выявлено значимое снижение доли дубль-позитивных PD-1⁺/Tim-3⁺-моноцитов в сравнении с донорской группой.

Описанные различия выявлялись у пациентов как с лабиальной ($n = 11$), так и с генитальной ($n = 15$) формой инфекции, в то же время группы пациентов с различной локализацией герпеса не различались между собой ни по одному из исследованных параметров.

Все пациенты, рекрутированные в исследование, получили курс противовирусной и иммуномодулирующей терапии в условиях стационара. Субпопуляционный состав моноцитов и уровень экспрессии PD-1 и Tim-3 оценивали также сразу после проведенной терапии. Было показано, что содержание PD-1⁺-моноцитов и MFI PD-1 после терапии не из-

меняется ни в одной из субпопуляций. Вместе с тем относительное содержание Tim-3⁺-клеток после терапии значимо снижалось в субпопуляциях пМо (82,6% [54,3–94,3] в сравнении с 92,7% [83,3–97,9] до терапии, $p < 0,001$) и нМо (65,9% [37,5–81,8] в сравнении с 83,5% [56,7–96,4] до терапии, $p = 0,018$), оставаясь при этом на прежнем уровне в кМо. Снижения MFI Tim-3 после курса лечения зарегистрировано не было.

Спустя 3 месяца после полученного курса терапии пациенты были опрошены с целью оценки ответа на терапию. Положительно ответившими считались пациенты, у которых не было ни одного рецидива за 3 месяца, прошедшие после окончания курса терапии, количество таких пациентов в настоящем исследовании составляло 47% от общего числа опрошенных. Исходное (до терапии) количество как PD-1⁺, так и Tim-3-позитивных моноцитов всех трех популяций у ответивших и не ответивших на терапию больных не различалось. В то же время ответившие пациенты отличались существенно более низким (более, чем в 3 раза в сравнении с неответчиками) исходным содержанием дубль-позитивных клеток в субпопуляциях пМо и нМо, различие в обеих субпопуляциях носило характер тренда ($p = 0,06$ и $p = 0,09$ соответственно).

Популяция циркулирующих моноцитов человека является гетерогенной. Традиционно по соотношению экспрессии CD14 и CD16 выделяются три субпопуляции — классические, промежуточные и неклассические моноциты. Эти субпопуляции рассматриваются как стадии дифференцировки (от классических к неклассическим) и обладают различными свойствами. Так, кМо традиционно рассматриваются как клетки с преимущественно провоспалительными свойствами, обладающие высокой способностью к фагоцитозу, продукции активных форм кислорода и миграции в очаг воспаления [7]. ПМо также ранее рассматривались как провоспалительные клетки, поскольку они активно продуцируют провоспалительные цитокины и способны дифференцироваться в M1-макрофаги в тканях, однако в последнее время считается, что свойства пМо зависят от поступающих сигналов и могут быть как преимущественно про-, так и противовоспалительными [8]. нМо, в свою очередь, обычно рассматриваются как клетки с преобладанием регуляторной и противовоспалительной активности [5]. Все популяции моноцитов экспрессируют ингибиторные сигнальные молекулы PD-1 и Tim-3 (также обозначаемые как чек-пойнт молекулы). Экспрессия PD-1 и Tim-3 CD16⁺-моноцитами с преобладанием регуляторной и противовоспалительной активности выше, чем провоспалительными кМо, что согласуется с данными об иммуносупрессивной роли чек-пойнт молекул.

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о возможной вовлеченности чек-пойнт молекул, экспрессируемых на моноцитах, в патогенез хронической герпесвирусной инфекции. Так, сниженный уровень экспрессии PD-1 и Tim-3 на моноцитах может обусловить их избыточную провоспалительную активность. Ранее было показано, что вирус герпеса секретирует вещества, обладающие

хемоаттрактантной активностью в отношении моноцитов и нейтрофилов, индуцирующие высвобождение активных форм кислорода из этих клеток, активирующие фагоцитоз [2]. Таким образом, при персистирующем вирусе формируется локальный участок хронического воспаления. Дефицитные по чек-пойнт молекулам моноциты могут способствовать иммунной дисрегуляции и поддержанию очага, формируется своеобразный порочный круг, участниками которого являются персистирующий вирус герпеса и иммунные клетки с избыточной провоспалительной активностью.

Как было сказано выше, уровень экспрессии PD-1 и Tim-3 на всех субпопуляциях моноцитов у больных герпесом значительно ниже, чем у доноров. В связи с этим интерес представляют данные о лучшем ответе на терапию пациентов с исходно наиболее низким количеством дубль-позитивных по PD-1 и Tim-3 пМо и нМо. Кроме того, повышения количества как экспрессии PD-1 и Tim-3, так и дубль-позитивных PD-1⁺/Tim-3⁺-моноцитов у пациентов после курса проведенной терапии зарегистрировано не было. Возможно, изменения экспрессии могут носить отсроченный характер и не проявляться непосредственно после окончания курса терапии, в связи с этим актуальным представляется исследование экспрессии ингибиторных сигнальных молекул на более поздних сроках после терапии. Выявленная нами зависимость ответа на терапию и количества дубль-позитивных PD-1⁺/Tim-3⁺ пМо и нМо носит характер тренда и требует дальнейшего подтверждения и объяснения возможной связи между экспрессией сигнальных молекул и ответом на терапию. Вместе с тем экспрессия PD-1 и Tim-3 различными субпопуляциями моноцитов может стать одним из прогностических критериев для характера течения герпетической инфекции и ответа пациентов на терапию.

Список литературы/References

1. Antonsen K.W., Hviid C.V.B., Hagensen M.K., Sorensen B.S., Moller H.J. Soluble PD-1 (sPD-1) is expressed in human macrophages. *Cell. Immunol.*, 2021, vol. 369: 104435. doi: 10.1016/j.cellimm.2021.104435
2. Bellner L., Thoren F., Nygren E., Liljeqvist J.-A., Karlsson A., Eriksson K. A proinflammatory peptide from herpes simplex virus type 2 glycoprotein G affects neutrophil, monocyte, and NK cell functions. *J. Immunol.*, 2005, vol. 174, no. 4, pp. 2235–2241. doi: 10.4049/jimmunol.174.4.2235
3. Das M., Zhu C., Kuchroo V.K. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol. Rev.*, 2017, vol. 276, no. 1, pp. 97–111. doi: 10.1111/immr.12520
4. Ghosh C., Luong G., Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J. Cancer*, 2021, vol. 12, no. 9, pp. 2735–2746. doi: 10.7150/jca.57334
5. Guglietta S., Krieg C. Phenotypic and functional heterogeneity of monocytes in health and cancer in the era of high dimensional technologies. *Blood Rev.*, 2023, vol. 58: 101012. doi: 10.1016/j.blre.2022.101012
6. Guignat C., Lepape A., Huang X., Kherouf H., Denis L., Poitevin F., Malcus C., Cheron A., Allaouchiche B., Gueyffier F., Ayala A., Monneret G., Venet F. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Critical Care*, 2011, vol. 15, no. 2: R99. doi: 10.1186/cc10112
7. Ozanska A., Szumczak D., Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand. J. Immunol.*, 2020, vol. 91, no. 1: e12883. doi: 10.1111/sji.12883

8. Skrzeczynska-Moncznik J., Bzowska M., Loseke S., Grage-Griebenow E., Zembala M., Pryjma J. Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.*, 2011, vol. 67, no. 2, pp. 152–159. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x
9. Van Wagoner N., Qushair F., Johnston C. Genital herpes infection: progress and problems. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 2023, vol. 37, no. 2, pp. 351–367. doi: 10.1016/j.idc.2023.02.011
10. Xia Q., Wei L., Zhang Y., Sheng J., Wu W., Zhang Y. Immune Checkpoint Receptors Tim-3 and PD-1 Regulate Monocyte and T Lymphocyte Function in Septic Patients. *Mediators Inflamm.*, 2018, vol. 2018: 1632902. doi: 10.1155/2018/1632902
11. Zhu S., Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*, 2021, vol. 12, no. 1, pp. 2670–2702. doi: 10.1080/21505594.2021.1982373

Авторы:

Ращупкин И.М., лаборант-исследователь лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;
Меледина И.В., к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, зав. отделением иммунологии клиники иммунопатологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;
Котова М.А., врач аллерголог-иммунолог отделения иммунологии клиники иммунопатологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;
Желтова О.И., к.м.н., врач аллерголог-иммунолог отделения иммунологии клиники иммунопатологии ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия;

Authors:

Rashchupkin I.M., Research Laboratory Assistant, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;
Meledina I.V., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Head of the Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;
Kotova M.A., Allergist-Immunologist, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation;
Zheltova O.I., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.03.2024
Принята к печати 01.04.2024

Received 31.03.2024
Accepted 01.04.2024

ДЛИННЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК — РЕГУЛЯТОРЫ КРАСНУШНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПРОТИВОВИРУСНОГО ОТВЕТА

М.К. Гулимов, Н.О. Калюжная, Ю.И. Амму, В.В. Зверев, О.А. Свитич

ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Вирус краснухи является РНК-содержащим вирусом, способным инфицировать клетки человека и вызывать инфекционное заболевание. Заражение беременных женщин вирусом краснухи может привести к выкидышу или синдрому врожденной краснухи (СВК) — набору долговременных врожденных дефектов, включая неполное развитие органов плода и умственную отсталость. Специфического лечения краснухи и СВК не существует. В настоящее время активно изучается регуляция противовирусного иммунного ответа и вирусной репродукции длинными некодирующими РНК. В данном исследовании проведена оценка изменения экспрессионного профиля длинных некодирующих РНК в эпителиальных клетках А549, инфицированных вирусом краснухи, методом РНК-секвенирования. *Материалы и методы.* Клетки А549 заражали диким вариантом лабораторного штамма С-77 вируса краснухи со множественностью инфекции 1,0 инфекционных единиц на клетку и инкубировали в течение 72 ч. Титры вируса определяли методом предельных разведений по ЦПД в чувствительной культуре клеток RK-13. Через 48 ч после заражения лизировали клеточный монослой, выделяли РНК и готовили библиотеки для секвенирования. Секвенирование проводили на платформе NextSeq500 (Illumina, США) в режиме парного чтения. Валидацию полученных данных РНК-секвенирования проводили с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени. *Результаты.* Репликация вируса краснухи влияет на продукцию некоторых длинных некодирующих РНК, изменяя их экспрессионный профиль. Так, при заражении эпителиальных клеток А549 вирусом краснухи было отмечено достоверное повышение экспрессии таких длинных некодирующих РНК, как GAS5, NEAT1, LUCAT1, MIR210HG, MEG3, EPB41L4A-AS1, ZFAS1, а также SNHG 1, 7, 12, 29, 32. Наиболее значимо экспрессия снижалась DANCER, IGFL2-AS1, MIR1915HG, а также SNHG14. Gene ontology (GO)-анализ показал, что длинные некодирующие РНК на разных уровнях вовлечены в механизмы иммунного ответа, в частности, процессинга РНК и метаболизма нуклеиновых кислот, следовательно, up- и down-регуляция данных молекул приводит к модуляции противовирусного иммунного ответа человека в ответ на заражением вирусом краснухи. *Выводы.* Таким образом, впервые показана регуляция продукции длинных некодирующих РНК вирусом краснухи. Дифференциально экспрессированные длинные некодирующие РНК могут быть использованы в качестве прогностических и диагностических биомаркеров вирусных заболеваний.

Ключевые слова: длинные некодирующие РНК, вирус краснухи, лабораторный штамм С-77, противовирусный ответ, РНК-секвенирование, дифференциальный анализ экспрессии генов.

Адрес для переписки:

Амму Юлия Игоревна
115088, Россия, Москва, 1-я Дубровская ул., 15,
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (968) 834-74-64.
E-mail: yulia.ammour@yahoo.fr

Contacts:

Yulia I. Ammour
115088, Russian Federation, Moscow, 1st Dubrovskaya str., 15,
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.
Phone: +7 (968) 834-74-64.
E-mail: yulia.ammour@yahoo.fr

Для цитирования:

Гулимов М.К., Калюжная Н.О., Амму Ю.И., Зверев В.В., Свитич О.А.
Длинные некодирующие РНК — регуляторы краснушной вирусной
инфекции и противовирусного ответа // Инфекция и иммунитет. 2024.
Т. 14, № 3. С. 581–585. doi: 10.15789/2220-7619-LNR-16889

Citation:

Gulimov M.K., Kalyuzhnaya N.O., Ammour Yu.I., Zverev V.V., Svitich O.A.
Long non-coding RNAs — regulators of rubella virus infection and antiviral
response // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 581–585. doi: 10.15789/2220-7619-
LNR-16889

LONG NON-CODING RNAs — REGULATORS OF RUBELLA VIRUS INFECTION AND ANTIVIRAL RESPONSE

Gulimov M.K., Kalyuzhnaya N.O., Ammour Yu.I., Zverev V.V., Svitich O.A.

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Rubella virus is an RNA-containing virus capable of infecting human cells and causing infectious disease. Infection of pregnant women with rubella virus can lead to abortion or congenital rubella syndrome (CRS), a set of long-term birth defects including incomplete fetal organ development and mental retardation. There is no specific treatment for rubella and CRS. The regulation of antiviral immune response and viral reproduction by long non-coding RNAs is currently under active investigation. In this study, we evaluated the changes in the expression profile of long non-coding RNAs in rubella virus-infected A549 epithelial by RNA sequencing. *Materials and Methods.* A549 cells were infected with a wild-type variant of laboratory strain C-77 of rubella virus with a multiplicity of infection of 1.0 infectious units per cell and incubated for 72 hours. Virus titres were determined by the CCID method in the sensitive RK-13 cell culture. 48 h after infection, the cell monolayer was lysed, RNA was isolated, and libraries were prepared for sequencing. Sequencing was performed on the NextSeq500 platform (Illumina, USA) in paired-end reading mode. Validation of the obtained RNA sequencing data was performed using quantitative real-time PCR. *Results.* Rubella virus replication affects the production of some long non-coding RNAs by altering their expression profile. Thus, upon infection of A549 epithelial cells with rubella virus, there was a significant increase in the expression of such long non-coding RNAs as GAS5, NEAT1, LUCAT1, MIR210HG, MEG3, EPB41L4A-AS1, ZFAS1, and SNHG 1, 7, 12, 29, 32. DANCR, IGFL2-AS1, IGFL2-AS1, MIR1915HG, and SNHG14 were most significantly decreased in expression. Gene ontology (GO)-analysis revealed that long non-coding RNAs are involved at different levels in the mechanisms of immune response, in particular, RNA processing and nucleic acid metabolism; therefore, up- and down-regulation of these molecules leads to modulation of human antiviral immune response in response to rubella virus infection. *Conclusion.* Thus, the regulation of long non-coding RNA production by rubella virus has been shown for the first time. Differentially expressed long non-coding RNAs can be used as prognostic and diagnostic biomarkers of viral diseases.

Key words: long non-coding RNAs, rubella virus, C-77 laboratory strain, antiviral response, RNA-sequencing, differential gene expression analysis.

Введение

Вирус краснухи — один из трех представителей рода *Rubivirus* семейства *Matonavirus*, включающего вирусы, содержащие РНК положительной полярности и способные вызывать инфекционные заболевания. Вирус краснухи является антропонозом, инфицирование вирусом краснухи вызывает заболевание с легкой симптоматикой. Однако заражение беременных женщин вирусом краснухи может привести к выкидышу или синдрому врожденной краснухи (СВК) — набору долговременных врожденных дефектов, включая неполное развитие органов и умственную отсталость. Международные кампании по вакцинации привели к значительному сокращению количества случаев инфицирования вирусом краснухи, тем не менее краснуха до сих пор остается важной проблемой в странах Африки и Юго-Восточной Азии с низким охватом вакцинацией. При этом в большинстве случаев вакцинация охватывает только женщин, в результате чего мужчины остаются восприимчивы к вирусу краснухи, что препятствует полной ликвидации вируса. Несмотря на то, что вирус краснухи был выделен относительно давно, и его аттенуированные варианты успешно используются в вакцинных препаратах, молекулярные механизмы взаимодействия вируса и клетки до конца неизвестны [14]. Таким образом, точное

установление уникальных молекулярных стратегий, лежащих в основе взаимодействия вируса и клетки-хозяина, имеет решающее значение для лучшего понимания процесса инфицирования РНК-содержащими вирусами и идентификации новых терапевтических целей.

Некодирующие РНК (нкРНК) обладают небольшой способностью кодировать белок и функционируют как регуляторы эпигенетической, транскрипционной и посттранскрипционной экспрессии генов. К некодирующим РНК относят длинные нкРНК (днРНК), транспортные РНК (тРНК), рибосомные РНК (рРНК), малые интерферирующие РНК (миРНК), микроРНК и другие. ДнРНК представляют собой молекулы РНК длиной свыше 200 нуклеотидов, которые не транслируются в белки. При этом точная классификация и идентификация днРНК до сих пор недоступны. ДнРНК участвуют в нескольких биологических процессах, включая эпигенетическую регуляцию экспрессии генов, апоптоз, контроль клеточного цикла, а также в развитии, дифференцировке и старении клеток [4]. Кроме того, в настоящее время активно изучается регуляция противовирусного иммунного ответа и вирусной репродукции при помощи днРНК. Таким образом, цель данного исследования — оценить изменение экспрессионного профиля нкРНК в эпителиальных клетках А549, инфицированных вирусом краснухи.

Материалы и методы

Дикий вариант вируса краснухи, штамм С-77, полученный из коллекции НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (титр 5,9–6,1 \log_{10} ТЦД₅₀/мл), размножали в культуре клеток Vero (CCL-81, ATCC, США).

Эпителиальная клеточная линия карциномы легких A549 была любезно предоставлена к.б.н. Никоновой А.А. Клетки вели в культуральной среде DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS; Thermo Fisher Scientific), 1 мМ глутамином (Thermo Fisher Scientific) и 50 мкг/мл раствором гентамицина (Thermo Fisher Scientific) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Культуру пассировали по достижении конfluence с помощью TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific). Для оценки жизнеспособности клеток в клеточной суспензии использовали 0,2% раствор трипанового синего (Thermo Fisher Scientific), подсчет проводили в камере Горяева.

Для анализа экспрессии днРНК, $1,0 \times 10^6$ клеток A549 заражали вирусом краснухи со множественностью инфицирования (MOI) 1.0 инфекционных единиц на клетку. Зараженные клетки инкубировали в среде DMEM/F12, дополненной 2% FBS, в атмосфере, содержащей 5% CO₂, при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 72 ч. В качестве контроля использовали незараженные клетки. Для определения титра вируса ежедневно отбирали 200 мкл супернатанта, осветляли центрифугированием при 3370g в течение 10 мин для удаления дебриса и хранили при -70°C до анализа. Титры вируса определяли методом предельных разведений по ЦПД в чувствительной культуре клеток RK-13 (ATCC, США).

РНК выделяли из трех независимо инфицированных культур клеток через 48 ч после заражения. Тотальную РНК выделяли с помощью набора RNeasy (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Качество и количество РНК оценивали с помощью биоанализатора 2100-Bioanalyzer (Agilent Technologies, Германия). Индекс RIN (индекс целостности РНК) составлял 9,5–10.

Библиотеки для секвенирования готовили с помощью набора TruSeqRNA Library Preparation Kit v2 (Illumina, США). Для каждого образца использовали около 1–2 мкг общей выделенной РНК. Конечный размер фрагментов библиотеки кДНК составлял 400–500 п.н. Для точного определения концентрации полученной кДНК использовали количественную ПЦР, затем готовили смесь библиотек кДНК тестируемых образцов в равных пропорциях и проверяли смешанные библиотеки. Секвенирование проводили на платформе NextSeq500 (Illumina, США)

в режиме парного чтения (2×150 п.н.). Было проведено два прогона NextSeq500. Для каждого образца было получено около 30–50 млн прочтений. Полученные чтения проверяли с помощью FastQC 0.11.5, обрезая с помощью Trimmomatic 0.39 и затем картировали с референсным геномом человека GRCh38 (аннотация Ensembl версии 102) с помощью STAR 2.7.5a. Количество прочтений на ген оценивали с помощью инструмента featureCounts из пакета Subread 1.6.0. Кроме того, отсутствие 3'-смещения проверяли с помощью скрипта geneBody_coverage из набора инструментов RSeQC 3.0.1. Дифференциальный анализ экспрессии генов проводили с использованием пакета edgeR 3.28.

Валидацию полученных данных РНК-секвенирования проводили с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени (qPCR-RT).

Линия клеток A549 была инфицирована диким вариантом лабораторного штамма вируса краснухи С-77 при MOI 1.0 инфекционных единиц на клетку. Титр вируса краснухи в культуре клеток вируса через 48 часов после инокуляции составил $5.56 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл (рис. 1). Таким образом, время 48 часов после заражения культуры клеток A549 было выбрано для РНК-секвенирования для анализа экспрессии генов, так как в этот момент времени не менее трети клеток в монослое инфицированы.

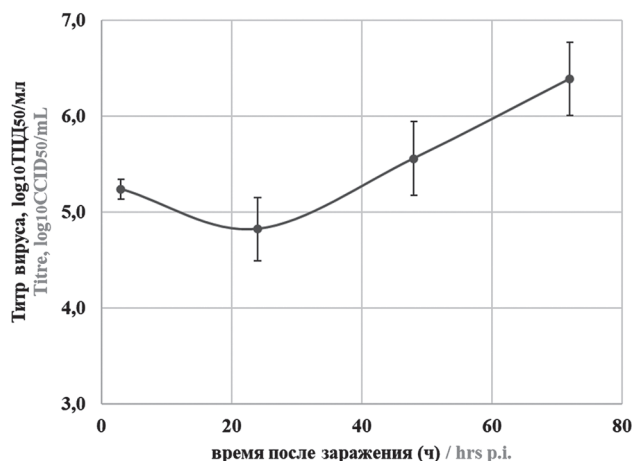


Рисунок 1. Кривая накопления вируса краснухи в супернатантах

Figure 1. Rubella virus accumulation in supernatants

Примечание. По оси X отложено время после инокуляции вируса в ч (hrs p.i.), по оси Y — титр вируса краснухи, выраженный в \log_{10} ТЦД₅₀/мл. Полосы погрешностей обозначают стандартное отклонение.

Note. The X axis represents the time after virus inoculation in hrs (hrs p.i.), the Y axis represents the rubella virus titre expressed in \log_{10} CCID₅₀/mL. Data shown represents mean of three independent experiments. Error bands indicate SD.

Результаты и обсуждение

Результаты секвенирования представлены на рис. 2 (III обложка).

Репликация вируса краснухи приводила как к up-, так и down-регуляции экспрессии днРНК. Среди наиболее up-регулируемых днРНК (FDR < 0,005) были выявлены GAS5, NEAT1, LUCAT1, MIR210HG, MEG3, EPB41L4A-AS1, ZFAS1, а также SNHG (small nucleolar RNA host genes) 1, 7, 12, 29, 32. Наиболее down-регулируемы (FDR < 0,01) следующие днРНК: DANCR, IGFL2-AS1, MIR1915HG, а также SNHG14. Gene ontology (GO)-анализ показал вовлечение метаболических процессов в ответ на вирусное заражение, в частности, процессинга РНК и метаболизма нуклеиновых кислот.

Известно, что днРНК играют важную роль в модуляции вирусной инфекции посредством регуляции противовирусного ответа на разных уровнях, включая воздействия на рецепторы распознавания патогена, или посредством эпигенетических, транскрипционных и посттранскрипционных эффектов. Также некоторые днРНК могут оказывать противовирусное действие путем прямого подавления вирусной инфекции, в то время как другие днРНК играют провирусную роль за счет прямого стимулирования репликации вируса или за счет влияния на клеточный статус, например, путем подавления противовирусных механизмов [1].

Так, наиболее значимо экспрессированная днРНК GAS5 (growth arrest specific 5) необходима для остановки нормального роста и замедления клеточного цикла. Роль GAS5 была показана в репликации вируса гепатита С (HCV). Так, GAS5 связывается с белком NS3 и ингибирует репликацию HCV. С другой стороны, экспрессия GAS5 подавляется во время инфекции ВИЧ-1, так как GAS5 может ингибировать репликацию ВИЧ-1, посредством взаимодействия с miR-873 [15]. Также было показано, что GAS5 индуцирует ответ на повреждение ДНК и регулирует апоптоз в CD4 Т-клетках пациентов с ВИЧ посредством регуляции экспрессии miR-21 [10].

Другая значимо экспрессированная днРНК в ответ на репликацию вируса краснухи, NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1), играет критическую роль в противовирусном ответе интерферона I типа (IFN β) посредством передачи сигналов RIG-I и пути cGAS-STING-IRF3. Известно, что вирусы гриппа А (IAV), ВИЧ (HIV) и простого герпеса 1 (HSV-1) up-регулируют экспрессию NEAT1 [7]. Кроме того, экспрессия NEAT1 усиливает продукцию IFN β через путь RIG-I-IRF7 при хантавирусной инфекции [2]. Также показана ее роль в репликации вируса лихорадки Денге посредством модуляции экспрессии IFI27 [9].

С другой стороны известно, что DANCR и NEAT1 могут совместно вносить вклад в сеть нкРНК-мРНК, регулирующих воспаление в сочетании с другими кодирующими и не-кодирующими элементами при инфекции SARS-CoV-2 [5]. В других работах также показана индукция экспрессии NEAT1, наряду с EPB41L4A-AS1, MEG3 и MALAT1, в SARS-CoV-2-инфицированных клетках [6, 8].

В свою очередь, днРНК DANCR модулирует действие катенина бета-1 (CTNNB1), активно участвующего в респираторных инфекциях и сепсисе. Предыдущие исследования свидетельствуют о том, что DANCR может вызывать провоспалительную активацию белка STAT3 через путь IL-11-JAK2. STAT3, в свою очередь, активирует IL-1 β , IL-6, NF- κ B1, REL и RELB, а также транскрипционный фактор SPI-1, который далее взаимодействует с TNF α , NF- κ B2, RELA, DANCR, и NEAT1-ассоциированным p54nrb параспецифическим белком [5]. Авторы проследили корреляцию уровней экспрессии DANCR в инфицированных SARS-CoV-2 клетках легкого с уровнями экспрессии таких медиаторов воспаления, как IL-1 β , IL-6, TNF α , и пятью субъединицами NF- κ B. Так, была выявлена статистически значимая отрицательная корреляция уровней экспрессии DANCR с транскрипцией факторов канонического пути активации NF- κ B, включая NF- κ B1 и IL-1 β . С другой стороны, экспрессия DANCR положительно коррелировала с экспрессией факторов NF- κ B2 и RELB, составляющих неканонический путь активации NF- κ B [5]. Таким образом, была установлена обратная связь между DANCR и воспалением, а значит, вероятно, снижение DANCR функционально связано с острой фазой инфекции и ее последствиями. Кроме того, DANCR и NEAT1 оказывают влияние на нервную ткань, приводя к когнитивным нарушениям.

Экспрессия днРНК MEG3 (maternally expressed 3) способствует репликации не только коронавируса, но и респираторно-синцитиального вируса, подавляя сигналинг TLR4 [11]. Экспрессия днРНК LUCAT1 (lung cancer associated transcript 1) приводит к снижению воспаления, посредством регулирования сплайсинга и стабильности NR4A2 [12]. В миелоидных клетках человека увеличение экспрессии LUCAT1 через взаимодействие со STAT1 приводит к снижению транскрипции генов, стимулированных интерфероном в ответ на инфекцию [13].

Кроме того, репликация вирусов HBV, HPV, CMV способствует увеличению экспрессии днРНК MIR210HG (MIR210 host gene), а вирусы IAV, HBV — ZFAS1 (ZNF1 antisense RNA 1), усиливая противовирусный врожденный иммунный ответ [3].

Таким образом, можно предположить, что репликация вируса краснухи влияет на экспрессионный профиль клетки-хозяина путем

модуляции выработки дНРНК. Впервые показана регуляция продукции дНРНК вирусом краснухи. Кроме того, дифференциально экспрессированные дНРНК могут быть использованы в качестве прогностических и диагностических биомаркеров вирусных заболеваний.

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН Краснову Г.С. и Наседкиной Т.В.

Список литературы/References

1. Agarwal S., Vierbuchen T., Ghosh S., Chan J., Jiang Z., Kandasamy R.K., Ricci E., Fitzgerald K.A. The long non-coding RNA LUCAT1 is a negative feedback regulator of interferon responses in humans. *Nat. Commun.*, 2020, vol. 11, no. 1: 6348. doi: 10.1038/s41467-020-20165-5
2. Chen L., Chen L., Zuo L., Gao Z., Shi Y., Yuan P., Han S., Yin J., Peng B., He X., Liu W. Short Communication: Long Noncoding RNA GAS5 Inhibits HIV-1 Replication Through Interaction with miR-873. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2018, vol. 34, no. 6, pp. 544–549. doi: 10.1089/AID.2017.0177
3. Das P.K., Kielian M. Molecular and Structural Insights into the Life Cycle of Rubella Virus. *J. Virol.*, 2021, vol. 95, no. 10: e02349-20. doi: 10.1128/JVI.02349-20
4. Jia X., Zhang M., Wang H., Cheng C., Li Q., Li Y., Kong L., Lan X., Wang Y., Liang X., Yuan S., Wang Y., Xu A. ZNF1 antisense RNA1 promotes antiviral innate immune responses via modulating ZNF1 function. *J. Med. Virol.*, 2023, vol. 95, no. 3: e28637. doi: 10.1002/jmv.28637
5. Laha S., Saha C., Dutta S., Basu M., Chatterjee R., Ghosh S., Bhattacharyya N.P. In silico analysis of altered expression of long non-coding RNA in SARS-CoV-2 infected cells and their possible regulation by STAT1, STAT3 and interferon regulatory factors. *Heliyon*, 2021, vol. 7, no. 3: e06395. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06395
6. Ma H., Han P., Ye W., Chen H., Zheng X., Cheng L., Zhang L., Yu L., Wu X., Xu Z., Lei Y., Zhang F. The Long Noncoding RNA NEAT1 Exerts Antihantaviral Effects by Acting as Positive Feedback for RIG-I Signaling. *J. Virol.*, 2017, vol. 91, no. 9: e02250-16. doi: 10.1128/JVI.02250-16
7. Mahmoud R.H., Hefzy E.M., Shaker O.G., Ahmed T.I., Abdelghaffar N.K., Hassan E.A., Ibrahim A.A., Ali D.Y., Mohamed M.M., Abdelaleem O.O. GAS5 rs2067079 and miR-137 rs1625579 functional SNPs and risk of chronic hepatitis B virus infection among Egyptian patients. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1: 20014. doi: 10.1038/s41598-021-99345-2
8. Meydan C., Mader N., Soreq H. The Neat Dance of COVID-19: NEAT1, DANCR, and Co-Modulated Cholinergic RNAs Link to Inflammation. *Front. Immunol.*, 2020, no. 11: 590870. doi: 10.3389/fimmu.2020.590870
9. Nguyen L.N.T., Nguyen L.N., Zhao J., Schank M., Dang X., Cao D., Khanal S., Chand Thakuri B.K., Lu Z., Zhang J., Li Z., Morrison Z.D., Wu X.Y., El Gazzar M., Ning S., Wang L., Moorman J.P., Yao Z.Q. Long Non-coding RNA GAS5 Regulates T Cell Functions via miR21-Mediated Signaling in People Living With HIV. *Front. Immunol.*, 2021, no. 12: 601298. doi: 10.3389/fimmu.2021.601298
10. Qiu L., Wang T., Tang Q., Li G., Wu P., Chen K. Long Non-coding RNAs: Regulators of Viral Infection and the Interferon Antiviral Response. *Front. Microbiol.*, 2018, no. 9: 1621. doi: 10.3389/fmicb.2018.01621
11. Saini J., Thapa U., Bandyopadhyay B., Vrati S., Banerjee A. Knockdown of NEAT1 restricts dengue virus replication by augmenting interferon alpha-inducible protein 27 via the RIG-I pathway. *J. Gen. Virol.*, 2023, vol. 104, no. 1. doi: 10.1099/jgv.0.001823
12. Talotta R., Bahrami S., Laska M.J. Sequence complementarity between human noncoding RNAs and SARS-CoV-2 genes: What are the implications for human health? *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2022, vol. 1868, no. 2: 166291. doi: 10.1016/j.bbdis.2021.166291
13. Tao X.W., Zeng L.K., Wang H.Z., Liu H.C. LncRNA MEG3 ameliorates respiratory syncytial virus infection by suppressing TLR4 signaling. *Mol. Med.*, 2018, vol. 17, no. 3, pp. 4138–4144. doi: 10.3892/mmr.2017.8303
14. Vierbuchen T., Agarwal S., Johnson J.L., Galia L., Lei X., Stein K., Olganier D., Gaede K.I., Herzmann C., Holm C.K., Heine H., Pai A., O'Hara Hall A., Hoebe K., Fitzgerald K.A. The lncRNA LUCAT1 is elevated in inflammatory disease and restrains inflammation by regulating the splicing and stability of NR4A2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2023, vol. 120, no. 1: e2213715120. doi: 10.1073/pnas.2213715120
15. Wang P. The Opening of Pandora's Box: An Emerging Role of Long Noncoding RNA in Viral Infections. *Front. Immunol.*, 2019, no. 9: 3138. doi: 10.3389/fimmu.2018.03138

Авторы:

Гулимов М.К., аспирант ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Калюжная Н.О., аспирант ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Аммур Ю.И., к.б.н., зав. лабораторией экспериментальной иммунологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Зверев В.В., академик РАН, д.б.н., профессор, научный руководитель ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;
Свитич О.А., д.м.н., профессор РАН, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Gulimov M.K., PhD Student, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Kalyuzhnaya N.O., PhD Student, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Ammour Yu.I., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Experimental Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Zverev V.V., RAS Full Member, DSc (Biology), Professor, Scientific Director of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Svitich O.A., DSc (Medicine), Professor of RAS, RAS Corresponding Member, Director of Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.04.2024
 Принята к печати 04.04.2024

Received 02.04.2024
 Accepted 04.04.2024

ПРИЗНАКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИСТОЩЕНИЯ CD4⁺ И CD8⁺ Т-КЛЕТОК У ВИЧ/ВГС КОИНФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НЕОТВЕТЧИКОВ НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ

Е.В. Сайдакова, Л.Б. Королевская, В.В. Власова, Н.Г. Шмагель, К.В. Шмагель

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Резюме. Коинфицирование вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ) и гепатита С (ВГС) является фактором риска развития иммунологического неответа на антиретровирусную терапию. При иммунологическом неответе снижение вирусной нагрузки ВИЧ не сопровождается ростом числа CD4⁺ Т-лимфоцитов, что увеличивает риски заболеваемости и смертности инфицированных лиц. Одним из механизмов препятствующих регенерации Т-лимфоцитов у иммунологических неответчиков может быть функциональное истощение этих клеток. Целью настоящего исследования было определение показателей функционального истощения CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков на антиретровирусную терапию. Обследованы три клинические группы: 1) ВИЧ/ВГС коинфицированные иммунологические неответчики (CD4⁺ Т-клетки < 350/мкл крови; n = 9), ВИЧ/ВГС коинфицированные лица со стандартным ответом на терапию (CD4⁺ Т-клетки > 500/мкл крови; n = 9), 3) относительно здоровые добровольцы без ВИЧ и ВГС инфекций (n = 9). В эксперименте *ex vivo* методом многоцветной проточной цитометрии определено количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих ингибиторный рецептор PD-1. В эксперименте *in vitro* с культурами клеток, стимулированными фитогемагглютинином в течение 7 дней, методом многоцветной проточной цитометрии установлено количество гибнущих в процессе пролиферации (CFSE^{low} ZombieUV⁺) CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. В супернатантах этих культур методом иммуоферментного анализа определено количество интерлейкина-2. Установлено, что у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков относительно двух групп сравнения увеличено количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих PD-1 (фенотипический признак истощения). Также у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков была увеличена доля гибнущих в процессе деления Т-клеток. Важно, что их количество было повышено среди CD4⁺, но не среди CD8⁺ Т-лимфоцитов. Аналогичным образом, снижение продукции интерлейкина-2 стимулированными Т-клетками было выявлено у ВИЧ/ВГС коинфицированных неответчиков

Адрес для переписки:

Сайдакова Евгения Владимировна
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН.
Тел.: 8 (342) 280-83-34.
E-mail: radimira@list.ru

Contacts:

Evgeniya V. Saidakova
614081, Russian Federation, Perm, Goleva str., 13,
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms.
Phone: +7 (342) 280-83-34.
E-mail: radimira@list.ru

Для цитирования:

Сайдакова Е.В., Королевская Л.Б., Власова В.В., Шмагель Н.Г., Шмагель К.В. Признаки функционального истощения CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков на антиретровирусную терапию // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 586–592. doi: 10.15789/2220-7619-MIC-16641

Citation:

Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Vlasova V.V., Shmagel N.G., Shmagel K.V. Markers of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell exhaustion in HIV/HCV coinfecting immunological non-responders to antiretroviral therapy // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 586–592. doi: 10.15789/2220-7619-MIC-16641

Работа выполнена в рамках государственного задания № 124021900006-5.

В работе использовано оборудование ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

This work was performed within the framework of the state assignment No. 124021900006-5. The equipment of the centre of collective use "Materials and Matter Research" of Perm Federal Research Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences was used in this work.

в пуле CD4⁺, но не CD8⁺ Т-лимфоцитов. Таким образом, у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков CD4⁺ Т-лимфоциты демонстрируют признаки фенотипического и функционального истощения, тогда как CD8⁺ Т-клетки, хотя и экспрессируют ингибиторные рецепторы, не проявляют признаков функциональных нарушений. По-видимому, разработка специализированной терапии ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков должна быть сосредоточена на восстановлении функциональной активности CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: ВИЧ/ВГС коинфекция, антиретровирусная терапия, иммунологический неответ, Т-лимфоциты, истощение, PD-1, пролиферация, клеточная смерть, интерлекин-2.

MARKERS OF CD4⁺ AND CD8⁺ T-CELL EXHAUSTION IN HIV/HCV COINFECTED IMMUNOLOGICAL NON-RESPONDERS TO ANTIRETROVIRAL THERAPY

Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Vlasova V.V., Shmagel N.G., Shmagel K.V.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. Coinfection with human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C virus (HCV) is a risk factor for immunological non-response to antiretroviral therapy. In cases of immunological non-response, HIV viral load suppression occurs without an increase in CD4⁺ T-cell counts, heightening the risk of morbidity and mortality in infected individuals. T-cell exhaustion may hinder their regeneration in immunological non-responders. This study aimed to identify markers of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell exhaustion in HIV/HCV coinfecting immunological non-responders. The study examined three clinical groups: 1) HIV/HCV coinfecting immunological non-responders (CD4⁺ T-cells < 350/μl blood; n = 9), 2) HIV/HCV coinfecting individuals with a standard response to therapy (CD4⁺ T-cells > 500/μl blood; n = 9), and 3) relatively healthy volunteers without HIV and HCV infections (n = 9). *Ex vivo*, the number of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells expressing the inhibitory receptor PD-1 was determined using multi-color flow cytometry. In the 7-day *in vitro* experiment, cell cultures were stimulated with phytohemagglutinin. The number of dying proliferated CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (CFSE^{low}ZombieUV⁺) was determined using multi-color flow cytometry. The amount of interleukin-2 in the culture supernatants was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay. It was found that in HIV/HCV coinfecting immunological non-responders, there was a higher number of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells expressing PD-1, a phenotypic marker of exhaustion, compared to the other two groups. Furthermore, the frequency of dying dividing T-cells was higher in immunological non-responders, with an increase in CD4⁺ T-cells but not CD8⁺ T-lymphocytes. Similarly, a decrease in interleukin-2 production was found in stimulated T-cells of HIV/HCV coinfecting immunological non-responders in the CD4⁺ T-cell pool, but not in CD8⁺ T-lymphocytes. Thus, in HIV/HCV coinfecting immunological non-responders, CD4⁺ T-cells appear exhausted both phenotypically and functionally. While CD8⁺ T-cells express inhibitory receptors, they do not show functional impairments. It appears that the specialized therapy for HIV/HCV coinfecting immunological non-responders should aim to improve CD4⁺ T-cell function.

Key words: HIV/HCV coinfection, antiretroviral therapy, immunological non-response, T-lymphocytes, exhaustion, PD-1, proliferation, cell death, interleukin-2.

Введение

У 10–40% ВИЧ-инфицированных больных, получающих антиретровирусную терапию (АРТ), снижение вирусной нагрузки ВИЧ не сопровождается приростом численности CD4⁺ Т-лимфоцитов [12]. У этих пациентов, известных как «иммунологические неответчики» (ИН), глубокая хроническая лимфопения увеличивает риск развития СПИД-ассоциированных заболеваний и госпитализации, приводит к ранней утрате трудоспособности и инвалидизации, грозит преждевременной смертью [8].

Причины нарушения регенерации CD4⁺ Т-клеток у получающих лечение ВИЧ-инфицированных лиц остаются не до конца понятными. Известно, что коинфекция вирусом гепатита С (ВГС) является значимым фактором риска развития этого феномена. Так, иммуноло-

гический неответ на АРТ встречается в 3,5 раза чаще у ВИЧ/ВГС коинфицированных больных, чем у пациентов без ВГС коинфекции [7].

Ранее мы показали, что у ВИЧ/ВГС коинфицированных субъектов пул периферических Т-лимфоцитов насыщен клетками, экспрессирующими ингибиторные рецепторы [10]. Их наличие на Т-лимфоцитах тесно связано с функциональным истощением [6]. Для истощенных Т-клеток характерна потеря способности к продукции цитокинов и пролиферации [11], что может объяснить низкую регенераторную способность лимфоцитов. Следует отметить, что у ВИЧ/ВГС коинфицированных больных фенотипические признаки истощения в виде экспрессии ингибиторных рецепторов на поверхности демонстрируют и CD4⁺, и CD8⁺ Т-клетки. Однако, в отличие от CD4⁺ Т-лимфоцитов, пул CD8⁺ Т-клеток увеличивается в размере на фоне

коинфекции ВГС [2]. При иммунологическом неответе на АРТ количество CD8⁺ Т-лимфоцитов также не снижается [2]. Очевидно, что истощенный фенотип клеток не в полной мере отражает их функциональное состояние. Для понимания роли истощения в нарушении регенерации Т-клеток у ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН необходимо исследовать не только фенотип Т-лимфоцитов, но и их способность к пролиферации и продукции цитокинов.

Целью настоящей работы было определение показателей функционального истощения CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ/ВГС коинфицированных иммунологических неответчиков на АРТ.

Проведение исследования было одобрено этическим комитетом Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № комитета IRB00008964). Каждый участник подписал информированное согласие. Включенные в исследование пациенты соответствовали следующим требованиям: подтвержденные диагнозы ВИЧ и ВГС инфекций, приверженность АРТ в течение двух и более лет, вирусная нагрузка ВИЧ менее 250 копий/мл (предел чувствительности тест-систем), отсутствие лечения интерферонами или анти-ВГС препаратами прямого действия.

Были сформированы три клинические группы:

– ВИЧ/ВГС коинфицированные иммунологические неответчики (ИН; n = 9) с числом CD4⁺ Т-лимфоцитов менее 350/мкл крови;

– ВИЧ/ВГС коинфицированные иммунологические ответчики (ИО; n = 9) с числом CD4⁺ Т-клеток более 500/мкл крови.

– относительно здоровые добровольцы (К; n = 9) без ВИЧ и ВГС инфекций.

Кровь объемом до 30 мл забирали натощак из кубитальной вены в вакуумные пробирки, содержащие литий гепарин (Weihai Hongyu Medical Devices Cj., Ltd., Китай).

Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования двукратно разведенной фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко (DPBS, Gibco; США) крови в градиенте плотности Диаколла (1,077 г/мл, Диаэм; Россия). Выделенные клетки собирали, дважды отмывали раствором DPBS, подсчитывали в камере Горяева, после чего подвергали контролируемому замораживанию в жидком азоте в среде, содержащей 90% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Gibco, Колумбия) и 10% диметилсульфоксида (AppliChem, Германия). Перед проведением исследования клетки размораживали.

Для фенотипического анализа истощенных клеток образцы окрашивали витальным красителем Zombie UV (Biolegend, США) и кок-

тейлем анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE, анти-CD8-BV510 и анти-PD1-PE антител (Biolegend, США). Окрашенные клетки анализировали с использованием проточного цитофлюориметра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США).

Для определения продуктивности деления стимулированных Т-лимфоцитов образцы окрашивали 5 мкМ 5,6-карбоксихлорофлуоресцеина диацетат-N-сукцинимидилового эфира (CFSE; Biolegend, США), дважды отмывали средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), содержащей 20% ЭТС, и затем стимулировали фитогемагглютинином (ФГА, Serva, Германия) в конечной концентрации 15 мкг/мл. Лейкоциты культивировали в полной питательной среде (ППС), содержащей RPMI-1640, 10% ЭТС, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Inc., США), в течение 7 суток (+37°C, 5% CO₂) с заменой культуральной среды на 3–4 сутки. По окончании времени инкубации клетки собирали и окрашивали анти-CD3-BV605, анти-CD4-PE и анти-CD8-BV510 антителами (Biolegend, США) и витальным красителем Zombie UV (Biolegend, США). Лейкоциты гейтировали согласно логике, представленной на рис. 1.

Для определения цитокин-продуцирующей способности Т-лимфоцитов из образцов выделяли CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки. Негативную селекцию проводили с использованием коммерческих наборов Dynabeads Untouched Human CD4 T cells (Invitrogen, США) и MagCelect Human CD8⁺ T Cell Isolation Kit (R&D Systems, Inc., США) согласно инструкциям производителей. Долю CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в пуле клеток, прошедших процедуру магнитной сепарации, оценивали на проточном цитофлюориметре CytoFLEX S с использованием моноклональных анти-CD3-PerCP, анти-CD4-BV605 и анти-CD8-APC-Fire750 антител (BioLegend, США). Чистота выделенных субпопуляций составила более 92%. Затем изолированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты стимулировали магнитными частицами Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco, США) и культивировали в ППС, в течение 72 ч (+37°C, 5% CO₂). Контролем служили нестимулированные клетки. По истечении времени инкубации собирали супернатанты, в которых определяли концентрации интерлейкина-2 (IL-2) методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора «Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ» (Вектор БЕСТ, Россия). Концентрацию цитокина выражали в нг/мл.

Статистический анализ и визуализацию данных проводили с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism 8» (GraphPad Software, США). Количественные данные в тексте и таблицах представлены в виде медиан и их

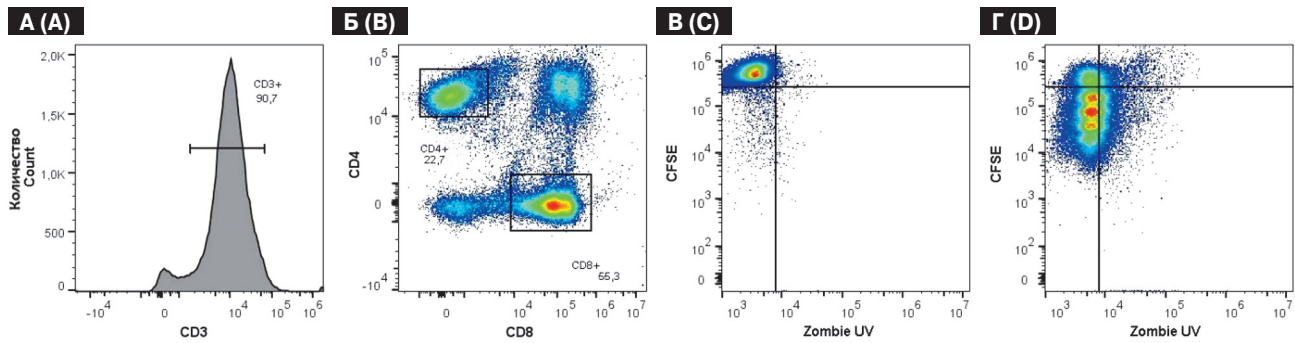


Рисунок 1. Логика гейтирования лейкоцитов при определении жизнеспособности делящихся Т-клеток
 Figure 1. Leukocyte gating logic for assessing the viability of dividing T-cells

Примечание. А — выделение CD3⁺ Т-клеток; Б — разделение Т-клеток на субпопуляции CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов; В — установка гейта в нестимулированном образце; Г — анализ одновременного окрашивания витальным красителем Zombie UV и трекинговым красителем CFSE стимулированного образца. Представлены типовые диаграммы светорассеяния.
 Note. А — isolation of CD3⁺ T-cells; Б — division of T-cells into CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte subsets; В — setting the gate in the unstimulated sample; Д — analysis of stimulated cells stained with vital dye Zombie UV and tracking dye CFSE. Typical light scattering diagrams are presented.

интерквартильных размахов; категориальные данные — в виде процентов. Для сравнения нескольких групп количественных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ; множественные сравнения между группами проводили с помощью критерия Тьюки. Для сравнения групп категориальных данных использовали критерий согласия Пирсона (χ^2). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез приняли равным 0.05.

Группы обследованных не имели статистически значимых отличий по возрасту, полу, продолжительности ВИЧ-инфекции и АРТ, а также вирусной нагрузке ВИЧ (табл. 1). Основным отличием между группами было количество CD4⁺ Т-клеток периферической крови в момент исследования.

Фенотипический анализ лейкоцитов *ex vivo* показал следующее (рис. 2). При ВИЧ/ВГС коин-

фекции в крови пациентов повышается относительное количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы PD-1. Величина пула PD-1-позитивных Т-лимфоцитов зависит от эффективности иммунологического ответа больных на АРТ: наиболее высокое процентное содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих PD-1, было выявлено в группе ИН. Поверхностную экспрессию молекулы PD-1 принято считать одним из ключевых маркеров истощения Т-лимфоцитов, которое ассоциировано с прогрессирующей потерей Т-клетками их эффекторных функций, в том числе способности к делению, продукции цитокинов и поддержанию жизнеспособности [3, 11].

На основании полученных нами результатов можно предположить наличие истощения пулов CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН. Вместе с тем оценка

Таблица 1. Клинические характеристики ВИЧ/ВГС коинфицированных и здоровых людей

Table 1. Clinical characteristics of HIV/HCV coinfected individuals and healthy controls

Параметры/Parameters	ИН/INR	ИО/IR	К/HC
Количество обследованных, n Number of participants, n	9	9	9
Возраст, лет Age, years	38,0 (32,0–40,5)	36,0 (34,5–42,0)	40,0 (32,5–43,5)
Женщины, % Women, %	22,2	44,4	44,4
Продолжительность АРТ, лет ART duration, years	6,0 (3,5–12,5)	4,0 (3,0–7,0)	–
Коинфекция ВГС, % HCV coinfection, %	100	100	0
Численность CD4 ⁺ Т-лимфоцитов, клеток/мкл CD4 ⁺ T-cell count, cells/ul	226 (188–303) P ₁₋₂ < 0,001 P ₁₋₃ < 0,001	538 (449–648) P ₂₋₃ < 0,05	682 (633–756)
Вирусная нагрузка ВИЧ, копий/мл HIV viral load, copies/ml	< 250	< 250	–

Примечание. указаны медианы и интерквартильные размахи. Группы количественных данных сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа; для множественных сравнений использовали критерий Тьюки. Группы категориальных данных сравнивали с помощью критерия согласия Пирсона (χ^2). ВИЧ — вирус иммунодефицита человека; ВГС — вирус гепатита С; АРТ — антиретровирусная терапия; ИН — иммунологические неответчики; ИО — иммунологические ответчики; К — контроль (здоровые доноры крови).
 Note. Medians and interquartile ranges are shown. Groups of quantitative data were compared using ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Groups of categorical data were compared using the Pearson's chi-square test (χ^2). HIV — human immunodeficiency virus; HCV — hepatitis C virus; ART — antiretroviral therapy; INR — immunological non-responders; IR — immunological responders; HC — healthy controls.

экспрессии единственного фенотипического маркера не позволяет определенно судить о функциональности Т-клеток. Молекула PD-1 временно экспрессируется на активированных лимфоцитах после получения ими сигнала через Т-клеточный рецептор [14]. Этот механизм отрицательной обратной связи защищает организм от чрезмерных и нежелательных реакций, и потому экспрессия PD-1 не может рассматриваться как однозначный признак истощения Т-лимфоцитов. Для подтверждения того, что у ИН увеличение доли PD-1-позитивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов свидетельствует об их истощении, были проведены дополнительные исследования жизнеспособности и цитокин-продуцирующей активности клеток, стимулированных в условиях *in vitro*.

Было установлено, что у ИН среди пролиферирующих в культуре лимфоцитов значительно увеличивается доля гибнущих Т-клеток (рис. 3). Примечательно, что это было характерно для CD4⁺ Т-лимфоцитов, но не для CD8⁺ Т-клеток.

Ранее в ходе культуральных исследований нами было установлено, что CD4⁺ Т-клетки ИН чаще, чем аналогичные лимфоциты ИО и К не запускают процесс деления после стимуляции митогенами, но остаются в состоянии покоя [1]. Более того, было показано, что у ИН CD4⁺ Т-лимфоциты, вступившие в организме в про-

цесс гомеостатической пролиферации, оказываются неспособны завершить его с образованием дочерних клеток [13]. Такое нарушение продуктивности деления сопровождается экспрессией генов, ассоциированных с апоптозом, и, в целом, с низкой жизнеспособностью пролиферирующих лимфоцитов [9, 13]. Перечисленные исследования были проведены на клетках ВИЧ моноинфицированных пациентов. Опираясь на данные настоящей работы, можно предположить, что схожие нарушения свойственны и Т-лимфоцитам ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН.

Мы исследовали способность CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток ВИЧ/ВГС коинфицированных пациентов с различной эффективностью регенерации иммунитета на фоне АРТ продуцировать IL-2 в ответ на стимуляцию *in vitro*. Оценка концентрации данного цитокина в супернатантах нестимулированных клеточных культур показала относительно невысокое его содержание, которое в среднем составило 0,012 нг/мл (0,012–0,013 нг/мл). Во всех клинических группах нестимулированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты секретируют почти одинаковое количество IL-2 ($p > 0,05$). На фоне стимуляции продукция данного цитокина Т-клетками увеличивалась в 1000 и более раз ($p < 0,001$). Во всех исследованных группах активированные CD4⁺ Т-лимфоциты являлись основными продуцен-

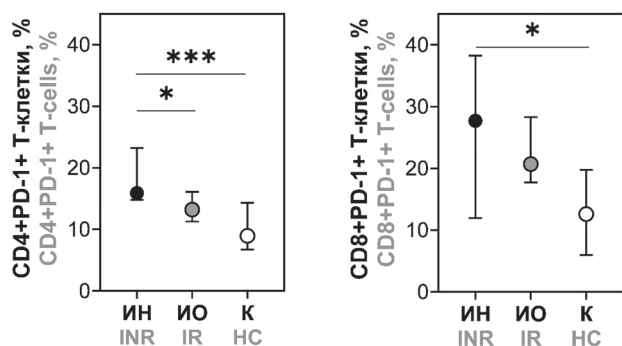


Рисунок 2. Процентное содержание PD-1-позитивных Т-лимфоцитов в периферической крови ВИЧ/ВГС коинфицированных больных с различной эффективностью регенерации иммунитета

Figure 2. Percentage of PD-1-positive T-lymphocytes in the peripheral blood of HIV/HCV coinfected patients with different levels of immune reconstitution efficiency

Примечание. Указаны медианы и интерквартильные размахи. ИН — иммунологические неответчики; ИО — иммунологические ответчики; К — контроль. * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

Note. Medians and interquartile ranges are shown. INR — immunological non-responders; IR — immunological responders; HC — healthy controls. * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$ (ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

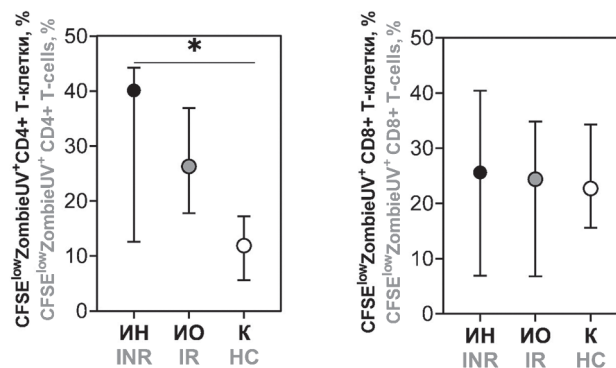


Рисунок 3. Склонность к гибели пролиферирующих Т-лимфоцитов ВИЧ/ВГС коинфицированных больных с различной эффективностью регенерации иммунитета

Figure 3. Susceptibility to death of proliferating T-lymphocytes in HIV/HCV coinfected patients with different levels of immune reconstitution efficiency

Примечание. Указаны медианы и интерквартильные размахи. ИН — иммунологические неответчики; ИО — иммунологические ответчики; К — контроль. * — $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

Note. Medians and interquartile ranges are shown. INR — immunological non-responders; IR — immunological responders; HC — healthy controls. * — $p < 0,05$ (ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

тами IL-2 и по сравнению с аналогичными CD8⁺ Т-клетками секретируют больше этого цитокина (рис. 4; $p < 0,001$). Важно отметить, что у ИН по сравнению с ИО и К была снижена продукция IL-2 стимулированными CD4⁺ Т-клетками ($p < 0,05$), но не CD8⁺ Т-лимфоцитами ($p > 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о том, что у ИН нарушена способность активированных CD4⁺ Т-клеток эффективно продуцировать IL-2.

Ранее нами было установлено [1], что Т-лимфоциты, выделенные из периферической крови ВИЧ моноинфицированных ИН и стимулированные в течение 5 сут. анти-CD3/анти-CD28 антителами, продуцируют меньше IL-2, чем Т-клетки ИО ($p > 0,05$) или К ($p < 0,01$). Снижение уровня продукции данного цитокина сопровождалось уменьшением доли CD4⁺ Т-лимфоцитов, поделившихся под действием стимулирующего агента. Опираясь на данные литературы о том, что аутокринное и паракринное действие IL-2, синтезируемого Т-клетками, необходимо для выполнения ими эффекторных функций таких как деление [5], мы предположили, что CD4⁺ Т-лимфоциты ИН снижают пролиферативную активность из-за дефицита IL-2. Однако на тот момент нам не удалось выявить субпопуляцию Т-клеток, в которой происходит нарушение продукции данного цитокина. В настоящем исследовании мы показали, что у ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН продукция IL-2 снижена именно в активированных CD4⁺ Т-клетках.

Истощение Т-лимфоцитов является препятствием в борьбе с хроническими заболеваниями, такими как ВИЧ-инфекция и гепатит С. Истощенные Т-клетки не могут эффективно бороться с вирусами, что способствует ускоренному развитию СПИД. Восстановление функциональности Т-клеток путем подавления экспрессии ингибиторных рецепторов и блокирования соответствующих сигнальных путей может быть перспективным методом терапии [4]. Однако необходимо убедиться, что клетки-мишени действительно истощены. В настоящем исследовании мы установили, что по сравнению с ИО и К среди периферических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН увеличена доля

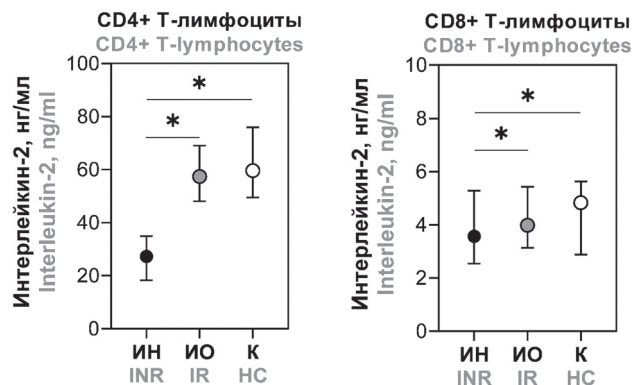


Рисунок 4. Содержание интерлейкина-2 в супернатантах стимулированных культур CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов ВИЧ/ВГС коинфицированных больных с различной эффективностью регенерации иммунитета

Figure 4. Interleukin-2 levels in supernatants of stimulated CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte cultures in HIV/HCV coinfected patients with different levels of immune reconstitution efficiency

Примечание. Указаны медианы и интерквартильные размахи. ИН — иммунологические неотвечки; ИО — иммунологические ответчики; К — контроль. * — $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим сравнением с помощью критерия Тьюки).

Note. Medians and interquartile ranges are shown. INR — immunological non-responders; IR — immunological responders; HC — healthy controls. * — $p < 0.05$ (ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test).

клеток с фенотипом, характерным для истощения. В то же время мы показали, что только у ИН делящиеся CD4⁺, но не CD8⁺ Т-клетки, характеризуются сниженной жизнеспособностью и цитокин-продуцирующей активностью. Таким образом, у ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН CD4⁺ Т-лимфоциты демонстрируют признаки фенотипического и функционального истощения, тогда как CD8⁺ Т-клетки, хотя и экспрессируют ингибиторные рецепторы, не проявляют признаков функциональных нарушений. По-видимому, разработка специализированной терапии ВИЧ/ВГС коинфицированных ИН должна быть сосредоточена на восстановлении функциональной активности CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Список литературы/References

1. Королевская Л.Б., Сайдакова Е.В. Нарушение функции CD4⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на антиретровирусную терапию // Российский иммунологический журнал. 2019. Т. 13, № 2. С. 329–331. [Korolevskaya L.B., Saidakova E.V. CD4⁺ T-lymphocyte function is violated in HIV-infected patients with discordant response to antiretroviral therapy. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology (Russia)*, 2019, vol. 13, no. 2, pp. 329–331. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210006617-3
2. Черешнев В.А., Шмагель К.В., Королевская Л.Б., Сайдакова Е.В., Шмагель Н.Г., Слободчикова С.В., Зверев С.Я., Таранин А.В. Влияние коинфекции вирусом гепатита С на активацию и апоптоз Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих антиретровирусную терапию // Иммунология. 2013. Т. 34, № 5. С. 236–241. [Chereshnev V.A., Shmagel K.V., Korolevskaya L.B., Saidakova E.V., Shmagel N.G., Slobodchikova S.V., Zverev S.Ya., Tarantin A.V. The impact of hepatitis C virus coinfection on immune recovery in HIV-infected patients during antiretroviral therapy. *Immunologiya = Immunology*, 2013, vol. 34, no. 5, pp. 236–241. (In Russ.)]

3. Ando S., Perkins C.M., Sajiki Y., Chastain C., Valanparambil R.M., Wieland A., Hudson W.H., Hashimoto M., Ramalingam S.S., Freeman G.J., Ahmed R., Araki K. mTOR regulates T cell exhaustion and PD-1-targeted immunotherapy response during chronic viral infection. *J. Clin. Invest.*, 2023, vol. 133, no. 2: e160025. doi: 10.1172/JCI160025
4. Benito J.M., Restrepo C., Garcia-Foncillas J., Rallon N. Immune checkpoint inhibitors as potential therapy for reverting T-cell exhaustion and reverting HIV latency in people living with HIV. *Front. Immunol.*, 2023, vol. 14: 1270881. doi: 10.3389/fimmu.2023.1270881
5. Chikuma S., Terawaki S., Hayashi T., Nabeshima R., Yoshida T., Shibayama S., Okazaki T., Honjo T. PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo. *J. Immunol.*, 2009, vol. 182, no. 11, pp. 6682–6689. doi: 10.4049/jimmunol.0900080
6. Grabmeier-Pfistershammer K., Steinberger P., Rieger A., Leitner J., Kohrgruber N. Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2011, vol. 56, no. 2, pp. 118–124. doi: 10.1097/QAI.0b013e3181fbab9f
7. Macias J., Pineda J.A., Lozano F., Corzo J.E., Ramos A., Leon E., Garcia-Garcia J.A., Fernandez-Rivera J., Mira J.A., Gomez-Mateos J. Impaired recovery of CD4+ cell counts following highly active antiretroviral therapy in drug-naive patients coinfecting with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2003, vol. 22, no. 11, pp. 675–680. doi: 10.1007/s10096-003-1015-2
8. Noiman A., Esber A., Wang X., Bahemana E., Adamu Y., Iroezindu M., Kiweewa F., Maswai J., Owuoth J., Maganga L., Ganesan A., Maves R.C., Lalani T., Colombo R.E., Okulicz J.F., Polyak C., Crowell T.A., Ake J.A., Agan B.K. Clinical factors and outcomes associated with immune non-response among virally suppressed adults with HIV from Africa and the United States. *Sci. Rep.*, 2022, vol. 12, no. 1: 1196. doi: 10.1038/s41598-022-04866-z
9. Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel N.G., Shmagel K.V., Chereshev V.A. T cell apoptosis in HIV-infected patients with incomplete immune recovery after antiretroviral therapy. *Dokl. Biol. Sci.*, 2013, vol. 450, pp. 189–191. doi: 10.1134/S0012496613030010
10. Vlasova V.V., Korolevskaya L.B., Loginova O.A., Shmagel N.G., Saidakova E.V. Functional exhaustion of CD4+ T cells in HIV/HCV coinfecting HAART-treated patients. *Medical Immunology (Russia)*, 2023, vol. 25, no. 4, pp. 837–844. doi: 10.15789/1563-0625-feo-2734
11. Wherry E.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, vol. 15, no. 8, pp. 486–499. doi: 10.1038/nri3862
12. Yang X., Su B., Zhang X., Liu Y., Wu H., Zhang T. Incomplete immune reconstitution in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapy: Challenges of immunological non-responders. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, vol. 107, no. 4, pp. 597–612. doi: 10.1002/JLB.4MR1019-189R
13. Younes S.A., Talla A., Pereira Ribeiro S., Saidakova E.V., Korolevskaya L.B., Shmagel K.V., Shive C.L., Freeman M.L., Panigrahi S., Zweg S., Balderas R., Margolis L., Douek D.C., Anthony D.D., Pandiyan P., Cameron M., Sieg S.F., Calabrese L.H., Rodriguez B., Lederman M.M. Cycling CD4+ T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction. *J. Clin. Invest.*, 2018, vol. 128, no. 11, pp. 5083–5094. doi: 10.1172/JCI120245
14. Youngblood B., Oestreich K.J., Ha S.J., Duraiswamy J., Akondy R.S., West E.E., Wei Z., Lu P., Austin J.W., Riley J.L., Boss J.M., Ahmed R. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8(+) T cells. *Immunity*, 2011, vol. 35, no. 3, pp. 400–412. doi: 10.1016/j.immuni.2011.06.015

Авторы:

Сайдакова Е.В., д.б.н., доцент, зав. лабораторией молекулярной иммунологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиала ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр Уро РАН, г. Пермь, Россия;

Королевская Л.Б., к.м.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиала ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр Уро РАН, г. Пермь, Россия;

Власова В.В., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиала ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр Уро РАН, г. Пермь, Россия;

Шмагель Н.Г., д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиала ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр Уро РАН, г. Пермь, Россия;

Шмагель К.В., д.м.н., зав. лабораторией экологической иммунологии «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиала ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр Уро РАН, г. Пермь, Россия.

Authors:

Saidakova E.V., DSc (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;

Korolevskaya L.B., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;

Vlasova V.V., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;

Shmagel N.G., DSc (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation;

Shmagel K.V., DSc (Medicine), Head of the Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation.

КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЛИНЕЙНЫЕ В-КЛЕТОЧНЫЕ ПЕПТИДЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А УСИЛИВАЮТ КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЦЕЛЬНОВИРИОННОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ

Т.С. Котомина, И.А. Сычев, А.Я. Рак, П.-Ф. Вон, А.В. Бажина, И.Н. Исакова-Сивак,
Л.Г. Руденко

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. *Введение.* Грипп представляет собой заболевание, вызываемое широко распространенным вирусом, обладающим пандемическим потенциалом. Зачастую люди, прошедшие вакцинацию против сезонного вируса гриппа, все же подвержены заболеванию, что свидетельствует о необходимости повышения иммуногенного потенциала существующих вакцин. При оценке эффективности действия вакцин против вируса гриппа в основном принимают во внимание иммунный ответ к одному вирусному антигену — молекуле гемагглютинаина. Тем не менее по данным доклинических и клинических исследований, нейраминидаза (NA) стимулирует кросс-протективный иммунитет, эффективный в отношении не только гомологичных, но и дрейфовых вариантов вируса гриппа А. *Материалы и методы.* В настоящем исследовании изучалась способность отобранных нами ранее консервативных линейных В-клеточных эпитопов NA (SGYSGK, SWPDGK, EECSCYPK, VELIRGRK) усиливать иммуногенность инактивированной цельновиральной гриппозной вакциной на основе модельного штамма PR8 (iPR8). Мышам линии BALB/c вводили iPR8 в комбинации с одним из пептидов внутримышечно три раза с интервалом в две недели. Образцы крови забирали через 14 дней после последней иммунизации, после чего мышей подвергали челлендж-инфекции вирусами гриппа неродственных подтипов H1N1pdm09 и H3N2. *Результаты.* У всех иммунизированных мышей наблюдалась индукция H1N1 (PR8)-специфических IgG антител спустя две недели после третьей иммунизации. В группе мышей, иммунизированных вакцинным препаратом iPR8 в комбинации с пептидом VELIRGRK, была выявлена наиболее выраженная индукция IgG антител к реассортантному штамму H6N1, NA которого соответствует вирусу iPR8, что указывает на способность пептида NA стимулировать выработку NA-специфических антител. Тем не менее выработанные после иммунизации антитела не были способны ингибировать ферментативную активность NA. Несмотря на это, мыши, иммунизированные iPR8 в комбинации с анти-NA пептидами, продемонстрировали более высокий уровень выживаемости после заражения гетерологичными вирулентными

Адрес для переписки:

Котомина Татьяна Сергеевна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (921) 979-28-99.
E-mail: kotomina@iemspb.ru

Contacts:

Tatiana S. Kotomina
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Academician
Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (921) 979-28-99.
E-mail: kotomina@iemspb.ru

Для цитирования:

Котомина Т.С., Сычев И.А., Рак А.Я., Вон П.-Ф., Бажина А.В., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г. Консервативные линейные В-клеточные пептиды нейраминидазы вируса гриппа А усиливают кросс-протективный потенциал инактивированной цельновиральной гриппозной вакцины // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 593–600. doi: 10.15789/2220-7619-CLB-16932

Citation:

Kotomina T.S., Sychev I.A., Rak A.Ya., Wong P.-F., Bazhina A.V., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G. Conserved linear B-cell peptides among the influenza a viral neuraminidases enhance the cross-protective potential of inactivated whole-virion influenza vaccine // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 593–600. doi: 10.15789/2220-7619-CLB-16932

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по проекту FGWG-2022-0001.
The study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the project FGWG-2022-0001.

© Котомина Т.С. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CLB-16932>

вирусами гриппа: A/California/07/09 (H1N1pdm09) и A/Philippines/2/82 (H3N2) по сравнению с группами PBS и iPR8. *Заключение.* Таким образом, в исследовании было продемонстрировано иммунопотенцирующее действие индивидуальных пептидов, соответствующих консервативным линейным эпитопам молекулы NA, при их добавлении к стандартной инактивированной гриппозной вакцине, что позволило расширить спектр защитного действия вакцины в отношении гетеросубтипических вирусов гриппа.

Ключевые слова: вирус гриппа, иммунный ответ, универсальная гриппозная вакцина, антинейраминидазные антитела, линейные B-клеточные эпитопы.

CONSERVED LINEAR B-CELL PEPTIDES AMONG THE INFLUENZA A VIRAL NEURAMINIDASES ENHANCE THE CROSS-PROTECTIVE POTENTIAL OF INACTIVATED WHOLE-VIRION INFLUENZA VACCINE

Kotomina T.S., Sychev I.A., Rak A.Ya., Wong P.-F., Bazhina A.V., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G.

Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, Russian Federation

Abstract. *Introduction.* Influenza is a disease caused by a widespread virus with pandemic potential. Frequently, individuals vaccinated against seasonal influenza virus are still susceptible to the disease, indicating the need to improve the immunogenic potential of existing vaccines. To assess the efficacy of influenza virus vaccines, immune response only to a single viral antigen — hemagglutinin molecule, is taken into consideration. However, according to preclinical and clinical studies, neuraminidase (NA) stimulates cross-protective immunity, which is effective against not only homologous but also drifted variants of influenza A virus. *Materials and methods.* In the present study, we investigated the ability of previously selected conserved linear B-cell NA epitopes (SGYSGK, SWPDGK, EECSCYPK, VELIRGRK) to enhance the immunogenicity of an inactivated whole-virion influenza vaccine based on the model strain PR8 (iPR8). BALB/c mice were injected with iPR8 in combination with one of the peptides intramuscularly three times at two-week intervals. Blood samples were collected 14 days after the last immunization, after which the mice were challenged with heterosubtypic influenza viruses H1N1pdm09 and H3N2. *Results.* All immunized mice showed induction of H1N1 (PR8)-specific IgG antibodies two weeks after the third immunization. The group of mice immunized with the iPR8 vaccine preparation in combination with VELIRGRK peptide showed the most pronounced induction of IgG antibodies to the H6N1 reassortant strain, the NA of which corresponds to the iPR8 virus, indicating the ability of the NA peptide to stimulate the production of NA-specific antibodies. However, the antibodies produced after immunization were not capable to inhibit the NA enzymatic activity. Despite this, mice immunized with iPR8 in combination with anti-NA peptides showed a higher survival rate after infection with heterologous virulent influenza viruses: A/California/07/09 (H1N1pdm09) and A/Philippines/2/82 (H3N2) compared to the PBS and iPR8 groups. *Conclusion.* Thus, the study demonstrated the immune-potentiating effect of individual peptides corresponding to conservative linear epitopes of the NA molecule in combination with a standard inactivated influenza vaccine, which made it possible to improve the protective effect of the vaccine against heterosubtypic influenza viruses.

Key words: influenza A virus, immune response, universal influenza vaccine, heterosubtypic immune response, antineuraminidase antibodies, linear B-cell epitopes.

Введение

Противогриппозные вакцины остаются главным инструментом систем общественного здравоохранения для снижения бремени сезонной заболеваемости гриппозными инфекциями у населения. Большинство существующих инактивированных и живых аттенуированных вакцин направлено на индукцию штамм-специфических нейтрализующих антител против главного поверхностного антигена вируса гриппа — молекулы гемагглютинина (HA), при этом такие антитела не являются долгоживущими [3, 17]. Для преодоления проблемы узкой специфичности гриппозных вакцин во всем мире проводятся исследования по разработке универсальной вакцины, способной обеспечивать защиту против широкого круга эволюционно удаленных вирусов гриппа. Настоящее

исследование направлено на поиск новых подходов для усиления кросс-протективных свойств традиционных противогриппозных вакцин за счет направленной индукции антител к консервативным эпитопам вируса гриппа. Ранее в результате проведения комплексного биоинформатического анализа нами были отобраны линейные эпитопы нейраминидазы (NA), высококонсервативные среди всех вирусов гриппа типа А. Иммунизация мышей индивидуальными пептидами, соответствующими найденным эпитопам, конъюгированными с белковыми носителями (овальбумин или гемоцианин лимфы улитки), приводила к индукции NA-специфических антител, однако эти уровни не позволяли достичь желаемого эффекта защиты при заражении иммунизированных мышей летальными челлендж-вирусами [2]. В литературных источниках описана стратегия

усиления кросс-протективных свойств гриппозных вакцин за счет добавления к живой или инактивированной вакцине пептидов, соответствующих консервативным эпитопам вируса гриппа [10, 12, 15, 16, 19]. Соответственно, основной целью настоящего исследования явилась оценка иммунопотенцирующего действия отобранных нами ранее консервативных линейных эпитопов вируса гриппа А при их добавлении к стандартной цельновирионной инактивированной гриппозной вакцине.

Материалы и методы

Консервативные пептиды NA. В работе использовали пептиды NA, соответствующие описанным ранее последовательностям консервативных линейных В-клеточных эпитопов [1]:

1. SGYSGK (Vir-4);
2. SWPDGK (Vir-5);
3. EECSCYPK (Vir-6);
4. VELIRGRK (Vir-7).

Пептиды были химически синтезированы твердофазным методом (SPPS) [9] по методике, описанной ранее [1]. Концентрацию пептидов определяли с помощью спектрофотометрического анализа при длинах волн 280 нм или 214 нм, в зависимости от наличия в составе молекулы пептида остатков тирозина или триптофана. Коэффициенты молярной экстинкции использовались для определения концентрации пептидов.

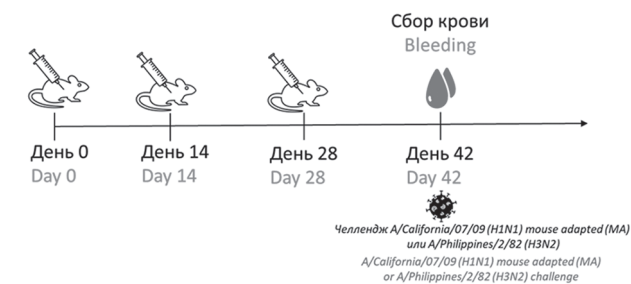
Подготовка препарата инактивированной гриппозной вакцины. Для подготовки препарата инактивированной гриппозной вакцины (ИГВ) модельный вирус гриппа штамма A/Puerto Rico/8/1934 (A/PR/8/34, H1N1) накапливали в 10–12 дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) и концентрировали путем ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы 30–60% по стандартной методике [18]. Далее вируссодержащую жидкость инактивировали с помощью добавления 0,02% формалина и инкубации при +4°C в течение 48 часов. Эффективность инактивации вируса гриппа оценивали на основании заражения РКЭ, а также двух дополнительных слепых пассажей, в результате которых не было выявлено жизнеспособного вируса. Препарат инактивированной вакцины обозначали как iPR8, концентрацию белка в препарате измеряли при помощи набора Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) по инструкции производителя.

Эксперименты на животных. Для эксперимента по оценке кросс-протективного действия iPR8 с добавлением пептидов NA использовали самок мышей линии BALB/c в возрасте 4–6 недель, поставляемых из питомника

Филиал Столбовая ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Иммунизацию животных осуществляли по схеме, описанной в работе Oh и соавт. [16]. Одна вакцинная доза состояла из препарата iPR8 в концентрации 5 мкг в комбинации с 20 мкг одного из пепетидов NA, разведенных в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS). В исследование были включены две контрольные группы, одной вводили iPR8 в концентрации 5 мкг, вторая получала раствор PBS. Иммунизация производилась внутримышечно в объеме 100 мкл, трехкратно с интервалом в 14 дней, без адъюванта. Состав экспериментальных групп и схема проведения эксперимента представлены на рис. 1.

Через 2 недели после третьей иммунизации по 5–6 мышей из каждой группы подвергали экспериментальному заражению гетерологичными вирулентными вирусами гриппа: A/California/07/09 (H1N1pdm09) mouse adapted (Ca09 MA) или A/Philippines/2/82 (H3N2). Мышей заражали интраназально вирусами в дозе 10 ЛД₅₀ (50%-ная мышьяная летальная доза) в объеме 50 мкл под легким эфирным наркозом. Оценку выживаемости и измерение массы тела производили ежедневно в течение 14 дней после заражения.

Оценка гуморального иммунного ответа методом иммуноферментного анализа (ИФА). ИФА проводили общепринятым методом. Планшеты с высокой сорбционной способностью (SPL Lifesciences, Южная Корея) покрывали виру-



№ Группы № Group	Иммунизация (n=6) Immunization (n=6)
1	PBS (nonimmunized)
2	iPR8
3	iPR8+Vir4
4	iPR8+Vir5
5	iPR8+Vir6
6	iPR8+Vir7

Рисунок 1. Схема проведения эксперимента на мышах линии BALB/c по изучению иммуногенности вакцинных препаратов iPr8+Vir и выживаемости мышей после заражения вирулентными вирусами гриппа

Figure 1. Study designs and timelines for experiment in BALB/c mice

сом А/PR/8/34 (H1N1) в концентрации 16 геммагглютинирующих единиц (ГАЕ) в объеме 50 мкл/лунку. Сорбцию проводили в карбонат-бикарбонатный буфере (КББ, рН 9,6) в течение 16 часов при 4°C. Затем лунки планшетов промывали три раза промывочным буфером PBS с 0.05% Твин-20 (PBST) и подвергали обработке раствором 5% бычьего сывороточного альбумина в течение одного часа при 37°C. Нативные сыворотки мышей, собранные спустя две недели после третьей иммунизации, разводили в соотношении 1:50 в PBS и прогревали при 56°C в течение часа для снижения негативного влияния факторов системы комплимента на результаты анализа. Планшеты промывали три раза PBST и добавляли по 50 мкл двукратно разведенных в PBS сывороток крови, начиная с разведения 1:100, и инкубировали 1 час при 37°C. Использовали конъюгат козьих поликлональных антимышиных IgG антител (BioRad, США) в разведении 1:3000 и инкубировали 45 минут при 37°C. После четырех отмывок планшета PBST буфером детекцию связывания антител с антигеном проводили с использованием субстрата 1-Step Ultra TBM-Elisa Solution (Thermo Fisher, США). Реакцию останавливали путем добавления 25 мкл 1М H₂SO₄ и измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) на спектрофотометре xMark (BioRad, США). За титр антител принимали наибольшее разведение сыворотки, при котором значение ОП₄₅₀ выше, чем усредненное двукратное значение ОП₄₅₀ в контрольных лунках без добавления сыворотки (2 × ОП₄₅₀). Также экспериментальные группы сравнивали по численным показателям площади под кривой зависимости оптической плотности ОП₄₅₀ от разведений сывороток. В данном случае уровень IgG представляли в виде параметра AUC (area under curve) и выражали в условных единицах.

Реакция ингибирования нейраминидазной активности (РИНА). С помощью данной процедуры выявляли антитела, присутствующие в сыворотках крови мышей через две недели после третьей иммунизации, которые были способны ингибировать нейраминидазную активность вирусов гриппа. Образцы сывороток предварительно обрабатывали реагентом RDE (Denka Seiken, Япония) по инструкции производителя для нивелирования эффекта неспецифического ингибирования. Процедуру РИНА делали по методике, описанной в статье Desheva и соавт. [7].

Статистическая обработка результатов. Анализ данных проводили при помощи программы GraphPad Prism Version 8.0 (GraphPad Software, США). Сравнения показателей выживаемости проводили попарно в группах

PBS, iPR8 и iPR8+Vir с помощью лог-ранг-теста Мантела–Кокса. Значения считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Сравнения показателей AUC проводились помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки.

Результаты

Защитная эффективность ИГВ при добавлении пептидов NA. Было показано, что добавление к препарату iPR8 пептидов SWPDGK (Vir-5), EECSCYPK (Vir-6), VELIRGRK (Vir-7) приводило к существенному повышению уровня выживаемости мышей после заражения вирусом Cal09 MA, в сравнении с группой животных, иммунизированных только вакциной iPR8 (рис. 2А). При заражении гетерологичным вирусом H3N2 в контрольных группах PBS и iPR8 выживаемость составила 17–20%, тогда как в группах iPR8+Vir-5, iPR8+Vir-6 и iPR8+Vir-7 выжило около 50–60% зараженных мышей (рис. 2Б). Следует заметить, что добавление к инактивированной вакцине аналогичного количества пептида SGYSGK (Vir-4) не приводило к существенному усилению защитных свойств iPR8 (рис. 2). Таким образом, сочетанная иммунизация мышей препаратом ИГВ и пептидами, соответствующими консервативным эпитопам нейраминидазы SWPDGK, EECSCYPK, VELIRGRK, позволила расширить кросс-протективный потенциал ИГВ. Далее были проведены эксперименты по выявлению факторов иммунитета, которые способствовали расширению спектра защитного действия стандартной инактивированной гриппозной вакцины.

Иммуногенность исследуемых вакцинных препаратов. В экспериментальных группах iPR8+Vir иммунизированные мыши вырабатывали специфические IgG антитела к вирусу гриппа PR8 на одном уровне с группой сравнения iPR8 (рис. 3А). Эти данные указывают на отсутствие существенного влияния добавленных пептидов NA на суммарную выработку вирусспецифических IgG антител, связывающихся со всеми антигенами вируса гриппа, поскольку в качестве подложки использовался гомологичный цельный вирус гриппа PR8. С целью выявления различий в индукции NA-специфических антител между экспериментальными группами сыворотки иммунизированных мышей также изучались в ИФА к вирусу гриппа H6N1, у которого NA была заимствована от штамма PR8, а иммунодоминантный антиген (молекула NA) принадлежал неродственному вирусу птичьего гриппа А/Н6N1, что снизит вероятность связывания NA-специфических антител в ИФА. Как следует из приведенных результатов на рис. 3Б, включение в состав вак-

цинного препарата iPR8 пептида Vir7 привело к индукции статистически значимо более высоких значений IgG антител по сравнению с группой iPR8. Иммунизация мышей вакцинным препаратом iPR8+Vir4 приводило к менее выраженной выработке специфических IgG антител к вирусу H6N1 по сравнению с остальными группами iPR8+Vir. Из представленных данных следует, что добавление пептида VELIRGRK к препарату ИГВ существенно повышало выработку NA-связывающих антител у мышей, возможно, за счет индукции антител к целевому консервативному эпитопу NA.

Для проверки гипотезы о том, что выработанные в организме иммунизированных мышей анти-NA антитела способны ингибировать нейраминидазную активность вируса гриппа, был проведен специфический лектин-ферментативный анализ, используя реассортантный штамм H6N1, несущий NA от вируса PR8. В настоящем исследовании не было выявлено достоверных данных о способности сывороток крови иммунизированных мышей ингибировать NA активность вируса H6N1, как в группах iPR8, так и экспериментальных группах iPR8+Vir

(данные не представлены). Эти результаты указывают на неспособность инактивированной вакцины вырабатывать высокие уровни NA-ингибирующих антител, и защитный эффект NA-связывающих антител может быть обусловлен стерическими эффектами, препятствуя вирусу проникать в клетку на этапе инфицирования, а не на этапе отпочковывания созревших вирионов.

Обсуждение

К наиболее иммуногенным антигенам вируса гриппа относят оболочечные гликопротеины — гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA). На поверхности вирусной частицы содержится большее количество HA, а количество NA составляет лишь 10–20% от количества HA. Оба белка жизненно необходимы вирусу гриппа, так HA обеспечивает проникновение вируса в клетки путем связывания с сиаловыми молекулами, расположенными на поверхности клеток. NA ферментативно расщепляет остатки сиаловых кислот, что позволяет вирусу проникнуть в клетку-мишень и эффективно высво-

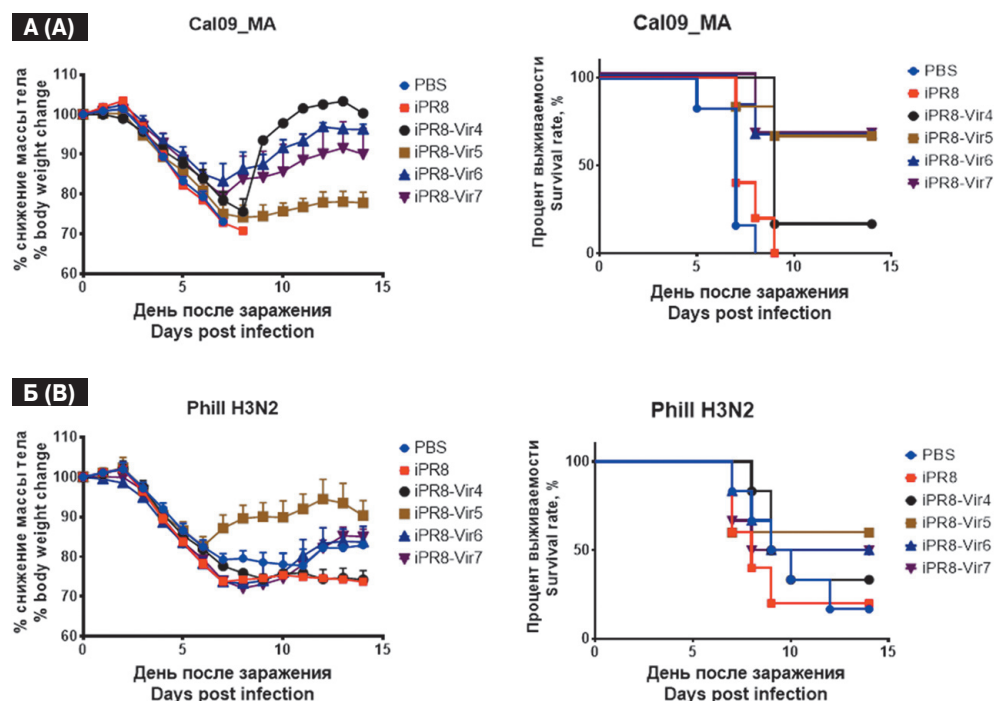


Рисунок 2. Динамика снижения массы тела и выживаемость интактных мышей (PBS) и мышей, иммунизированных инактивированной вакциной iPR8 либо индивидуально, либо в комбинации с одним из указанных пептидов NA: SGYSGK (Vir-4), SWPDGK (Vir-5), EECSCYPK (Vir-6) и VELIRGRK (Vir-7), после челленджа вирулентным вирусом гриппа A/California/7/09 mouse-adapted (H1N1pdm09) (А) и A/Philippines/2/82 X-79 (H3N2) (Б)

Figure 2. Dynamics of body weight loss and survival rate of nonimmunized BALB/c mice (PBS) and BALB/c mice immunized with inactivated iPR8 vaccine individually or in combination with one of the B-cell neuraminidase peptides: SGYSGK (Vir-4), SWPDGK (Vir-5), EECSCYPK (Vir-6) and VELIRGRK (Vir-7). Animals were monitored for 14 days after challenge with mouse-adapted virulent influenza virus strain A/California/7/09 mouse-adapted (H1N1pdm09) (A) and A/Philippines/2/82 X-79 (H3N2) (B)

бождать вновь синтезированные вирионы [5, 8]. В естественных условиях гриппозная инфекция приводит к выработке специфических анти-НА и анти-НА антител [11]. Тем не менее главной мишенью при создании вакцин является именно гемагглютинин. Однако не только высокая корреляция нейтрализующих антител к НА свидетельствует о защитном эффекте вакцинации. В литературных источниках указывается на то, что анти-НА антитела, ингибирующие активность НА, являются независимыми коррелятами иммунной защиты [6, 13, 14]. Таким образом, разработка вакцин, направленных на индукцию антител к НА, заслуживает внимания. В рамках исследования были синтезированы пептиды, последовательность которых соответствовала коротким консервативным линейным В-клеточным эпитопам НА. Поскольку короткие пептиды, самостоятельно

используемые для иммунизации, являются слабоиммуногенными, для повышения иммуногенности и выработки В-клеточного иммунного ответа предложено было использовать сочетанное введение отобранных пептидов вместе с цельновирионной инактивированной гриппозной вакциной на основе модельного штамма PR8. Цельновирионная инактивированная вакцина использовалась в данном исследовании из-за показанной в некоторых исследованиях адъювантной способности в виде одноцепочечной молекулы РНК связывать молекулы TLR7, одного из индукторов кросс-протективного эффекта [4].

Трехкратная иммунизация мышей линии BALB/c пептидами Vir в комбинации с iPR8 повышала выживаемость мышей после заражения вирулентными вирусами гомологичного и гетерологичного подтипа по сравнению с груп-

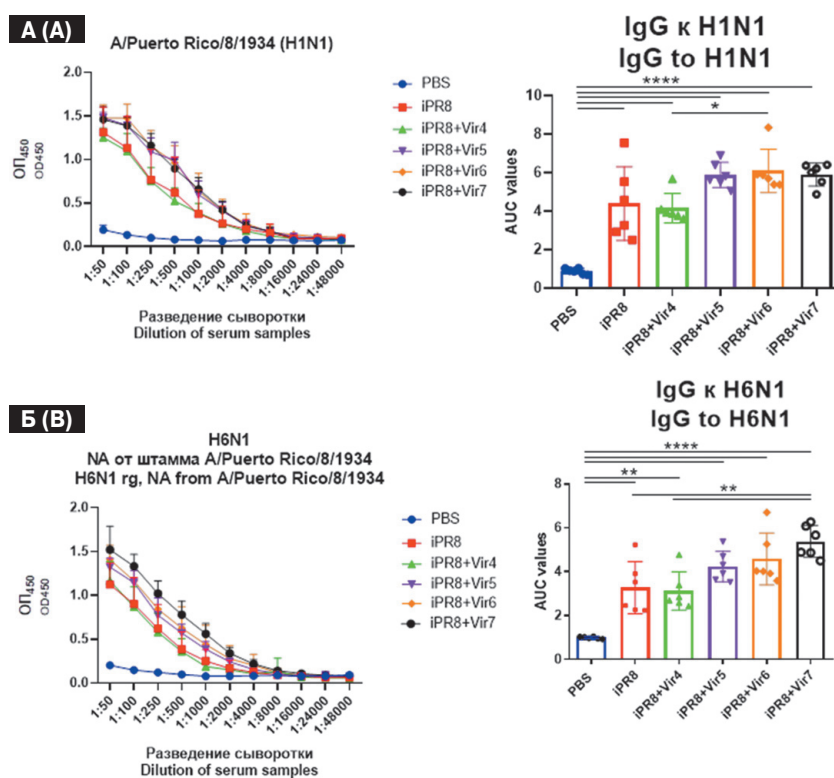


Рисунок 3. Анализ иммуногенности вакцинных препаратов iPR8, iPR8+Vir после иммунизации мышей BALB/c

Figure 3. Analysis of serum IgG antibody levels of BALB/c mice after triple immunization

Примечание. А. Иммуногенность в отношении гомологичного штамма A/Puerto Rico/8/1934. Зависимость оптической плотности OP_{450} в разведенных образцах сыворотки крови для каждой экспериментальной группы. Показатель AUC используется для проведения статистической обработки уровней IgG антител в разных группах Б. Иммуногенность в отношении гетерологичного штамма вируса гриппа H6N1, полученным методами обратной генетики на основе донора аттенуации штамм A/Ленинград/134/17/57, в котором HA идентичен штамму A/серебристая чайка/Сарма/51с/2006 (H6N1), а NA — штамму A/Puerto Rico/8/1934. Данные проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с тестом множественных сравнений Тьюки. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Note. A. Immunogenicity against the homologous strain A/Puerto Rico/8/1934. AUC is used to perform statistical treatment of IgG antibody levels in different experimental groups B. Immunogenicity against a heterologous H6N1 influenza virus strain obtained by reverse genetics based on master donor strain A/Leningrad/134/17/57, in which HA is identical to strain A/Silver Gull/Sarma/51c/2006 (H6N1) and NA to strain A/Puerto Rico/8/1934. Data were analyzed using one-factor analysis of variance (one-way ANOVA) with Tukey's multiple comparisons test * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

пами iPR8 и PBS. При изучении иммуногенности было показано, что иммунизация мышей приводила к выработке штамм-специфических IgG-антител во всех экспериментальных группах кроме PBS. При этом выработка H6N1-специфических IgG-антител в группе iPR8+Vir7 была статистически значимо выше по сравнению с группой iPR8. Выбор антигена H6N1 в данном случае позволяет нивелировать вклад в иммуногенность NA-специфических IgG антител. В дальнейшем целесообразно использовать в качестве подложки отдельные NA пептиды, которые относятся к разным подтипам вируса гриппа.

Следует отметить, что результаты анализа реакции ингибирования нейраминидазной активности с вирусным антигеном H6N1 показали отсутствие индукции антител, ингибирующих ферментативную активность NA. Вероятно, усиленный протективный эффект при добавлении пептида VELIRGRK к инактивированной вакцине iPR8 был обусловлен выработкой NA-связывающих IgG антител, препятствующих

развитию гриппозной инфекции по механизму, не связанному с ингибированием ферментативной активности NA. Тем не менее требуются дополнительные исследования по оценке NA-специфических антител как в стандартном иммуноферментном анализе, так и в реакции ингибирования NA активности при использовании либо рекомбинантных препаратов NA, либо индивидуальных пептидов NA, соответствующих консервативным В-клеточным эпитопам данного белка.

Таким образом, в настоящей работе мы продемонстрировали иммунопотенцирующее действие индивидуальных пептидов, соответствующих консервативным линейным эпитопам молекулы NA, при их добавлении к стандартной инактивированной гриппозной вакцине. Соответственно, в перспективе наиболее иммуногенные эпитопы NA могут быть использованы как мишень для разработки универсальной гриппозной вакцины, используя различные системы доставки, такие как вирусные векторы или молекулы мРНК.

Список литературы/References

1. Сычев И.А., Копейкин П.М., Цветкова Е.В., Чередова К.В., Мильман Б.Л., Шамова О.В., Исакова-Сивак И.Н., Дешева Ю.А. Индукция перекрестно-реактивных антител у мышей, иммунизированных консервативными линейными В-клеточными эпитопами нейраминидазы вируса гриппа А // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 463–472. [Sychev I.A., Kopeikin P.M., Tsvetkova E.V., Cheredova K.V., Milman B.L., Shamova O.V., Isakova-Sivak I.N., Desheva Y.A. Induction of crossreactive antibodies in mice immunized with conserved influenza A virus neuraminidase-derived linear B-cell epitopes. *Infectsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 463–472. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IOC-1343
2. Сычев И.А., Копейкин П.М., Цветкова Е.В., Шамова О.В., Дешева Ю.А., Исакова-Сивак И.Н. Перспективы использования консервативных линейных В-клеточных эпитопов нейраминидазы вируса гриппа А для индукции кросс-протективного иммунного ответа // Медицинский академический журнал. 2021. Т. 21, № 3. С. 147–151. [Sychev I.A., Kopeikin P.M., Tsvetkova E.V., Shamova O.V., Desheva Y.A., Isakova-Sivak I.N. Prospects of using conservative linear B-cell epitopes of influenza virus A neuraminidase for induction of cross-protective immune response. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2021, vol. 21, no. 3, pp. 147–151. (In Russ.)] doi: 10.17816/MAJ76614
3. Andrews S.F., Graham B.S., Mascola J.R., McDermott A.B. Is It Possible to Develop a “Universal” Influenza Virus Vaccine? Immunogenetic Considerations Underlying B-Cell Biology in the Development of a Pan-Subtype Influenza A Vaccine Targeting the Hemagglutinin Stem. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2018, vol. 10, no. 7: a029413. doi: 10.1101/cshperspect.a029413
4. Budimir N., de Haan A., Meijerhof T., Waijer S., Boon L., Gostick E., Price D.A., Wilschut J., Huckriede A. Critical role of TLR7 signaling in the priming of cross-protective cytotoxic T lymphocyte responses by a whole inactivated influenza virus vaccine. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 5: e63163. doi: 10.1371/journal.pone.0063163
5. Byrd-Leotis L., Cummings R.D., Steinhauer D.A. The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 7: 1541. doi: 10.3390/ijms18071541
6. Couch R.B., Atmar R.L., Franco L.M., Quarles J.M., Wells J., Arden N., Niño D., Belmont J.W. Antibody correlates and predictors of immunity to naturally occurring influenza in humans and the importance of antibody to the neuraminidase. *J. Infect. Dis.*, 2013, vol. 207, no. 6, pp. 974–981. doi: 10.1093/infdis/jis935
7. Desheva Y., Smolonogina T., Donina S., Rudenko L. Study of Neuraminidase-Inhibiting Antibodies in Clinical Trials of Live Influenza Vaccines. *Antibodies (Basel)*, 2020, vol. 9, no. 2: 20. doi: 10.3390/antib9020020
8. Dou D., Revol R., Östbye H., Wang H., Daniels R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.*, 2018, no. 9: 1581. doi: 10.3389/fimmu.2018.01581
9. Fmoc solid phase peptide synthesis. A Practical Approach. Eds: W.C. Chan, P.D. White. Oxford: Oxford University Press, 2000. 346 p.
10. Kim M.C., Lee Y.N., Ko E.J., Lee J.S., Kwon Y.M., Hwang H.S., Song J.M., Song B.M., Lee Y.J., Choi J.G., Kang H.M., Quan F.S., Compans R.W., Kang S.M. Supplementation of influenza split vaccines with conserved M2 ectodomains overcomes strain specificity and provides long-term cross protection. *Mol. Ther.*, 2014, vol. 22, no. 7, pp. 1364–1374. doi: 10.1038/mt.2014.33
11. Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nat. Rev. Immunol.*, 2019, vol. 19, no. 6, pp. 383–397. doi: 10.1038/s41577-019-0143-6
12. Lee Y.T., Kim K.H., Ko E.J., Kim M.C., Lee Y.N., Hwang H.S., Lee Y., Jung Y.J., Kim Y.J., Santos J., Perez D.R., Kang S.M. Enhancing the cross protective efficacy of live attenuated influenza virus vaccine by supplemented vaccination with M2 ectodomain virus-like particles. *Virology*, 2019, vol. 529, pp. 111–121. doi: 10.1016/j.virol.2019.01.017

13. Memoli M.J., Shaw P.A., Han A., Czajkowski L., Reed S., Athota R., Bristol T., Fargis S., Riso K., Powers J.H., Davey R.T.Jr., Taubenberger J.K. Evaluation of anti-hemagglutinin and antineuraminidase antibodies as correlates of protection in an influenza A/H1N1 virus healthy human challenge model. *mBio*, 2016, vol. 7, no. 2: e00417-16. doi: 10.1128/mBio.00417-16
14. Monto A.S., Petrie J.G., Cross R.T., Johnson E., Liu M., Zhong W., Levine M., Katz J.M., Ohmit S.E. Antibody to Influenza Virus Neuraminidase: An Independent Correlate of Protection. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 212, no. 8, pp. 1191–1199. doi: 10.1093/infdis/jiv195
15. Music N., Reber A.J., Kim M.C., York I.A., Kang S.M. Supplementation of H1N1pdm09 split vaccine with heterologous tandem repeat M2e5x virus-like particles confers improved cross-protection in ferrets. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 4, pp. 466–473. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.12.023
16. Oh J., Subbiah J., Kim K.H., Park B.R., Bhatnagar N., Garcia K.R., Liu R., Jung Y.J., Shin C.H., Seong B.L., Kang S.M. Impact of hemagglutination activity and M2e immunity on conferring protection against influenza viruses. *Virology*, 2022, vol. 574, pp. 37–46. doi: 10.1016/j.virol.2022.07.010
17. Ostrowsky J., Arpey M., Moore K., Osterholm M., Friede M., Gordon J., Higgins D., Molto-Lopez J., Seals J., Bresee J. Tracking progress in universal influenza vaccine development. *Curr. Opin. Virol.*, 2020, vol. 40, pp. 28–36. doi: 10.1016/j.coviro.2020.02.003
18. Rudenko L., Isakova-Sivak I., Naykhin A., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Korenkov D., Matyushenko V., Sparrow E., Kieny M.P. H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2016, vol. 16, no. 3, pp. 303–310. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00378-3
19. Song B.M., Kang H.M., Lee E.K., Jung S.C., Kim M.C., Lee Y.N., Kang S.M., Lee Y.J. Supplemented vaccination with tandem repeat M2e virus-like particles enhances protection against homologous and heterologous HPAI H5 viruses in chickens. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 5, pp. 678–686. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.11.074

Авторы:

Котомина Т.С., к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Сычев И.А., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Рак А.Я., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Вон П.-Ф., аспирант отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Бажина А.В., лаборант лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Исакова-Сивак И.Н., член-корреспондент РАН, д.б.н., зав. лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Руденко Л.Г., д.м.н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kotomina T.S., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Sychev I.A., Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Rak A.Ya., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Wong P.-F., PhD Student, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Bazhina A.V., Laboratory Assistant, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Isakova-Sivak I.N., RAS Corresponding Member, DSc (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Prevention of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Rudenko L.G., DSc (Medicine), Professor, Head of A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОНСЕРВАТИВНОСТИ ИММУНОГЕННЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ ЭПИТОПОВ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСОВ-ДОНОРОВ ДЛЯ ЖИВЫХ И ИНАКТИВИРОВАННЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

А.Я. Рак, Л.Г. Руденко, И.Н. Исакова-Сивак

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Антиген-специфические Т-клетки являются важным звеном противовирусного иммунитета при гриппозной инфекции, и современные вакцины разрабатываются как возможные индукторы данного звена иммунитета. Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) является мощным стимулятором Т-клеточного иммунитета ввиду ее способности вызывать продуктивную инфекцию в верхних дыхательных путях. Инактивированные гриппозные вакцины (ИГВ) и новые разрабатываемые вакцинные кандидаты также могут вызывать образование вирус-специфических Т-клеток при использовании соответствующих адъювантов. При этом основной мишенью для развития Т-клеточного иммунитета являются неструктурные и внутренние антигены вакцинного донора, в частности нуклеопротеин (НР). Наиболее часто используемые в мире штаммы-доноры для ЖГВ и ИГВ были получены на основе вирусов, выделенных с 1933 по 1960 год. В связи с этим актуален вопрос о консервативности эпитопов, иммуногенных для CD8⁺ Т-лимфоцитов (ЦТЛ-эпитопов), в НР белках вакцинных доноров, то есть о способности Т-киллеров, специфичных к «донорному» НР, к распознаванию нуклеопротеинов актуальных штаммов вируса гриппа А. Целью исследования явилась оценка консервативности иммуногенных ЦТЛ-эпитопов НР белка вирусов-доноров подтипов H1N1 и H2N2, традиционно используемых для создания ЖГВ и ИГВ. **Материалы и методы.** Иммуноэпитопный анализ *in silico* НР белков был проведен для 1614 и 1767 штаммов вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2, соответственно, циркулировавших в 2009–2023 гг. (по данным NCBI Influenza Virus Database), в сравнении с донорами аттенуации и высокой репродуктивности А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), А/Ann Arbor/6/60 (H2N2), А/PR/8/34 (H1N1) и А/WSN/1933 (H1N1). Для этого использовалась база данных Immune Epitope Database (IEDB, www.iedb.org), встроенный алгоритм предсказания ЦТЛ-эпитопов NetCTL и инструмент предсказания сайтов протеолиза NetChop. Картирование эпитопов, содержащих не более 1 сайта протеолиза, на аминокислотные последовательности НР антигена проводили с помощью алгоритма выравнивания ClustalO в программе JalView 2.8.1. Иммуногенность и консервативность отобранных эпитопов далее оценивали с помощью инструментов IEDB T-cell Immunogenicity predictor tool и Epitope Conservancy Assay, соответственно. **Результаты.** Было установлено, что большинство обнаруженных иммуногенных ЦТЛ-эпитопов НР белка вирусов-доноров для ЖГВ и ИГВ не встречается

Адрес для переписки:

Рак Александра Яковлевна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (950) 005-18-37.
E-mail: rak.ay@iemspb.ru

Contacts:

Alexandra Ya. Rak
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Akademika Pavlova str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (950) 005-18-37.
E-mail: rak.ay@iemspb.ru

Для цитирования:

Рак А.Я., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. Сравнительный анализ консервативности иммуногенных Т-клеточных эпитопов нуклеопротеина вирусов-доноров для живых и инактивированных гриппозных вакцин // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 601–608. doi: 10.15789/2220-7619-CAO-16660

Citation:

Rak A.Ya., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N. Comparative analysis of the conservation of nucleoprotein immunogenic T-cell epitopes of master donor viruses for live and inactivated influenza vaccines // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 601–608. doi: 10.15789/2220-7619-CAO-16660

Работа выполнена по теме проекта «Создание бивалентной вакцины против SARS-CoV-2 и гриппа с использованием новой технологической платформы», поддержанного грантом Российского научного фонда № 21-75-30003.

The work was performed under the project "Creation of bivalent vaccine against SARS-CoV-2 and influenza using a new technological platform", supported by the Russian Science Foundation grant No. 21-75-30003.

в последовательностях NP циркулирующих вирусов гриппа. И наоборот, большая часть иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP белка современных вирусов отсутствует в донорных вирусах и не может быть индуцирована путем вакцинации с использованием традиционных вакцин. Полученные данные свидетельствуют о необходимости актуализации NP антигена в составе вакцин путем направленного мутагенеза гена «донорного» NP или внесения в вакцинные штаммы гена, кодирующего NP циркулирующих вирусов гриппа.

Ключевые слова: вирус гриппа, нуклеопротеин, белок нуклеокапсида, лимфоциты, T-клеточный эпитоп, живая гриппозная вакцина.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONSERVATION OF NUCLEOPROTEIN IMMUNOGENIC T-CELL EPITOPES OF MASTER DONOR VIRUSES FOR LIVE AND INACTIVATED INFLUENZA VACCINES

Rak A.Ya., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N.

Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, Russia

Abstract. Antigen-specific T cells are an important part of antiviral responses, and modern influenza vaccines are designed to induce this mode of immunity. Live attenuated influenza vaccine (LAIV) is a potent inducer of T-cell immunity because of its ability to cause productive infection in the upper respiratory tract. Inactivated influenza vaccines (IIV) and novel vaccine candidates can also induce virus-specific T-cells when appropriate adjuvants are used. In this case, non-structural and intrinsic antigens of the master donor viruses, particularly nucleoprotein (NP), are the main targets for the development of T-cell immunity. The most commonly used donor strains for LAIVs and IIVs worldwide were derived from viruses isolated between 1933 and 1960. In this regard, the question of conservation of epitopes immunogenic for CD8⁺ T-lymphocytes (CTL-epitopes) in donor-derived NPs, i.e., the ability of cytotoxic T cells specific to the donor's NP to recognize modern influenza A virus nucleoproteins, is relevant. The aim of the study was to evaluate the conservation of CTL-immunogenic NP epitopes of donors traditionally used to create LAIVs and IIVs. *Materials and methods.* Epitope NP analysis was performed for 1614 and 1767 strains of influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2, respectively, which circulated in 2009–2023 (data from the NCBI Influenza Virus Database). Immune Epitope Database (IEDB, www.iedb.org), NetCTL's built-in CTL-epitope prediction algorithm and NetChop proteolysis site predictor were used. CTL-epitopes were mapped to NPs of master donor viruses A/Leningrad/134/17/57 (H2N2), A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/PR/8/34 (H1N1), and A/WSN/1933 (H1N1) using the CrustalO alignment algorithm in JalView 2.8.1 Software. The immunogenicity and conservation of selected epitopes were further evaluated using IEDB T-cell Immunogenicity Predictor and Epitope Conservancy Assay, respectively. *Results.* The majority of immunogenic CTL-epitopes of donor viruses proved to be non-conserved, i.e., not found in NPs of circulating influenza strains. Conversely, most CTL-immunogenic NP epitopes of modern viruses are absent in donor viruses and cannot be induced by vaccination with conventional vaccines. The data obtained indicate the need to actualize NP in vaccine composition by directed mutagenesis of the donor-derived NP gene or by introduction of the gene encoding NP of circulating influenza viruses into vaccine strains.

Key words: influenza virus, nucleoprotein, nucleocapsid protein, lymphocytes, T-cell epitope, live attenuated influenza vaccine.

Введение

Грипп является одной из наиболее распространенных в мире респираторных инфекций, вызываемой высококонтагиозным вирусным патогеном (чаще всего вирусами гриппа подтипа А) и часто характеризующейся осложненным течением. По данным ВОЗ, ежегодные эпидемии гриппа вызывают от 3 до 5 млн случаев тяжелой формы заболевания, смертность от которых достигает 22% [4].

Одним из наиболее эффективных средств борьбы с гриппозной инфекцией является вакцинопрофилактика, чаще всего осуществляемая с использованием таких инструментов, как сплит-, рекомбинантные и инактивированные (ИГВ) вакцины, в том числе на основе наночастиц, а также живая гриппозная вакцина (ЖГВ). Показано, что в отличие от других способов вакцинации, иммунизация ЖГВ индуцирует

как местный, так и T-клеточный гетеросубтипический иммунный ответ к внутреннему белку вириона — нуклеопротеину (NP), наиболее богатому иммуногенными эпитопами для CD8⁺ T-лимфоцитов компоненту вируса гриппа [3].

Штаммы, составляющие основу сезонных ЖГВ и ИГВ, являются продуктами генетической реассортации циркулирующих вирусных вариантов и вакцинных доноров [9]. Как правило, их геном представлен сегментами, кодирующими поверхностные белки (гемагглютинин и нейраминидазу) актуальных эпидемических вирусов гриппа, а также генами неструктурных белков и внутренних компонентов вириона (в частности, NP антигена), наследуемыми от вакцинного донора. Наиболее популярными донорными штаммами для создания гриппозных вакцин во всем мире являются вирусы 1933–1960 гг. выделения, а именно A/WSN/1933 (H1N1) (используемый для получения современных вакцин

на основе наночастиц), A/PR/8/34 (H1N1) (донор высокой репродуктивности для создания ИГВ), A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), лицензированный для производства ЖГВ [7], а также донор аттенуации для американской ЖГВ A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), аминокислотный состав NP белка которых мог значительно отдалиться от такового у циркулирующих вирусов за более чем 60 лет. В случае если возникающие в NP замены затрагивают иммуногенные эпитопы, которые в комплексе с МНС I служат активаторами цитотоксических CD8⁺ Т-клеток (ЦТЛ-эпитопы), различия в составе «донорного» и «эпидемического» NP антигенов могут снижать эффективность стимуляции Т-клеточного иммунитета с помощью вакцин, содержащих антигенно устаревший белок нуклеокапсида.

Целью данного исследования стал анализ консервации *in silico* ЦТЛ-иммуноэпитопов NP антигена вирусов гриппа А, чаще всего используемых в качестве доноров для разработки и производства кросс-протективных вакцин (A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/PR/8/34 (H1N1) и A/WSN/1933 (H1N1)) в составе NP вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2), циркулировавших в человеческой популяции с 2009 по 2023 год.

Материалы и методы

Для проведения иммуноэпитопного анализа из базы данных NCBI Influenza Virus Sequence Database [11] были отобраны аминокислотные последовательности NP антигена вакцинных доноров (A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), A/PR/8/34 (H1N1) и A/WSN/1933 (H1N1), а также уникальные последовательности NP 1614 современных вирусов гриппа А подтипа H1N1 и 1767 — подтипа H3N2, циркулировавших среди людей в 2009–2023 гг. Из рассмотрения были исключены лабораторные штаммы, а также полностью гомологичные последовательности, выявленные при выравнивании алгоритмом ClustalO [8]. Поиск ЦТЛ-эпитопов в последовательностях NP вакцинных доноров проводили в базе данных Immune Epitope Database (IEDB, www.iedb.org) с использованием алгоритма предсказания NetCTL, поэтапно для всех HLA-супертипов [5]. Параметры вклада С-концевого протеолиза, эффективности TAP-опосредованного транспорта пептидов в просвет эндоплазматического ретикулула (с участием транспортера, ассоциированного с процессингом антигена) и порога отбора эпитопов составляли 0,15, 0,05 и 0,75 соответственно. Затем последовательности NP вакцинных доноров были проанализированы на наличие протеолитических сайтов с помощью инструмента NetChop [6] и метода C-terminal

proteolysis assay 3.0 при пороговом значении 0,5. Картирование ЦТЛ-эпитопов на последовательности NP вирусов гриппа А с учетом локализации сайтов протеолиза проводили с помощью программы JalView 2.8.1. Эпитопы, имеющие не более одного сайта протеолиза, были включены в дальнейший анализ. Предсказание иммуногенности отобранных ЦТЛ-эпитопов проводили в IEDB с использованием алгоритма предсказания Immunogenicity predictor tool [2]. Для дальнейшего исследования отбирали эпитопы с баллом иммуногенности более 0. Анализ консервации эпитопов проводили в IEDB с использованием соответствующего алгоритма Epitope Conservancy Assay [1] в режиме оценки линейных эпитопов с порогом идентичности последовательностей, равным 100. Степень консервативности эпитопов выражали как процент вирусных штаммов с полностью гомологичными последовательностями среди всех штаммов вируса гриппа А, включенных в анализ.

Результаты и обсуждение

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что только 2 из 12 отобранных ЦТЛ-эпитопов (16,7%) для NP вакцинного донора A/WSN/1933 (H1N1) оказались высококонсервативными. Примечательно, что половина отобранных иммуногенных эпитопов была выявлена только у 0,1–2,0% циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа А.

Аналогичные результаты были получены для A/PR/8/34 (H1N1), где только 3 из 13 предсказанных NP-эпитопов (23,1%) сохранились практически у всех циркулирующих в настоящее время вирусов (табл. 2).

Как и ожидалось, большая доля ЦТЛ-эпитопов NP донора аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), сохраняется у современных вирусов H1N1 и H3N2 (5 из 12, 41,7%), поскольку этот вирус был выделен на два десятилетия позже, чем первые два рассмотренных вакцинных донора (табл. 3).

Сходные данные были получены при анализе консервативности ЦТЛ-эпитопов NP антигена донора аттенуации A/Ann Arbor/6/60 (H2N2), что ожидаемо ввиду практически совпадающего времени выделения и подтипа данного вируса с таковым у A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (табл. 4).

Однако, в отличие от этого вакцинного донора, в пределах NP A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) были выявлены два уникальных консервативных эпитопа (251–259 и 438–446) и не обнаружены такие эпитопы как 198–206, 199–207, 276–284, 211–219, 213–221, присутствующие в NP антигене родственного вируса A/Ленинград/134/17/57 (H2N2).

Таблица 1. Консервация экспериментально определенных и предсказанных ЦТЛ-эпитопов NP вакцинного донора A/WSN/1933 (H1N1) у вирусов гриппа А, циркулировавших в человеческой популяции с 2009 по 2023 год

Table 1. Conservation of experimentally defined and predicted CTL-epitopes of the NP of vaccine donor A/WSN/1933 (H1N1) in influenza A viruses circulating in the human population from 2009 to 2023

Эпитопы NP вируса гриппа A/WSN/1933 (H1N1) NP epitopes of influenza virus A/WSN/1933 (H1N1)				Консервация ЦТЛ-эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А (2009–2023), % Conservancy of NP CTL- epitopes in influenza A strains (2009–2023), %	Предсказание ЦТЛ- иммуногенности эпитопа, баллы Prediction of epitope CTL-immunogenicity, score
Номер эпитопа в IEDB Epitope IEDB ID	Позиция на транскрипте NP Position in NP transcript	Связывающий эпитоп HLA-супертип Epitope-binding HLA supertype	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence		
ρ	174–182	B27	RRSGAAGAA	98,13	0,11
ρ	317–325	A3	RPNENPAHK	97,86	0,13
41691	32–40	A1, A26	MIDGIGRFY	52,31	0,32
11696	114–122	B44	EEIRRIWRQ	53,30	0,49
ρ	113–121	A3	KEEIRRIWR	53,27	0,51
ρ	30–38	A3	GKMIDGIGR	50,99	0,26
ρ	211–219	A26	NGRRTRIAY	1,97	0,29
ρ	213–221	B27	RRTRIAYER	1,97	0,29
ρ	214–222	B7	RTRIAYERM	1,97	0,30
19421	17–25	B44	GERQNATEI	1,53	0,02
ρ	125–133	B39	NGDDATAGL	1,40	0,16
ρ	245–253	B27, B39	SRNPGNAEF	0,10	0,11

Примечание. ρ — эпитоп предсказан.

Note. ρ — epitope is predicted.

Таблица 2. Консервация экспериментально определенных и предсказанных ЦТЛ-эпитопов NP вакцинного донора A/PR/8/34 (H1N1) у вирусов гриппа А, циркулировавших в человеческой популяции с 2009 по 2023 год

Table 2. Conservation of experimentally defined and predicted CTL-epitopes of the NP of vaccine donor A/PR/8/34 (H1N1) in influenza A viruses circulating in the human population from 2009 to 2023

Эпитопы NP вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) NP epitopes of influenza virus A/PR/8/34 (H1N1)				Консервация ЦТЛ-эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А (2009–2023), % Conservancy of NP CTL- epitopes in influenza A strains (2009–2023), %	Предсказание ЦТЛ- иммуногенности эпитопа, баллы Prediction of epitope CTL-immunogenicity, score
Номер эпитопа в IEDB Epitope IEDB ID	Позиция на транскрипте NP Position in NP transcript	Связывающий эпитоп HLA-супертип Epitope-binding HLA supertype	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence		
ρ	333–341	A24, B39	CHSAAFEDL	98,13	0,23
ρ	174–182	B27	RRSGAAGAA	98,13	0,11
ρ	317–325	A3	RPNENPAHK	97,86	0,13
11696	114–122	B44	EEIRRIWRQ	53,30	0,49
63408	23–31	A3, B44	TEIRASVGK	51,63	0,03
164131	32–40	A3, B62	MIGGIGRFY	44,72	0,32
19421	17–25	B44	GERQNATEI	1,53	0,02
ρ	125–133	B39	NGDDATAGL	1,40	0,16
ρ	211–219	A26, B62	NGRKTRIAY	1,36	0,02
ρ	213–221	B27	RKTRIAYER	1,29	0,29
ρ	31–39	A2, A24	KMIGGIGRF	0,44	0,29
ρ	30–38	A3	GKMIGGIGR	0,44	0,27

Примечание. ρ — эпитоп предсказан.

Note. ρ — epitope is predicted.

Таблица 3. Консервация экспериментально определенных и предсказанных ЦТЛ-эпитопов NP донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) у вирусов гриппа А, циркулировавших в человеческой популяции с 2009 по 2023 год

Table 3. Conservation of experimentally defined and predicted CTL-epitopes of the NP of attenuation donor A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) in influenza A viruses circulating in the human population from 2009 to 2023

Эпитопы NP вируса гриппа А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) NP epitopes of influenza virus A/Ленинград/134/17/57 (H2N2)				Консервация ЦТЛ-эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А (2009– 2023), % Conservancy of NP CTL- epitopes in influenza A strains (2009–2023), %	Предсказание ЦТЛ- иммуногенности эпитопа, баллы Prediction of epitope CTL-immunogenicity, score
Номер эпитопа в IEDB Epitope IEDB ID	Позиция на транскрипте NP Position in NP transcript	Связывающий эпитоп HLA- супертип Epitope-binding HLA supertype	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence		
167950	198–206	A24, B27	KRGINDRNF	99,01	0,20
53890	199–207	B58	RGINDRNF	99,01	0,17
p	174–182	B27	RRSGAAGAA	98,13	0,11
p	245–253	B27, B39	SRNPGNAEI	96,43	0,11
p	250–258	A1, A3	NAEIEDLIF	96,36	0,35
p	114–122	B44	EEIRRIWRQ	53,30	0,49
п p	276–284	B7	LPACVYGPA	2,11	0,02
19421	17–25	B44	GERQNATEI	1,53	0,02
p	125–133	B39	NGDDATAGL	1,40	0,16
p	211–219	A26, B62	NGRKTRIAIY	1,36	0,02
p	333–341	A24	CNSAAFEDL	1,33	0,23
p	213–221	B27	RKTRIAIYER	1,29	0,29

Примечание. p — эпитоп предсказан.

Note. p — epitope is predicted.

Таблица 4. Консервация экспериментально определенных и предсказанных ЦТЛ-эпитопов NP донора аттенуации А/Ann Arbor/6/60 (H2N2) у вирусов гриппа А, циркулировавших в человеческой популяции с 2009 по 2023 год

Table 4. Conservation of experimentally defined and predicted CTL-epitopes of the NP of attenuation donor A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) in influenza A viruses circulating in the human population from 2009 to 2023

Эпитопы NP вируса гриппа А/Ann Arbor/6/60 (H2N2) NP epitopes of influenza virus A/Ann Arbor/6/60 (H2N2)				Консервация ЦТЛ-эпитопов NP в штаммах вируса гриппа А (2009–2023), % Conservancy of NP CTL- epitopes in influenza A strains (2009–2023), %	Предсказание ЦТЛ- иммуногенности эпитопа, баллы Prediction of epitope CTL-immunogenicity, score
Номер эпитопа в IEDB Epitope IEDB ID	Позиция на транскрипте NP Position in NP transcript	Связывающий эпитоп HLA- супертип Epitope-binding HLA supertype	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence		
p	174–182	B27	RRSGAAGAA	98,13	0,11
p	317–325	A3	RPNENPAHK	97,86	0,13
p	245–253	B27	SRNPGNAEI	96,43	0,11
984	251–259	B44	AEIEDLIFL	96,29	0,34
p	114–122	B44	EEIRRIWRQ	53,30	0,49
41691	32–40	A1, A3, A26	MIDGIGRFY	52,31	0,32
p	438–446	A3	SDMRAEIR	51,74	0,32
p	30–38	A3	GKMIDGIGR	50,99	0,26
19421	17–25	B44	GERQNATEI	1,53	0,02
p	125–133	B39	NGDDATAGL	1,40	0,16
p	333–341	A24	CNSAAFEDL	1,33	0,23
p	174–182	B27	RRSGAAGAA	98,13	0,11

Примечание. p — эпитоп предсказан.

Note. p — epitope is predicted.

Далее мы провели поиск иммуногенных ЦТЛ-эпитопов, содержащих не более одного сайта протеолиза, в последовательностях NP современных штаммов вирусов гриппа А под-типа H1N1 и H3N2, рекомендованных ВОЗ для включения в состав поливалентных вакцин

для применения в эпидемические сезоны 2018–2024 гг. в Северном полушарии, а затем оценили представленность обнаруженных эпитопов в NP вакцинных доноров (табл. 5).

В целом проведенный анализ показал, что большинство NP-специфических иммунодоми-

Таблица 5. Анализ представленности иммуногенных ЦТЛ-эпитопов современных вирусов гриппа А в последовательностях NP вакцинных доноров

Table 5. Analysis of the representation of immunogenic CTL epitopes of contemporary influenza A viruses in the NP sequences of vaccine donors

Иммуногенные ЦТЛ-эпитопы Immunogenic CTL-epitopes				Вирусы-доноры для создания вакцин Donor viruses for vaccine development			
Подтип вируса гриппа Influenza virus subtype	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence	Номер эпитопа Epitope ID	ЦТЛ-иммуногенность эпитопа, баллы Epitope CTL-immunogenicity, score	A/WSN/1933	A/Leningrad/134/17/57	A/Ann Arbor/6/60	A/PR/8/34
H1N1	RMIGGIGRF	p	0,29	–	–	–	–
H1N1	GRMIGGIGR	p	0,27	–	–	–	–
H1N1	KRGINDRNF	167950	0,20	–	+	–	–
H1N1	GENGRRTRV	p	0,19	–	–	–	–
H1N1	NGEDATAGL	p	0,18	–	–	–	–
H1N1	IQNSITIER	p	0,17	–	–	–	–
H1N1	GEDATAGLT	p	0,14	–	–	–	–
H1N1	AMELIRMIK	p	0,13	–	–	–	–
H1N1	SVGRMIGGI	p	0,07	–	–	–	–
H1N1	AVKIGITMV	p	0,06	–	–	–	–
H1N1	GERQDTTEI	p	0,05	–	–	–	–
H1N1	MELIRMIKR	41392	0,01	–	–	–	–
H1N1, H3N2	MIDGIGRFY	41691	0,32	+	–	+	–
H1N1, H3N2	GINDRNFWR	20377	0,29	–	–	–	–
H1N1, H3N2	RGINDRNFW	53890	0,17	–	+	–	–
H1N1, H3N2	RRSGAAGAA	p	0,11	+	+	+	+
H1N1, H3N2	SRNPGNAEI	p	0,11	–	+	+	–
H3N2	EEIRRIWRQ	p	0,49	+	+	+	+
H3N2	NAEIEDLIF	p	0,35	–	+	–	–
H3N2	SDMRAEIIR	p	0,32	–	–	+	–
H3N2	GKMIDGIGR	p	0,26	+	–	+	–
H3N2	AANPIVPSF	p	0,05	–	–	–	–
H3N2	GDRQNATEI	p	0,02	–	–	–	–
H3N2	AAVKIGITM	p	0,01	–	–	–	–
H3N2	NGEDATSGL	p	0,01	–	–	–	–
Представленность ЦТЛ-эпитопов в последовательности NP различных вакцинных доноров, % Representation of CTL-epitopes in the NP sequence of different vaccine donors, %				16	24	24	8

Примечание. p — эпитоп предсказан.

Note. p — epitope is predicted.

нантных ЦТЛ-эпитопов вакцинных прототипов, разработанных на основе антигенно устаревших вирусов гриппа А, не присутствуют в современных штаммах, и напротив, представленность иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP антигена современных вирусов гриппа А у четырех наиболее популярных вакцинных доноров не превышает 24% (табл. 5), что может иметь по крайней мере два негативных последствия. Во-первых, массовое применение вакцин на основе неактуальных NP доноров приведет к клональной экспансии эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов, не способных к распознаванию и уничтожению клеток, инфицированных недавними вариантами вируса гриппа, что неоправданно истощит иммунную систему вакцинируемых. Во-вторых, большинство новых эпитопов NP современных вирусов гриппа не будет распознаваться индуцированными вакциной Т-клетками, поскольку эти эпитопы еще не были представлены в вакцинах на основе классических доноров.

Среди проанализированных ЦТЛ-эпитопов NP четырех наиболее популярных вакцинных доноров по степени консервативности можно выделить три группы пептидов: высококонсервативные (для которых процент консервации составляет более 90%), среднеконсервативные (сохраняющиеся у 40–55% современных штаммов вируса гриппа А) и низкоконсервативные (с консервацией 3% и менее). Выявленные различия в степени консервативности отдельных эпитопов NP могут свидетельствовать о дифференциальном действии естественного отбора со стороны иммунной системы хозяина в процессе вирусной эволюции. Это предположение может быть в дальнейшем дополнительно проверено с помощью алгоритмов оценки молекулярной эволюции [10, 12].

Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что NP-специфические CD8⁺ Т-клетки, генерируемые в ответ на вакцинацию

штаммами, полученными на основе классических доноров, будут способны распознавать лишь небольшую часть иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP антигена современных вариантов вируса гриппа. Этот недостаток может быть устранен либо введением в состав штаммов цельновирионных гриппозных вакцин, помимо генов поверхностных белков (гемагглютинаина и нейраминидазы), гена NP актуальных вирусных вариантов, либо направленным точечным мутагенезом последовательностей NP вакцинных доноров для приведения ее в соответствие антигенному набору ЦТЛ-эпитопов NP современных вирусов гриппа А.

Заключение

В настоящем исследовании был выявлен ряд экспериментальных и предсказанных иммуногенных ЦТЛ-эпитопов в белке нуклеокапсида стандартных вакцинных доноров для создания гриппозных вакцин и проанализирована степень их консервативности по наличию в NP современных штаммов вируса гриппа А. По результатам анализа степени консервации этих эпитопов, большая их часть отсутствует в NP антигене штаммов вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2, циркулировавших в мире с 2009 по 2023 год. Таким образом, существует вероятность ограниченной перекрестной NP-специфичности, а, следовательно, и защитной функции вакцин-индуцированных CD8⁺ Т-лимфоцитов, что может быть скорректировано за счет актуализации эпитопного состава NP вакцинных доноров в соответствии с таковым у современных вирусных вариантов. Выявленные в работе последовательности иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP могут быть использованы для конструирования новых прототипов вакцин против гриппа с улучшенными кросс-протективными свойствами.

Список литературы/References

1. Bui H.H., Sidney J., Li W., Fusseder N., Sette A. Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics*, 2007, vol. 8, pp. 1–6. doi: 10.1186/1471-2105-8-361
2. Calis J.J.A., Maybeno M., Greenbaum J.A., Weiskopf D., De Silva A.D., Sette A., Keşmir C., Peters B. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Computational Biology*, 2013, vol. 9, no. 10: e1003266. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003266
3. Grant E., Wu C., Chan K.F., Eckle S., Bharadwaj M., Zou Q.M., Kedzierska K., Chen W. Nucleoprotein of influenza A virus is a major target of immunodominant CD8⁺ T-cell responses. *Immunology and Cell Biology*, 2013, vol. 91, no. 2, pp. 184–194. doi: 10.1038/icb.2012.78
4. Influenza. World Health Organization (3 october 2023). World Health Organization fact sheet. Access date: March 23, 2024. [Electr. resource]
5. Larsen M.V., Lundegaard C., Lamberth K., Buus S., Lund O., Nielsen M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics*, 2007, vol. 8, pp. 1–12. doi: 10.1186/1471-2105-8-424
6. Nielsen M., Lundegaard C., Lund O., Keşmir C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. *Immunogenetics*, 2005, vol. 57, pp. 33–41. doi: 10.1007/s00251-005-0781-7
7. Rudenko L., Yeolekar L., Kiseleva I., Isakova-Sivak I.N. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: process challenges and success stories. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 45, pp. 5436–5441. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.08.018

8. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 2011, vol. 7, no. 1: 539. doi: 10.1038/msb.2011.75
9. Sridhar S., Brokstad K.A., Cox R.J. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines (Basel)*, 2015, vol. 3, no. 2, pp. 373–389. doi: 10.3390/vaccines3020373
10. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
11. Vita R., Overton J.A., Greenbaum J.A., Ponomarenko J., Clark J.D., Cantrell J.R., Wheeler D.K., Gabbard J.L., Hix D., Sette A., Peters B. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res.*, 2015, vol. 43, no. D1, pp. D405–D412. doi: 10.1093/nar/gku938
12. Weaver S., Shank S.D., Spielman S.J., Li M., Muse S.V., Kosakovsky Pond S.L. Datamonkey 2.0: a modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes. *Mol. Biol. Evol.*, 2018, vol. 35, no. 3, pp. 773–777. doi: 10.1093/molbev/msx335

Авторы:

Рак А.Я., к.б.н., старший научный сотрудник отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Руденко Л.Г., д.м.н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;
Исакова-Сивак И.Н., член-корреспондент РАН, д.б.н., зав. лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Rak A.Ya., PhD (Biology), Senior Researcher, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Rudenko L.G., DSc (Medicine), Professor, Head of A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;
Isakova-Sivak I.N., RAS Corresponding Member, DSc (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.03.2024
Принята к печати 30.03.2024

Received 26.03.2024
Accepted 30.03.2024

РОЛЬ ХЕМОКИНА CX3CL1/FRACTALKINE ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ В

Н.А. Арсентьева¹, О.К. Бацунов^{1,2}, Н.Е. Любимова¹, В.В. Басина³,
Е.В. Эсауленко^{1,3}, А.А. Тотолян^{1,2}

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

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

³ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Гепатит В – инфекционное заболевание, возникающее в следствие инфицирования вирусом гепатита В. Для хронического вирусного гепатита В (ХВГВ) характерно длительное воспаление в печени, развитие фиброза, цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. В патогенезе ХВГВ важнейшую роль играют факторы иммунной системы. Благодаря хемокинам, иммунные клетки мигрируют в очаг воспаления для реализации своих эффекторных функций. Хемокин CX3CL1/Fractalkine – единственный представитель семейства CX3C хемокинов с уникальными структурными и функциональными свойствами. Его рецептор CX3CR1 экспрессируется в основном на поверхности цитотоксических эффекторных лимфоцитов, таких как НК-клетки, ТНК и цитотоксические Т-лимфоциты. Целью нашего исследования стал анализ содержания CX3CL1/Fractalkine в плазме крови больных ХВГВ и связи этого хемокина с фиброзом печени. Концентрацию CX3CL1/Fractalkine определяли в плазме крови пациентов с ХВГВ методом мультиплексного анализа, основанного на xMAP-технологии. В качестве группы сравнения использовали плазму крови пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) и аутоиммунными заболеваниями печени (АИЗП). Контрольную группу составили условно здоровые лица. Для статистического анализа применяли методы непараметрической статистики: критерий Краскела–Уоллиса, коэффициент корреляции Спирмена и ROC-анализ. В результате исследования у больных ХВГВ обнаружен сниженный уровень CX3CL1/Fractalkine по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0003$) и с группами сравнения ХВГС ($p < 0,0001$) и АИЗП ($p = 0,0005$). Показана сниженная концентрация CX3CL1/Fractalkine в плазме крови больных ХВГВ с начальной степенью фиброза ($p = 0,0092$) и тяжелым фиброзом/циррозом ($p = 0,0009$), при этом у больных с тяжелым фиброзом/циррозом установлен достоверно сниженный уровень этого хемокина по сравнению с начальной степенью фиброза печени ($p = 0,0081$). Корреляционный анализ выявил обратную связь высокой степени значимости между тяжестью фиброза печени и содержанием CX3CL1/Fractalkine в плазме крови больных ХВГВ (Spearman $r = -0,33$; $p = 0,02$). Таким образом, хемокин CX3CL1/Fractalkine вовлечен в иммунопатогенез ХВГВ, его сниженное содержание характерно только для ХВГВ и не изменяется при других хронических заболеваниях печени. Он участвует в процессах фиброобразования печени при инфицировании вирусом гепатита В, концентрация хемокина CX3CL1/Fractalkine зависит от стадии фиброза печени при ХВГВ и сниженный уровень CX3CL1/Fractalkine в плазме крови может служить неблагоприятным фактором развития ХВГВ.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В, хемокины, CX3CL1/Fractalkine, фиброз печени, цирроз печени, иммунопатогенез.

Адрес для переписки:

Арсентьева Наталья Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (904) 646-57-58. E-mail: arsentieva_n.a@bk.ru

Contacts:

Natalia A. Arsentieva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (904) 646-57-58. E-mail: arsentieva_n.a@bk.ru

Для цитирования:

Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Любимова Н.Е., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. Роль хемокина CX3CL1/Fractalkine при хроническом вирусном гепатите В // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 609–614.
doi: 10.15789/2220-7619-CCR-16721

Citation:

Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Lyubimova N.E., Basina V.V., Esaulenko E.V., Totolian A.A. The role of Chemokine CX3CL1/Fractalkine in chronic viral hepatitis B // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 609–614. doi: 10.15789/2220-7619-CCR-16721

THE ROLE OF CHEMOKINE CX3CL1/FRACTALKINE IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS BArsentieva N.A.^a, Batsunov O.K.^{a,b}, Lyubimova N.E.^a, Basina V.V.^c, Esaulenko E.V.^{a,c}, Totolian A.A.^{a,b}^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation^b Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation^c St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Hepatitis B is an infectious disease resulting from infection with the hepatitis B virus. Chronic hepatitis B (CHB) is characterized by prolonged inflammation in the liver, the development of fibrosis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Factors of the immune system play a critical role in the pathogenesis of CHB. Thanks to chemokines, immune cells migrate to the site of inflammation to implement their effector functions. The CX3CL1/Fractalkine chemokine is the only member of the CX3C family of chemokines with unique structural and functional properties. Its receptor CX3CR1 is expressed mainly on the surface of cytotoxic effector lymphocytes such as NK cells, TNK and cytotoxic T lymphocytes. The purpose of our study was to analyze the content of CX3CL1/Fractalkine in the blood plasma of patients with CHB and the analysis of this chemokine with liver fibrosis. The concentration of CX3CL1/Fractalkine was determined in the blood plasma of patients with CHB using a multiplex assay based on xMAP technology. Blood plasma from patients with chronic viral hepatitis C (CHC) and autoimmune liver diseases (AILD) was used as a comparison group. The control group consisted of healthy individuals. For statistical analysis of data, nonparametric statistics methods were used: Kruskal–Wallis test, Spearman correlation coefficient ROC-analysis. It was shown a reduced level of CX3CL1/Fractalkine in patients with CHB compared with the control group ($p = 0.0003$) and with the comparison groups of CHC ($p < 0.0001$) and AILD ($p = 0.0005$). A reduced concentration of CX3CL1/Fractalkine was shown in the blood plasma of CHB patients with initial fibrosis ($p = 0.0092$) and severe fibrosis/cirrhosis ($p = 0.0009$), while in patients with severe fibrosis/cirrhosis, a significantly reduced level of this chemokine was established compared with the initial degree of liver fibrosis ($p = 0.0081$). Correlation analysis revealed a highly significant inverse relationship between the severity of liver fibrosis and the content of CX3CL1/Fractalkine in the blood plasma of patients with CHB (Spearman $r = -0.33$; $p = 0.02$). Thus, the chemokine CX3CL1/Fractalkine is included in the immunopathogenesis of CHB; its reduced content is characteristic only of CHB and does not change in other chronic liver diseases. It is involved in the processes of liver fibrosis during infection with the hepatitis B virus. The concentration of the chemokine CX3CL1/Fractalkine depends on the stage of liver fibrosis in CHB, and a decrease in the level of CX3CL1/Fractalkine in the blood plasma can serve as a negative factor in the development of CHB.

Key words: chronic viral hepatitis B, chemokines, CX3CL1/Fractalkine, liver fibrosis, liver cirrhosis, immunopathogenesis.

Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) представляет собой нецитопатический ДНК-вирус, отличающимся чрезвычайно высокой устойчивостью к факторам окружающей среды и обладающим высокой тропностью к гепатоцитам. При инфицировании ВГВ может развиваться острый либо хронический гепатит, при этом вероятность развития хронической формы снижается с увеличением возраста пациентов [1]. При хроническом вирусном гепатите В (ХВГВ) у пациентов развивается фиброз печени, существует высокий риск развития цирроза печени, а также гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [4]. По данным ВОЗ, в 2019 г. в мире насчитывалось 296 млн человек, живущих с ХВГВ, при этом ежегодно происходит около 1,5 млн новых случаев инфицирования [2].

Показано, что важнейшую роль в контроле ВГВ играют факторы иммунной системы, включающие NK-клетки, TNK-клетки, моноциты и дендритные клетки, а также факторы адаптивной иммунной системы, в особенности, цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), Th1-клетки и регуляторные Т-клетки [8, 11]. Внутривнутрипеченочные иммунные реакции могут быть индуцированы паттерн-распознающими рецепторами, такими как Toll-, RIG-I- и Nod-подобными рецепторами

ми. Кроме того, гепатоциты при инфицировании ВГВ сами по себе могут секретировать интерферон [6]. Мощной цитотоксической функцией, способной контролировать инфицирование ВГВ, обладают NK-клетки, TNK-клетки и CTL [10]. Однако персистирующая инфекция, вызванная ВГВ, может подавлять эффекторную функцию цитотоксических клеток иммунной системы с помощью различных механизмов [13].

Хемокины, ответственные за миграцию различных иммунных клеток, продуцируются моноцитами, эндотелиальными клетками, звездчатыми клетками печени и гепатоцитами [5]. Гепатоциты напрямую поражаются ВГВ и потенциальное количество хемокинов, продуцируемых гепатоцитами, может быть выше, чем другими клетками (моноцитами, эндотелиальными клетками и звездчатыми клетками печени) [7].

Известно, что хемокин CX3CL1/Fractalkine существует как в секретируемой, так и в мембраносвязанной формах, индуцирует супрессивную активность в опухолевых клетках, включая ГЦК [14]. Его рецептор, CX3CR1, экспрессируется на NK-клетках, CD8⁺ Т-клетках, CD4⁺ Т-клетках, моноцитах и т. д. [12]. Учитывая, что CX3CL1/Fractalkine участвует в привлечении критически значимых для борьбы с ВГВ клеток иммунной системы в очаг воспаления в печени,

представляет интерес исследование его содержания в плазме крови больных, инфицированных ВГВ, и связи хемокина CX3CL1/Fractalkine с повреждением печени и фиброзом. Таким образом, целью нашего исследования стал анализ содержания CX3CL1/Fractalkine в плазме крови больных ХВГВ и связи этого хемокина с фиброзом печени.

Материалы и методы

Пациенты. В исследование было включено 47 пациентов в возрасте 24–69 лет с подтвержденным диагнозом «ХВГВ», без сопутствующих патологий. Все пациенты проходили стационарное лечение в Клинической инфекционной больнице им. С.П. Боткина, являющейся клинической базой кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» МЗ РФ. Постановку диагноза, клинический осмотр больных, УЗИ органов брюшной полости, клинический анализ крови и мочи, биохимическое исследование крови, эластометрию печени для определения стадии фиброза осуществляли врачи указанного медицинского учреждения. Диагноз ХВГВ выставлялся на основании обнаружения в периферической крови пациентов серологических маркеров вируса гепатита В: HBsAg, анти-HBs IgG, анти-HBc IgG, HBeAg, анти-HBe IgG и наличия вирусной ДНК. Группа сравнения состояла из 73 пациентов с диагнозом «хронический вирусный гепатит С» (ХВГС), проходивших лечение в этом же учреждении, сопоставимые по полу и возрасту с исследуемой группой. А также из 30 пациентов с аутоиммунными заболеваниями печени (АИЗП), включающая аутоиммунный гепатит и первичный билиарный цирроз, проходивших стационарное лечение в СПбГУЗ «Городской клинической больнице № 31». Контрольную группу составили условно здоровые лица ($n = 32$), у которых отсутствовали любые клинико-лабораторные и морфологические признаки поражения печени и соматические заболевания.

Материалом исследования служила периферическая кровь. Образцы крови забирали в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K_2 ЭДТА, центрифугировали при 350g в течение 10 минут для отделения плазмы. Плазму отбирали в криопробирки, замораживали и хранили при -80°C до проведения анализа.

Набор материала для исследования осуществлялся в период 2015–2019 гг. Все исследования были выполнены в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных и медицинских исследований с участием человека»

(с поправками 2008 г.) и нормативными документами «Правила клинической практики в Российской Федерации» (утвержденные Приказом Минздрава РФ № 226 от 19.06.2003 г.) и «Правила надлежащей клинической практики в Российской Федерации» (утвержденные Приказом Минздрава РФ № 200н от 01.04.2016 г.). На проведение данного исследования было получено согласие Локального этического комитета ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера». От всех пациентов получено добровольное информированное согласие перед включением в исследование.

Анализ цитокинов. В плазме крови определяли концентрацию хемокина CX3CL1/Fractalkine. Исследование проводили методом мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex, США) с использованием наборов с магнитными частицами Milliplex HCYTA-60K-PX48 (Merck-Millipore) согласно инструкции фирмы-производителя. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе Luminex MAGPIX (Luminex, США). Данное исследование выполнено на базе центра коллективного пользования «Цитометрия и биомаркеры» ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism6. Поскольку полученные данные не подчинялись нормальному распределению, для анализа выборок использовали методы непараметрической статистики. Для межгрупповых сравнений применяли критерий Краскела–Уоллиса, для корреляционного анализа определяли коэффициент корреляции Спирмена. Достоверными считали различия между группами при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (Q_{25} – Q_{75}). Информативность измеряемой величины определяли методом ROC-анализа (receiver operating curve) с определением площади под ROC-кривой (AUC).

Результаты и обсуждение

Результаты определения концентрации хемокина CX3CL1/Fractalkine в плазме крови больных ХВГВ, ХВГС и АИЗП представлены на рис. 1.

В плазме крови больных ХВГВ обнаружен сниженный уровень хемокина CX3CL1/Fractalkine как по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0003$), так и с группами сравнения ХВГС ($p < 0,0001$) и АИЗП ($p = 0,0005$). Таким образом, сниженное содержание хемокина CX3CL1/Fractalkine характерно только для ХВГВ и не изменяется при других хронических заболеваниях печени, таких как ХВГС и АИЗП.

Далее больных ХВГВ распределили на две группы в зависимости от стадии заболевания, на основании оценки выраженности фиброза в соответствии со стандартизированной системой «METAVIR»: F0–1 — отсутствие/слабо выраженный фиброз и F4 — тяжелый фиброз (с порто-центрными септами)/цирроз. Обнаружена сниженная концентрация CX3CL1/Fractalkine в плазме крови больных ХВГВ со стадиями фиброза F0–1 ($p = 0,0092$) и F4 ($p = 0,0009$) (рис. 2). Обращает на себя внимание сниженная концентрация CX3CL1/Fractalkine в группе больных с тяжелым фиброзом/циррозом (F4) по сравнению с начальной степенью фиброза печени (F0–1) ($p = 0,0081$). Таким образом, снижение уровня CX3CL1/Fractalkine в плазме крови может служить неблагоприятным фактором развития ХВГВ.

В результате корреляционного анализа была выявлена обратная связь высокой степени значимости между тяжестью фиброза печени и содержанием CX3CL1/Fractalkine в плазме крови больных ХВГВ (Spearman $r = -0,33$; $p = 0,02$). Таким образом, продемонстрировано, что концентрация хемокина CX3CL1/Fractalkine зависит от стадии фиброза печени при ХВГВ.

CX3CL1/Fractalkine является единственным представителем семейства хемокинов CX3C

с уникальными структурными и функциональными свойствами. В отличие от других хемокинов, полипептидная цепь фракталкина человека представляет собой белок из 397 аминокислот, содержащий трансмембранный домен [15]. Основными источниками CX3CL1/Fractalkine в периферической крови и печени являются моноциты при воспалительных состояниях. Также CX3CL1/Fractalkine могут секретировать макрофаги, фибробласты, эндотелиальные и дендритные клетки [9]. Его рецептором служит CX3CR1 — высокоселективный хемокиновый рецептор, представленный в основном на поверхности цитотоксических эффекторных лимфоцитов, таких как НК-клетки, ТНК-клетки и CTL, которые экспрессируют большое количество перфорина и гранзима В, независимо от их происхождения и способа распознавания клеток-мишеней. Клетки, обладающие цитотоксической активностью, играют важнейшую роль в иммунопатогенезе ХВГВ, поскольку адекватный иммунный ответ, опосредованный этими клетками, позволяет контролировать ВГВ [3].

Сниженный уровень CX3CL1/Fractalkine в плазме больных ХВГВ косвенно может указывать на недостаточную активность эффекторных клеток. Данные проведенного нами ROC-анализа свидетельствуют, что концентрация

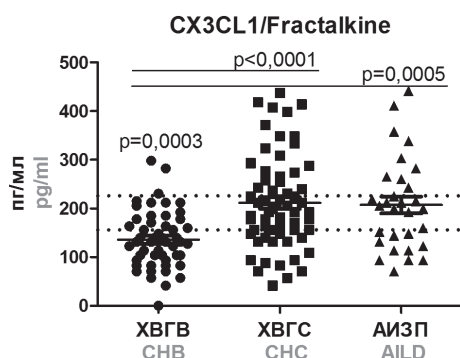


Рисунок 1. Концентрация хемокина CX3CL1/Fractalkine в плазме крови больных хроническим вирусным гепатитом В (ХВГВ), хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) и аутоиммунными заболеваниями печени (АИЗП)

Figure 1. Concentration of the chemokine CX3CL1/Fractalkine in the blood plasma in patients with chronic hepatitis B (CHB), chronic hepatitis C (CHC) and autoimmune liver diseases (AILD)

Примечание. Пунктирная горизонтальная полоса обозначает межквартильный интервал ($Q_{25}-Q_{75}$) для здоровых доноров. На графиках для каждой группы горизонтальные полосы обозначают медиану и межквартильный размах ($Q_{25}-Q_{75}$).

Note. The dotted horizontal bar represents the interquartile range ($Q_{25}-Q_{75}$) for healthy donors. In the graphs for each group, horizontal bars indicate the median and interquartile range ($Q_{25}-Q_{75}$).

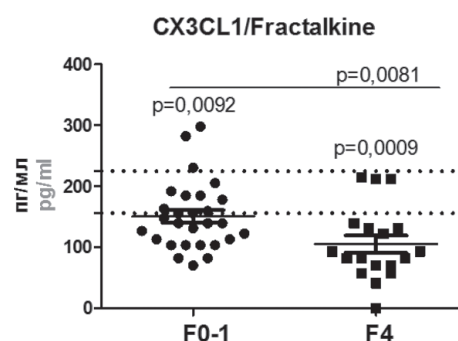


Рисунок 2. Концентрация хемокина CX3CL1/Fractalkine в плазме крови больных хроническим вирусным гепатитом В (ХВГВ) с начальной степенью фиброза печени F0–1 и с тяжелым фиброзом/циррозом F4

Figure 2. Concentration of the chemokine CX3CL1/Fractalkine in the blood plasma in patients with chronic hepatitis B (CHB) with an initial degree of liver fibrosis F0–1 and with severe fibrosis/cirrhosis F4

Примечание. Пунктирная горизонтальная полоса обозначает межквартильный интервал ($Q_{25}-Q_{75}$) для здоровых доноров. На графиках для каждой группы горизонтальные полосы обозначают медиану и межквартильный размах ($Q_{25}-Q_{75}$).

Note. The dotted horizontal bar represents the interquartile range ($Q_{25}-Q_{75}$) for healthy donors. In the graphs for each group, horizontal bars indicate the median and interquartile range ($Q_{25}-Q_{75}$).

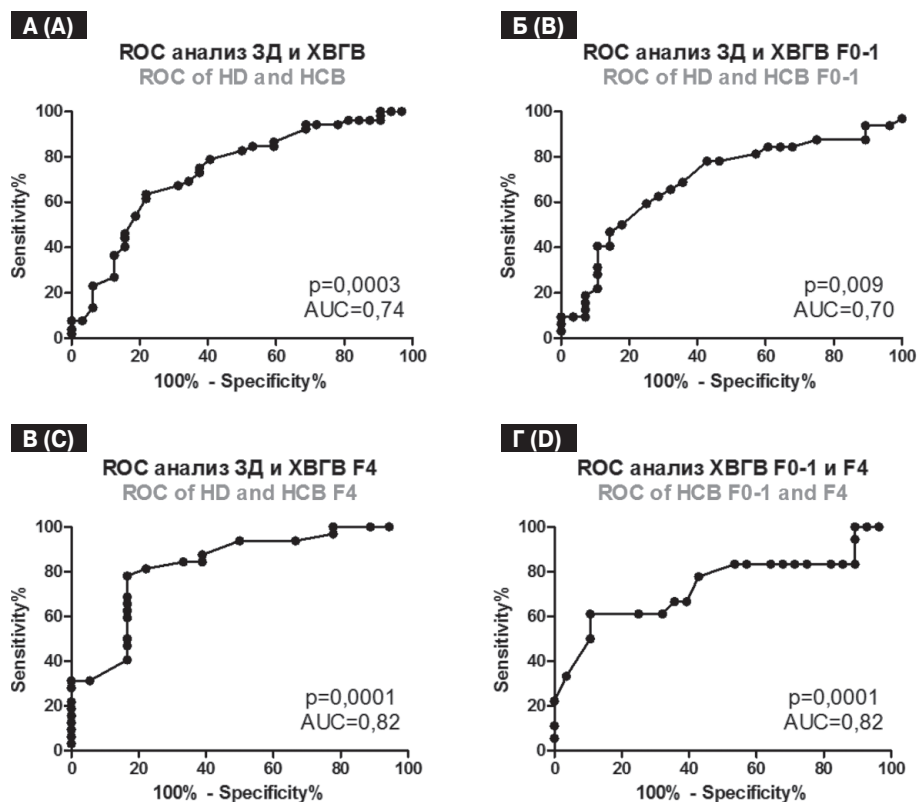


Рисунок 3. ROC-кривые, характеризующие зависимость чувствительности и специфичности CX3CL1/Fractalkine при сравнении групп пациентов с ХВГВ в зависимости от степени фиброза печени и здоровых доноров (ЗД)

Figure 3. ROC curves characterizing the dependence of the sensitivity and specificity of CX3CL1/Fractalkine when comparing groups of patients with CHB depending on the degree of liver fibrosis and healthy donors (HD)

Примечание. А — здоровые доноры (ЗД) и больные ХВГВ; Б — здоровые доноры и больные ХВГВ с начальной степенью фиброза печени F0–1; В — здоровые доноры и больные ХВГВ с тяжелым фиброзом/циррозом F4; Г — больные ХВГВ со стадиями фиброза F0–1 и F4. На графиках указаны значения площади под ROC-кривой (AUC).

Note. A — healthy donors and patients with CHBV; B — healthy donors and CHB patients with an initial degree of liver fibrosis F0–1; C — healthy donors and CHB patients with severe fibrosis/cirrhosis F4; D — CHB patients with fibrosis stages F0–1 and F4. The graphs show area under ROC-curve (AUC) values.

CX3CL1/Fractalkine в плазме крови с высокой степенью достоверности может служить биомаркером ХВГВ (рис. 3). Более того, использование оценки содержания CX3CL1/Fractalkine в плазме крови может помочь в дифференциальной диагностике степени фиброза печени. Таким образом, сниженный уровень CX3CL1/Fractalkine может служить предиктором негативного развития заболевания уже на ранних стадиях.

Полученные нами результаты могут свидетельствовать о различных иммунопатологических механизмах в печени, приводящих к фиброзу при вирусных заболеваниях различной этиологии

и аутоиммунных заболеваниях печени. Хемокин CX3CL1/Fractalkine не только вовлечен в иммунопатогенез ХВГВ и участвует в процессах фиброобразования печени при инфицировании ВГВ.

Благодарности

Авторы выражают благодарность заведующей отделением терапии СПбГУЗ «Городская клиническая больница № 31» Н.М. Смирновой за предоставление биоматериала и сопутствующей информации от пациентов с аутоиммунными заболеваниями печени.

Список литературы/References

1. Бациунов О.К., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Эсауленко Е.В., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Содержание некоторых цитокинов и хемокинов в крови пациентов с хроническим гепатитом В на ранних стадиях фиброза печени // Медицинская иммунология. 2020. Т. 22, № 2. С. 291–300. [Batsunov O.K., Arsentieva N.A., Lyubimova N.E., Esaulenko E.V., Semenov A.V., Totolyan A.A. Content of certain cytokines and chemokines in blood of patients with chronic hepatitis B in the early stages of liver fibrosis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, vol. 22, no. 2, pp. 291–300. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-COC-1964

2. Всемирная организация здравоохранения. Гепатит В. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
3. Семенов А.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Тюленев С.В., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. Роль цитокинов и хемокинов в лабораторной диагностике хронического вирусного гепатита С // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60, № 8. С. 45–51. [Semenov A.V., Arsentieva N.A., Lubimova N.E., Tulienev S.V., Basina V.V., Esaulenko E.V., Totolian A.A. The role of cytokines and chemokines in laboratory diagnostic of chronic viral hepatitis C. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, vol. 60, no. 8, pp. 45–51. (In Russ.)]
4. Учайкин В.Ф., Чередниченко Т.В., Смирнов А.В. Инфекционная гепатология. М.: ГЭОТАР-Мед, 2014. 627 с. [Uchaikin V.F., Cherednichenko T.V., Smirnov A.V. Infectious hepatology. Moscow: GEOTAR-Med, 2014. 627 p. (In Russ.)]
5. Capone F., Costantini S., Guerriero E., Calemma R., Napolitano M., Scala S., Izzo F., Castello G. Serum cytokine levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur. Cytokine Netw.*, 2010, vol. 21, no. 2, pp. 99–104. doi: 10.1684/ecn.2010.0192
6. Chen X., Qian Y., Yan F., Tu J., Yang X., Xing Y., Chen Z. 5'-triphosphate-siRNA activates RIG-I-dependent type I interferon production and enhances inhibition of hepatitis B virus replication in HepG2.2.15 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 2013, vol. 721, no. 1–3, pp. 86–95. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.09.050
7. Hassanshahi G., Jafarzadeh A., James Dickson A. Expression of stromal derived factor alpha (SDF-1 alpha) by primary hepatocytes following isolation and heat shock stimulation. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2008, vol. 7, no. 2, pp. 61–68.
8. Jegaskanda S., Ahn S.H., Skinner N., Thompson A.J., Ngyuen T., Holmes J., De Rose R., Navis M., Winnall W.R., Kramski M., Bernardi G., Bayliss J., Colledge D., Sozzi V., Visvanathan K., Locarnini S.A., Kent S.J., Revill P.A. Downregulation of interleukin-18-mediated cell signaling and interferon gamma expression by the hepatitis B virus e antigen. *J. Virol.*, 2014, vol. 88, no. 18, pp. 10412–10420. doi: 10.1128/JVI.00111-14
9. Jones B.A., Beamer M., Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol. Interv.*, 2010, vol. 10, no. 5, pp. 263–270. doi: 10.1124/mi.10.5.3
10. Kakimi K., Guidotti L.G., Koezuka Y., Chisari F.V. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J. Exp. Med.*, 2000, vol. 192, no. 7, pp. 921–930. doi: 10.1084/jem.192.7.921
11. Kondo Y., Kimura O., Tanaka Y., Ninomiya M., Iwata T., Kogure T., Inoue J., Sugiyama M., Morosawa T., Fujisaka Y., Shimosegawa T. Differential Expression of CX3CL1 in Hepatitis B Virus-Replicating Hepatoma Cells Can Affect the Migration Activity of CX3CR1+ Immune Cells. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 14, pp. 7016–7027. doi: 10.1128/jvi.00716-15
12. Matsubara T., Ono T., Yamanoi A., Tachibana M., Nagasue N. Fractalkine-CX3CR1 axis regulates tumor cell cycle and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *J. Surg. Oncol.*, 2007, vol. 95, no. 3, pp. 241–249. doi: 10.1002/jso.20642
13. Sun C., Fu B., Gao Y., Liao X., Sun R., Tian Z., Wei H. TGF- β 1 down-regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP expression on human NK cells contributes to HBV persistence. *PLoS Pathog.*, 2012, vol. 8, no. 3: e1002594. doi: 10.1371/journal.ppat.1002594
14. Tang L., Hu H.D., Hu P., Lan Y.H., Peng M.L., Chen M., Ren H. Gene therapy with CX3CL1/Fractalkine induces antitumor immunity to regress effectively mouse hepatocellular carcinoma. *Gene Ther.*, 2007, vol. 14, no. 16, pp. 1226–1234. doi: 10.1038/sj.gt.3302959
15. Zlotnik A., Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000, vol. 12, no. 2, pp. 121–127. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80165-x

Авторы:

Арсентьева Н.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Бацунов О.К., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; старший лаборант кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Любимова Н.Е., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Басина В.В., к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия;
Эсауленко Е.В., д.м.н., профессор, зав. лабораторией вирусных гепатитов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия;
Тотолян А.А., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Arsentieva N.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Batsunov O.K., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Liubimova N.E., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Basina V.V., PhD (Medicine), Assistant of the Department of Infectious Diseases Adults and Epidemiology St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Esaulenko E.V., DSc (Medicine), Professor, Head of the Viral Hepatitis Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Infectious Diseases Adults and Epidemiology St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian A.A., RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

СИНТЕТИЧЕСКИЙ ТИМИЧЕСКИЙ ГЕКСАПЕПТИД В КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ И НОРМАЛИЗАЦИИ ПРОФИЛЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ С МЕСТНЫМ НЕОТГРАНИЧЕННЫМ ОСТРЫМ ПЕРИТОНИТОМ

С.В. Ковалева¹, В.Н. Чапурина¹, Л.В. Ломтатидзе¹, Д.Э. Лягуша², Ю.В. Тетерин¹,
Н.К. Барова^{1,2}, К.И. Мелконян¹

¹ ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

² ГБУЗ Детская краевая клиническая больница Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

Резюме. Изучение дисрегуляторных нарушений иммунной системы, лежащих в иммунопатогенезе тяжелых гнойно-воспалительных заболеваний (ГВЗ), важно для разработки новых терапевтических тактик, направленных на восстановление антибактериальной иммунной защиты. Острый перитонит (ОП) — тяжелое ГВЗ брюшной полости, особенности течения и распространенность которого находятся в прямой зависимости как от проводимого лечения, так и от цитокинового баланса и адекватной работы клеток иммунной системы. Цель: оценить эффективность модулирующих влияний на дефектное функционирование иммунной системы и уровни провоспалительных цитокинов синтетического тимического гексапептида, являющегося действующей субстанцией препарата Имунофан, включенного в комплексное послеоперационное лечение иммунокомпрометированных детей с местным неотграниченным острым перитонитом. Проведено клинико-иммунологическое обследование 20 иммунокомпрометированных детей 5–12 лет с местным неотграниченным ОП до начала (группа исследования 1 — ГИ1) и после (группа исследования 1а — ГИ1а) комплексного послеоперационного лечения с включением иммуномодулирующей терапии с использованием синтетического тимического гексапептида (Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine), 20 условно здоровых детей (группа сравнения, ГС). Оценены содержание Т- и В-лимфоцитов, естественных киллерных клеток (ЕКК)

Адрес для переписки:

Ковалева Светлана Валентиновна
350063, Россия, г. Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4,
ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский
университет.
Тел.: 8 (918) 989-11-76.
E-mail: 3483335@mail.ru

Contacts:

Svetlana V. Kovaleva
350063, Russian Federation, Krasnodar, Mitrofan Sedin str., 4,
Kuban State Medical University.
Phone: +7 (918) 989-11-76.
E-mail: 3483335@mail.ru

Для цитирования:

Ковалева С.В., Чапурина В.Н., Ломтатидзе Л.В., Лягуша Д.Э., Тетерин Ю.В., Барова Н.К., Мелконян К.И. Синтетический тимический гексапептид в коррекции нарушений антибактериальной иммунной защиты и нормализации профиля провоспалительных цитокинов у иммунокомпрометированных детей с местным неотграниченным острым перитонитом // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 615–622. doi: 10.15789/2220-7619-STH-16743

Citation:

Kovaleva S.V., Chapurina V.N., Lomtadidze L.V., Lyagusha D.E., Teterin Yu.V., Barova N.K., Melkonyan K.I. Synthetic thymic hexapeptide in the correction of alterations of antibacterial immune defense and normalization of the profile of proinflammatory cytokines in immunocompromized children with local unlimited acute peritonitis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 615–622. doi: 10.15789/2220-7619-STH-16743

(CYTOMICS FC500, США), уровней сывороточных провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-8, IL-18 (ИФА), фагоцитарная и микробицидная активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ). В ГИ1 до лечения выявлено снижение количества Т-лимфоцитов CD3⁺CD19⁻, Т-хелперов CD3⁺CD4⁺, ЦТЛ-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ на фоне значительного уменьшения содержания ЕКК CD3⁻CD16⁺CD56⁺ и возрастания уровня В-лимфоцитов CD3⁻CD19⁺. Определены дефекты эффекторных функций НГ: нарушение киллинга бактериального антигена на фоне депрессии NADPH-оксидазной активности. Установлено, что при ОП у иммунокомпрометированных детей цитокиновый профиль в ГИ1 характеризовался гиперпродукцией изучаемых провоспалительных и нейтрофил-ассоциированных цитокинов. После проведенного комплексного лечения с включением иммуномодулирующей терапии в группе ГИ1а наблюдалось восстановление содержания Т-лимфоцитов CD3⁺CD19⁻, Т-хелперов CD3⁺CD4⁺, Т_{CTL}-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺, прирост количества ЕКК CD3⁻CD16⁺CD56⁺ на фоне снижения уровня В-лимфоцитов CD3⁻CD19⁺. Кроме того, отмечалась регрессия уровней провоспалительных, в том числе нейтрофил-ассоциированных, цитокинов, а также усиление эффекторных функций НГ за счет восстановления активности NADPH-оксидаз. Таким образом, восстановление иммунологических показателей при ОП приводит к более ранней регрессии гнойно-воспалительного процесса в брюшной полости и к отсутствию послеоперационных осложнений. Клинико-иммунологические эффекты программы иммуномодулирующей терапии с включением фармпрепарата на основе гексапептида определяет целесообразность ее использования в послеоперационном периоде у иммунокомпрометированных детей с местным неотграниченным ОП.

Ключевые слова: острый перитонит, иммунокомпрометированность, дети, иммуномодулирующая терапия, гексапептид, цитокины.

SYNTHETIC THYMIC HEXAPEPTIDE IN THE CORRECTION OF ALTERATIONS OF ANTIBACTERIAL IMMUNE DEFENSE AND NORMALIZATION OF THE PROFILE OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN IMMUNOCOMPROMIZED CHILDREN WITH LOCAL UNLIMITED ACUTE PERITONITIS

Kovaleva S.V.^a, Chapurina V.N.^a, Lomtatidze L.V.^a, Lyagusha D.E.^b, Teterin Yu.V.^a, Barova N.K.^{a,b}, Melkonyan K.I.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. The study of dysregulatory disorders of the immune system underlying the immunopathogenesis of severe purulent-inflammatory diseases (PIDs) is important for development of new therapeutic tactics of restoring antibacterial defense. Acute peritonitis (AP) is a severe PID of the abdominal cavity, the course of which are dependent on the treatment, cytokine balance and adequate functioning of the immunity. Objective: to evaluate the modulating effects on the immune system and the levels of proinflammatory cytokines of the synthetic thymic hexapeptide, active substance of Imunofan, included in the complex postoperative treatment (CPOT) of immunocompromised children with local AP. Clinical and immunological examination of 20 immunocompromised children aged 5–12 years with local AP was carried out before (study group 1, SG1) and after (study group 1a, SG1a) CPOT including synthetic thymic hexapeptide (Arginyl-alpha-Aspartyl-Lysyl-Valyl-Tyrosyl-Arginine, HP), alongside 20 conditionally healthy children (comparison group, SG). The content of T and B lymphocytes, natural killer cells (NK), levels of serum pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-8, IL-18, phagocytic and microbicidal activity of neutrophils (NG) were assessed. In SG1, before treatment, a decrease in the number of T lymphocytes, T helpers, CTL-lymphocytes, NK and an increase in the level of B lymphocytes was revealed. Defects in the effector functions of NG were determined: impaired bacterial antigen killing and decreased NADPH oxidase activity. It was established that in case of AP in immunocompromised children, the cytokine profile is characterized by overproduction of studied proinflammatory and neutrophil-associated cytokines. After complex treatment including immunomodulatory therapy, there was a restoration of the content of T lymphocytes, T helper cells, TCTL lymphocytes, an increase in the number of NK and decrease in the level of B lymphocytes. In addition, regression of the levels of inflammatory, including neutrophil-associated, cytokines and emergence of effector functions of NG due to restoration of NADPH oxidases activity, was noted. Thus, the restoration of immunological parameters in AP leads to earlier regression of the purulent-inflammatory process in the abdominal cavity and to the absence of postoperative complications. The clinical and immunological effects of the immunomodulatory therapy program with inclusion of the drug based on HP determines the feasibility of its use in the postoperative period in immunocompromised children with local AP.

Key words: acute peritonitis, immunocompromise, children, immunomodulatory therapy, hexapeptide, cytokines.

Введение

Лечебные подходы при тяжелых гнойно-воспалительных заболеваниях (ГВЗ) у детей традиционно направлены на элиминацию патогена и купирование гнойно-воспалительного процесса, но при этом зачастую не учитываются дисрегуляторные нарушения иммунной системы (ИС), лежащие в иммунопатогенезе данных заболеваний. В связи с чем чрезвычайно важен для иммунологии и хирургии детского возраста поиск новых терапевтических тактик, позволяющих восстанавливать механизмы антибактериальной иммунной защиты, и тем самым позитивно модифицировать течение гнойно-воспалительного процесса. По-прежнему, одним из наиболее тяжелых и опасных осложнений заболеваний органов брюшной полости с вовлечением в гнойно-воспалительный процесс брюшины является острый перитонит (ОП). За последние 30 лет летальность при развитии ОП, несмотря на совершенствование хирургических и терапевтических тактик, не достигла значительного снижения и составляет 25–30%, а при развитии синдрома полиорганной недостаточности резко возрастает до 50%, что определяет медицинскую и социальную значимость проблемы [1, 10]. Характер повреждения брюшины, распространенность гнойно-воспалительного процесса, особенности течения ОП находятся в прямой зависимости от адекватности как оперативного вмешательства, так и проводимой терапевтической тактики [3]. В то же время ОП рассматривается не только как исключительно хирургическая патология. Особенности состояния ИС каждого индивидуума определяют сценарий развития иммунного ответа при воспалении. Развитие отграниченного локального очага воспаления в брюшине прослеживается при адекватном реагировании ИС. Прогрессирование воспалительного процесса при ОП обусловлено дефектным реагированием ИС на инфекцию, что не обеспечивает полноценной элиминации патогенов. Зачастую гнойный ОП формируется на фоне уже имеющейся дисрегуляции ИС и иммунокомпрометации [9, 11].

При ОП активация клеток ИС, вовлеченных в воспаление и продуцирующих цитокины, происходит под влиянием микробных экзотоксинов и эндотоксинов, образующихся при деструкции тканей. Нарушение цитокинового баланса при ОП приводит к тому, что повышение уровней провоспалительных цитокинов гиперактивирует клетки иммунной системы, которые начинают оказывать деструктивное действие на ткани не только в очаге инфекции, но и в других органах, вследствие чего развивается синдром полиорганной недостаточности,

сепсис и септический шок. Таким образом, именно состояние противоинфекционных иммунных механизмов определяют клинический исход перитонита, а возможность выведения пациента из критического состояния при ОП в значительной мере связана с восстановлением адекватной работы ИС [11, 12].

В настоящее время проведены научные исследования, направленные на разработку персонализированных программ иммуномодулирующей терапии при ГВЗ различной локализации и степени тяжести. Одним из препаратов, хорошо зарекомендовавшем себя в лечении вторичного иммунодефицита при ГВЗ, является фармпрепарат Имунофан, основной действующей субстанцией которого является синтетический тимический Гексапептид (фпГП, Arginyl-alphaaspartyl-lysyl-valyl-thyrosyl-argininum) [5, 9].

Гексапептид — синтетический фрагмент активного центра гормона тимопоэтина, обладает всеми биологически активными функциями тимического гормона [4]. ФпГП разрешен к применению в РФ у детей в комплексной терапии вторичных иммунодефицитов и токсических состояний с 2-летнего возраста. Препарат оказывает иммунорегуляторное воздействие на Т-клеточный иммунитет, синтез цитокинов, функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ), моноцитов, тем самым усиливает эффективность антибактериальной терапии, профилактирует множественную лекарственную резистентность. ФпГП обладает гепатопротекторными и антиоксидантными свойствами [5, 6]. Многовекторная направленность работы фпГП послужила основанием для его использования в данном исследовании.

Цель исследования — оценить эффективность модулирующих влияний на дефектное функционирование иммунной системы и уровни провоспалительных цитокинов синтетического тимического гексапептида, являющегося действующей субстанцией препарата Имунофан, включенного в комплексное послеоперационное лечение иммунокомпрометированных детей с местным неотграниченным острым перитонитом.

Материалы и методы

В группу исследования (ГИ) были включены 20 детей обоего пола (12 мальчиков, 8 девочек) в возрасте 5–12 лет с диагнозом местный неотграниченный острый перитонит (ОП), поступивших на стационарное лечение в хирургическое отделение № 1 ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» МЗ Краснодарского края (г. Краснодар). У детей с ОП были выявлены клинические критериальные признаки иммунокомпрометированности с использованием

программы «Иммунологический анамнез» [7]. Дети с ОП в течение 1 года переносили рекуррентные ОРВИ (более 10 в год), продолжительностью 10 и более дней, при этом наблюдалось присоединение бактериальных инфекций ЛОР-органов и дыхательных путей с применением антибактериальной терапии (6 и более раз в год). При ОП у детей имела место плохая отвечаемость на стартовую эмпирическую антибактериальную терапию препаратами из группы цефалоспоринов 3-го поколения, что требовало последующей коррекции курса антибактериальной терапии в зависимости от выявленного возбудителя и его чувствительности к антибиотикам и/или использования препаратов из группы резерва.

Сформированы 2 группы исследования: группа исследования 1 (ГИ1, $n = 20$) — дети с ОП до начала лечения; группа исследования 1а (ГИ1а, $n = 20$) — дети с ОП после окончания комплексного послеоперационного лечения с использованием иммуномодулирующей терапии. Группу сравнения (ГС) составили 20 условно здоровых детей сопоставимых по полу и возрасту.

Программа комплексного послеоперационного лечения включала в себя стандартную терапию (антибактериальную терапию препаратами групп карбопенемомов и/или гликопептидов, инфузионную, дезинтоксикационную и противогрибковую терапию) и иммуномодулирующую терапию с использованием внутримышечных инъекций фпГП (Имунофан) 45 мкг/мл 1 мл через 24 часа — 5 дней, далее через 48 часов — 1 день. Курсовая доза составила 270 мкг (6 инъекций).

Методом проточной цитометрии (Cytomics FC-50, Вектап Coulter, США) производилось фенотипирование лимфоцитов с использованием соответствующих МкАТ, меченных различными флюорохромами ($CD3^+CD19^-$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD19^+$, $CD3^+CD16^+CD56^+$) с вычислением ИРИ. Детекция цитокинового профиля осуществлялась методом иммуноферментного анализа (тест-системы ООО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) — сывороточные IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-8, IL-18. «Фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ) определяли по показателям активно фагоцитирующих НГ (%ФАН), процессов захвата (ФЧ, ФИ) и степени завершенности фагоцитарного акта (%П, ИП). NADPH-оксидазную активность — по показателям NBT-теста спонтанного и стимулированного (*S. aureus*), учитывая процент формазан-позитивных НГ (%ФПК), средний цитохимический индекс (СЦИ), по соотношению %ФПКст/%ФПКсп рассчитывался коэффициент мобилизации (КМ)» [8].

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Анализ выборки проводился путем определения медианы (Me) и интерквартильного размаха ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$). Для выявления статистически значимых различий между выборками использовались непараметрические критерии Манна-Уитни и Вилкоксона. Статистический анализ данных выполнялся с использованием программных пакетов Microsoft Excel 2016 и StatPlus версии 2010.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного обследования детей ГИ1 до начала комплексного послеоперационного лечения отмечалось возрастание в 1,6 раза количества лейкоцитов ($p < 0,05$) за счет увеличения абсолютных и относительных значений НГ ($p_{1,2} < 0,05$) с палочкоядерным сдвигом 6,00 (4,50–12,00)% и снижения содержания лимфоцитов ($p_{1,2} < 0,05$) относительно показателей ГС (табл. 1).

Анализ полученных данных при изучении клеточного иммунитета детей с ОП до начала лечения позволил выявить снижение Т-лимфоцитов $CD3^+CD19$ ($p < 0,05$) за счет уменьшения как Т-хелперов $CD3^+CD4^+$ ($p < 0,05$), так и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) $CD3^+CD8^+$ ($p < 0,05$), дефицит естественных киллерных клеток (ЕКК) $CD3^+CD16^+CD56^+$ ($p < 0,05$) на фоне возрастания В-лимфоцитов $CD3^+CD19^+$ ($p < 0,05$) в сравнении с показателями ГС (табл. 1).

Изучение эффекторных функций НГ продемонстрировало наличие дефектов фагоцитарной и киллинговой активности. Так у детей ГИ1 в сравнении с показателями ГС на фоне гнойно-воспалительного процесса отсутствовали необходимые прирост активно-фагоцитирующих клеток (%ФАН) ($p > 0,05$) и усиление механизмов захвата бактериального антигена (ФЧ и ФИ, $p_{1,2} > 0,05$). При этом наблюдалось снижение переваривающей способности НГ (%П и ИП, $p_{1,2} < 0,05$), взаимосвязанной с отсутствием активации продукции кислородных радикалов в спонтанном (%ФПК и СЦИ, $p_{1,2} > 0,05$) и стимулированном (%ФПК и СЦИ, $p_{1,2} > 0,05$) NBT-тестах на фоне сохранения резервных возможностей НГ (КМ, $p > 0,05$) (табл. 2).

Цитокиновый профиль в ГИ1 характеризовался значительным увеличением содержания провоспалительных цитокинов. Так, выявлено увеличение в 14 раз IL-6 91,04 (62,90–96,21) пг/мл против 6,43 (6,22–6,67) пг/мл в ГС ($p < 0,05$), в 2,9 раза IL-1 β 13,25 (7,50–16,78) пг/мл относительно 4,61 (4,39–4,83) пг/мл в ГС ($p <$

0,05), в 1,6 раза TNF α 7,46 (6,62–12,14) пг/мл против 4,80 (2,20–5,90) пг/мл в ГС ($p < 0,05$) (рис.). Также отмечалось возрастание нейтрофил-ассоциированных цитокинов в ГИ1 IL-8 в 1,6 раза до 8,89 (7,31–11,67) пг/мл против 5,61 (3,67–6,98) пг/мл в ГС ($p < 0,05$) и в 2,3 раза IL-18 до 733,01 (576,89–956,61) пг/мл против 319,8 (64,8–339,8) пг/мл в ГС ($p < 0,05$) (рис.).

При оценке эффективности программы комплексного послеоперационного лечения с вклю-

чением иммуномодулирующей терапии с использованием фпГП у детей с местным неотграниченным ОП были выявлены следующие клинические эффекты. В 100% случаев через 2 (1,0–2,5) дня после начала использования иммуномодулирующей терапии происходила нормализация температурной реакции с одновременным купированием интоксикационного синдрома, а также отсутствовали ранние послеоперационные осложнения в виде нагноения швов.

Таблица 1. Показатели иммунного статуса иммунокомпromетированных детей 5–12 лет с ОП на фоне комплексного послеоперационного лечения с включением иммуномодулирующей терапии, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Table 1. Indicators of the immune status of immunocompromised children 5–12 years old with ap against the background of complex postoperative treatment including immunomodulatory therapy, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Группа сравнения Comparison group	Группа исследования до лечения(ГИ1) Study group before treatment (SG1)	Группа исследования после лечения (ГИ1а) Study group after treatment (SG1a)
WBC, $\times 10^9$ /л WBC, $\times 10^9$ /L	6,40 (5,00–7,20)	10,68 (7,27–15,99)*	6,95 (6,35–9,44)
ЛФ, % LY, %	37,25 (33,44–31,47)	18,00 (7,00–23,25)*	43,00 (35,50–48,50)* ^
ЛФ, $\times 10^9$ /л LY, $\times 10^9$ /L	2,47 (2,38–2,50)	1,86 (0,89–2,19)*	2,72 (2,32–3,53)^
НГ, % NG, %	57,00 (46,00–58,50)	76,50 (66,00–86,25)*	50,00 (46,00–62,00)^
НГ, $\times 10^9$ /л NG, $\times 10^9$ /L	3,65 (2,39–4,33)	7,84 (6,03–10,56)*	3,72 (2,56–4,28)^
Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁻ , % T lymphocytes CD3 ⁺ CD19 ⁻ , %	75,73 (70,75–78,18)	59,67 (51,23–66,40)*	65,50 (57,65–72,84)
Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁻ , $\times 10^9$ /л T lymphocytes CD3 ⁺ CD19 ⁻ , $\times 10^9$ /L	1,85 (1,71–1,92)	1,27 (0,94–1,63)*	1,90 (1,74–2,28)^
Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺ , % T helpers CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	46,95 (40,31–48,65)	30,85 (26,48–38,70)*	36,40 (35,60–40,75)
Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺ , $\times 10^9$ /л T helpers CD3 ⁺ CD4 ⁺ , $\times 10^9$ /L	1,06 (0,97–1,32)	0,66 (0,50–0,72)*	1,04 (0,93–1,42)^
ЦТЛ CD3 ⁺ CD8 ⁺ , % CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	34,73 (33,43–38,93)	23,70 (20,20–27,20)*	26,00 (23,30–31,20)*
ЦТЛ CD3 ⁺ CD8 ⁺ , $\times 10^9$ /л CTL CD3 ⁺ CD8 ⁺ , $\times 10^9$ /L	0,91 (0,79–0,98)	0,44 (0,34–0,62)*	0,76 (0,71–1,09)^
ИРИ CD4/CD8 IRI CD4/CD8	1,47 (1,39–1,49)	1,22 (1,13–1,60)	1,25 (1,03–1,61)
ЕКК, % CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺	19,88 (17,12–19,8)	5,30 (3,40–8,80)*	11,70 (9,30–17,70)^
ЕКК, $\times 10^9$ /л CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺ ЕКК, $\times 10^9$ /L CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,48 (0,35–0,56)	0,10 (0,05–0,15)*	0,27 (0,25–0,38)^
В-лимфоциты CD3-CD19 ⁺ , % B lymphocytes CD3-CD19 ⁺ , %	11,42 (9,20–12,68)	27,10 (20,35–32,15)*	15,80 (8,70–17,74)^
В-лимфоциты CD3-CD19 ⁺ , $\times 10^9$ /л B lymphocytes CD3-CD19 ⁺ , $\times 10^9$ /L	0,28 (0,22–0,29)	0,53 (0,42–0,82)*	0,42 (0,25–0,59)

Примечание. * — отличия показателей исследуемых групп с острым перитонитом от показателей условно здоровых детей, $p < 0,05$;

^ — различия между группами исследования, $p < 0,05$.

Note. * — differences in the indicators of the study groups with acute peritonitis from the indicators of conditionally healthy children, $p < 0.05$;

^ — differences between study groups, $p < 0.05$.

Таблица 2. Показатели фагоцитарной и NADPH-оксидазной микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов иммунокомпromетированных детей 5–12 лет с ОП на фоне комплексного послеоперационного лечения с включением иммуномодулирующей терапии, Ме ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

Table 2. Indicators of phagocytic and nadph oxidase microbicidal activity of neutrophil granulocytes of immunocompromised children 5–12 years old with ap against the background of complex postoperative treatment including immunomodulatory therapy, me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

Показатель Indicator	Группа сравнения Comparison group	Группа исследования до лечения(ГИ1) Study group before treatment (SG1)	Группа исследования после лечения (ГИ1а) Study group after treatment (SG1a)
%ФАН/%PhAN	55,0 (50,20–57,50)	52,00 (48,00–60,00)	67,50 (57,00–72,00)
ФЧ/PhN	4,10 (3,50–5,70)	3,57 (2,67–4,43)	3,37 (3,02–4,04)
ФИ/PhI	2,50 (1,90–3,30)	1,76 (1,36–2,36)	1,96 (1,50–2,57)
%П/%D	62,6 (57,90–62,90)	43,51 (37,13–46,98)*	50,36 (48,70–52,93)^
ИП/DI	1,6 (1,30–1,90)	0,88 (0,68–1,00)*	1,37 (1,22–1,42)^
NBT-тест/NBT-test			
%ФПК спонтанный/%FPC spontaneous	2,00 (1,00–3,70)	2,00 (1,00–5,00)	3,00 (1,00–5,00)
СЦИ спонтанный/SCI spontaneous	0,09 (0,06–0,16)	0,03 (0,02–0,11)	0,16 (0,15–0,22)^
%ФПК стимулированный/%FPC stimulated	4,30 (4,00–10,00)	7,00 (3,50–11,50)	15,00 (10,50–16,50)* ^
СЦИ стимулированный/SCI stimulated	0,15 (0,16–0,28)	0,17 (0,07–0,44)	0,41 (0,27–0,46)
КМ/МС	1,90 (1,50–2,50)	1,48 (0,17–2,16)	4,00 (3,50–7,00)* ^

Примечание. См. примечание к табл. 1.

Note. As for Table 1.

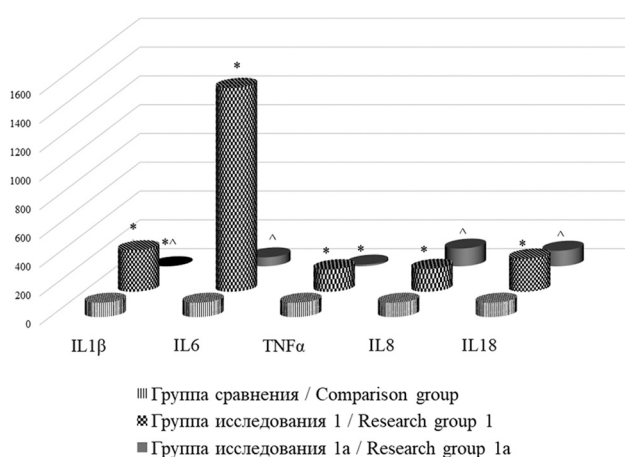


Рисунок. Динамика изменения цитокинового профиля иммунокомпromетированных детей 5–12 лет с острым перитонитом до и после комплексного послеоперационного лечения с включением иммуномодулирующей терапии (процент от группы сравнения)

Figure. Dynamics of changes in the cytokine profile of immunocompromised children 5–12 years old with acute peritonitis before and after complex postoperative treatment including immunomodulatory therapy (percentage of the comparison group)

Примечание. * — отличия показателей исследуемых групп с острым перитонитом от показателей условно здоровых детей, $p < 0,05$; ^ — различия между группами исследования, $p < 0,05$.

Note. * — differences in the indicators of the study groups with acute peritonitis from the indicators of conditionally healthy children, $p < 0,05$; ^ — differences between study groups, $p < 0,05$.

Применение программы иммуномодулирующей терапии с использованием фпГП, включенной в комплексное послеоперационное лечение детей с местным неотграниченным ОП привело к позитивным изменениям в ИС. Так, в ГИ1а отмечалось восстановление количества лейкоцитов, абсолютного содержания лимфоцитов и НГ относительно показателей до лечения и ГС (табл. 1).

После проведения комплексного лечения с включением фпГП наблюдалось увеличение абсолютного количества Т-лимфоцитов $CD3^+CD19$ ($p < 0,05$) за счет возрастания как Т-хелперов $CD3^+CD4^+$ ($p < 0,05$), так и ЦТЛ $CD3^+CD8^+$ ($p < 0,05$) против значений в ГИ1, достигающих показателей ГС ($p_{1-3} > 0,05$). Значительный дефицит ЕКК $CD3^-CD16^+CD56^+$ в ГИ1 на фоне комплексного послеоперационного лечения уменьшился в ГИ1а, но при этом количество ЕКК не достигло значений условно здоровых детей ($p < 0,05$). На этом фоне отмечалось снижение до значений условно здоровых детей относительного содержания В-лимфоцитов $CD3^-CD19^+$ ($p > 0,05$) (табл. 1).

При изучении эффекторных функций НГ в ГИ1а относительно показателей ГИ1 отмечается увеличение активно-фагоцитирующих клеток (%ФАН, $p < 0,05$) и усиление процессов переваривания (%П и ИП, $p_{1-2} < 0,05$), не достигающих значений ГС ($p_{1-2} < 0,05$). Выявлено увеличение спонтанной (%ФПК, $p > 0,05$; СЦИ, $p < 0,05$) и стимулированной продукции кислородных радикалов (%ФПК, $p < 0,05$; СЦИ, $p > 0,05$) в NBT-тестах по отношению к показателям

ГИ1. При этом значимо улучшились резервные возможности НГ (КМ, $p < 0,05$) по отношению к показателям ГИ1 и ГС (табл. 2).

Уровни провоспалительных цитокинов в ПК ГИ1а снизились в сравнении со значениями ГИ1. Так уровень IL-6 снизился в 22,8 раза с 91,04 (62,90–96,21) пг/мл в ГИ1 до 3,98 (2,65–6,44) пг/мл ($p < 0,05$), TNF α в 13,3 раза с 7,46 (6,62–12,14) пг/мл в ГИ1 до 0,56 (0,01–7,35) пг/мл ($p > 0,05$), а уровень IL-1 β снизился до 0,1 (0,1–0,1) пг/мл против 13,25 (7,50–16,78) в ГИ1 ($p < 0,05$) и стал ниже значений в ГС ($p < 0,05$) (рис.).

По окончании лечения с включением фпГП в ГИ1а наблюдалось снижение нейтрофил-ассоциированных цитокинов до показателей условно здоровых детей. Так, IL-8 снизился в 1,3 раза с 8,89 (7,31–11,67) пг/мл в ГИ1 до 6,89 (1,98–6,91) пг/мл в ГИ1а, а IL-18 — в 2 раза с 733,01 (576,89–956,61) пг/мл в ГИ1 до 345,41 (304,01–442,51) пг/мл в ГИ1а ($p < 0,05$) (рис.). Восстановление уровней нейтрофил-ассоциированных цитокинов сопровождалось улучшением эффекторных функций НГ.

Важно отметить и то, что гиперпродукция провоспалительных цитокинов, отмечаемая до начала лечения детей с ОП, к окончанию комплексного послеоперационного лечения с включением иммуномодулирующей терапии фпГП полностью нивелировалась, что сочеталось с нормализацией клеточных факторов врожденного и адаптивного иммунитета.

Заключение

Оценка эффективности влияний на дефектное функционирование иммунной системы и уровни провоспалительных цитокинов синтетического тимического гексапептида, являющегося действующей субстанцией препарата Имунофан, включенного в комплексное послеоперационное лечение иммунокомпрометированных детей с местным неотграниченным острым перитонитом, продемонстрировала статистически достоверное позитивное влияние препарата, восстановившего состояние нарушенных механизмов противоинфекционной иммунной защиты на фоне нормализации профиля сывороточных провоспалительных, в том числе нейтрофил-ассоциированных цитокинов. Показан иммунопатогенетический характер позитивных иммуномодулирующих воздействия фпГП на выявленные нарушения Т-клеточного звена, ЕКК, эффекторные функции НГ, на цитокиновый дисбаланс с регрессией гиперпродукции провоспалительных цитокинов, отсутствие усугубления дисфункций иммунной системы. Позитивная иммунологическая эффективность фпГП была ассоциирована с позитивной клинической эффективностью: более быстрое разрешение гнойно-воспалительного процесса, отсутствие ранних послеоперационных осложнений, значительное снижение риска развития септических осложнений.

Список литературы/References

1. Власов А.П., Аль-Кубайси Ш., Власова Т.И., Лещанкина Н.Ю., Окунев Н.А., Шейранов Н.С., Полозова Э.И. Состояние системы гемостаза при остром тяжелом перитоните на фоне терапии Ремаксолом // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2019. Т. 2. С. 65–71. [Vlasov A.P., Al-Kubaysi Sh., Vlasova T.I., Leshchankina N.Yu., Okunev N.A., Sheyranov N.S., Polozova E.I. The condition of the hemostatic system in acute severe peritonitis during remaxol therapy (in Russian only). *Khirurgiya = Surgery*, 2019, vol. 2, pp. 65–71. (In Russ.)]
2. Гурбанов Р.Г., Джамбетова П.М. Антиоксидантный потенциал препарата «Имунофан» // Universum: химия и биология. 2023. № 8–1 (110). С. 5–9. [Gurbanov R.G., Dzhambetova P.M. Antioxidant potential of the preparation "Imunofan". *Universum: khimiya i biologiya = Universum: Chemistry and Biology*, 2023, no. 8–1 (110), pp. 5–9. (In Russ.)]
3. Завьялкин В.А., Барская М.А. Комплексный подход к лечению распространенного перитонита у детей // Медицинский альманах. 2019. № 5–6 (61). С. 53–57. [Zavyalkin V.A., Barskaya M.A. An integrated approach to the treatment of diffuse peritonitis in children. *Meditsinskiy almanakh = Medical Almanac*, 2019, no. 5–6 (61), pp. 53–57. (In Russ.)]
4. Кузник Б.И., Цыбиков М.Н., Лиханов И.Д. Действие имунофана на уровень провоспалительных цитокинов и показатели системной воспалительной реакции у больных с острым гнойным перитонитом // Анналы хирургии. 2012. № 3. С. 30–33. [Kuznik B.I., Tsybikov M.N., Likhonov I.D. The effect of imunofan on the level of pro-inflammatory cytokines and indicators of the systemic inflammatory response in patients with acute purulent peritonitis. *Annaly khirurgii = Annals of Surgery*, 2012, no. 3, pp. 30–33. (In Russ.)]
5. Маркова Т.П., Чувилов Д.Г. Имунофан в комплексном лечении детей с повторными респираторными заболеваниями и микоплазменной инфекцией // Эффективная фармакотерапия. 2022. Т. 18 (12). С. 12–18. [Markova T.P., Chuvirov D.G. Immunotherapy with Imunofan to the Treatment of Children with Recurrent Respiratory Disease and Mycoplasma Pneumoniae Infection. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, vol. 18 (12), pp. 12–18. (In Russ.)]
6. Нестерова И.В., Малиновская В.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А. Интерферонои иммунотерапия в лечении нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний у детей и взрослых. USA, GB, M.: Capricorn Publishing, 2020. 366 с. [Nesterova I.V., Malinovskaya V.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A. Interferon and immunotherapy in the treatment of atypical infectious and inflammatory diseases in children and adults]. USA, GB, M.: Capricorn Publishing, 2020. 366 p.
7. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Евлевский А.А. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии. Методические рекомендации. Краснодар, 2017. 52 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V., Kolesnikova N.V., Yevlevsky A.A. Methods for comprehensive assessment of the functional activity of neutrophil granulocytes in health and disease (guidelines). *Krasnodar*, 2017. 52 p.

8. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Ковалева С.В., Тетерин Ю.В., Барова Н.К., Лягуша Д.Э., Тараканов В.А. Клинико-иммунологическая эффективность программы иммунотерапии в послеоперационном лечении детей с различными формами острых перитонитов // Медицинская иммунология. 2022. Т. 24, № 3. С. 553–572. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Kovaleva S.V., Teterin Yu.V., Barova N.K., Lyagusha D.E., Tarakanov V.A. Clinical and immunological effectiveness of the immunotherapy program in the postoperative treatment of children with various forms of acute peritonitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, vol. 24, no. 3, pp. 553–572. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563–0625-CAI-2470.
9. Погорелов М.В., Богданов С.Г., Климова С.В., Маркина А.В., Тимачев В.М. Опыт лечения распространенного гнойного перитонита у детей с использованием отрицательного давления // Педиатрический вестник Южного Урала. 2020. № 2. С. 47–53. [Pogorelov M.V., Bogdanov S.G., Klimova S.V., Markina A.V., Timachev V.M. Experience in the treatment of generalized purulent peritonitis in children using the technique of negative pressure. *Pediatricheskii vestnik Yuzhnogo Urala = Pediatric Bulletin of the South Ural*, 2020, no. 2, pp. 47–53. (In Russ.)]
10. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Кудрявцев И.В. Состояние клеточного и гуморального иммунитета в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 63–70. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetsky D.E., Kudryavtsev I.V. The state of cellular and humoral immunity depending on the outcome of widespread purulent peritonitis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 63–70. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220–7619-2015–1-63–70.
11. Чепурных Е.Е., Шурыгина И.А., Шаульская Е.С., Шурыгин М.Г. Роль цитокинов в патогенезе развития распространенного гнойного перитонита // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2016. Т. 1, № 4 (110). С. 177–182. [Chepurnykh E.E., Shurygina I.A., Shaulskaia E.S., Shurygin M.G. The role of cytokines in the pathogenesis of the development of widespread purulent peritonitis. *Bulleten Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2016, vol. 1, no. 4 (110), pp. 177–182. (In Russ.)]

Авторы:

Ковалева С.В., д.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чапурина В.Н., к.м.н., ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Ломтатидзе Л.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Лягуша Д.Э., врач-педиатр хирургического отделения № 1 ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

Тетерин Ю.В., аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Барова Н.К., к.м.н., доцент, зав. кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; зав. хирургическим отделением № 1 ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

Мелконян К.И., к.м.н., зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия.

Authors:

Kovaleva S.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Scientific Research Laboratory, Associate Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chapurina V.N., PhD (Medicine), Assistant Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Research Associate of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Lomtadze L.V., PhD (Biology), Senior Research Associate of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Scientific Research Laboratory, Associate Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Lyagusha D.E., Pediatrician of the Surgical Department No. 1, Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation
Teterin Yu.V., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Barova N.K., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar; Head, Surgical Department No. 1, Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Melkonyan K.I., PhD (Medicine), Head of Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation.

ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД К РЕАБИЛИТАЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С КРУГЛОГОДИЧНЫМ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ, СТРАДАЮЩИХ РЕКУРРЕНТНЫМИ ОРВИ И РЕЦИДИВИРУЮЩИМИ ГЕРПЕСВИРУСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Е.О. Халтурина^{1,3}, Н.В. Гарскова^{2,3}, А.Д. Шеметова¹

¹ ФГАОУ ВО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² Академия постдипломного образования ФГБУ Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва, Россия

³ Клинико-диагностический центр МЕДСИ на Белорусской, Москва, Россия

Резюме. Введение. На сегодняшний день все более актуальной становится проблема лечения пациентов с респираторной аллергопатологией, ассоциированной с рецидивирующими инфекционными заболеваниями, такими как рОРВИ, частые обострения рХГВИ. Наличие персистирующего воспаления и коинфицирования значительно осложняют лечение иммунокомпromетированных пациентов с круглогодичным аллергическим ринитом (КАР) и обуславливают необходимость в разработке персонализированных программ, с включением в терапию локальных и системных иммуномодулирующих препаратов, направленных на восстановление дисрегуляторных нарушений в иммунной системе и системе интерферонов (IFN). *Материалы и методы.* В группу исследования (ГИ) были включены 65 пациентов обоего пола в возрасте 23–60 лет, страдающие КАР, ассоциированным с рОРВИ и рХГВИ. Группу сравнения (ГС) составили 50 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами ГИ. Всем пациентам ГИ проведено стандартное физикальное, иммунологическое и расширенное аллергологическое обследование, включающее использование серологических (ИФА, ImmunoCUP), молекулярно-генетических (ПЦР-РВ) методов исследования, проточной цитофлюориметрии и пр. От всех пациентов получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Статистическая обработка проведена с использованием компьютерных программ StatPlus. *Результаты и обсуждение.* У пациентов с КАР, ассоциированным с рОРВИ и рХГВИ, установлены два варианта нарушений механизмов врожденного и адаптивного иммунитета, которые определены как патологические иммунофенотипы (ПИФ). Первый ПИФ характеризуется дефицитом индуцированной продукции IFN α 2–3-й степени, снижением количества ЕКК CD3⁺CD16⁺CD56⁺, снижением количества нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Во втором ПИФ наряду с дефицитом продукции IFN α 2–3-й степени, наблюдается снижение количества ЕКК в сочетании со снижением количества ЦТЛ, а также снижение количества НГ. Изучены

Адрес для переписки:

Халтурина Евгения Олеговна
125009, Россия, Москва, ул. Моховая, 11, стр. 10,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет).
Тел.: 8 (916) 650-15-14.
E-mail: jane_k@inbox.ru

Contacts:

Evgeniya O. Khalturina
125009, Russian Federation, Moscow, Mohovaya str., 11, bild.10,
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.
Phone: +7 (916) 650-15-14.
E-mail: jane_k@inbox.ru

Для цитирования:

Халтурина Е.О., Гарскова Н.В., Шеметова А.Д. Персонализированный подход к реабилитации иммунной системы у пациентов с круглогодичным аллергическим ринитом, страдающих рекуррентными ОРВИ и рецидивирующими герпесвирусными инфекциями // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 623–631.
doi: 10.15789/2220-7619-PAT-16826

Citation:

Khalturina E.O., Garskova N.V., Shemetova A.D. Personalized approach to immune system rehabilitation in patients with year-round allergic rhinitis suffering from recurrent ARVI and recurrent herpes virus infections // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 623–631. doi: 10.15789/2220-7619-PAT-16826

клинические критерии иммунокомпрометированности у этой когорты пациентов (частота рОРВИ, рХГВИ в год), оценена тяжесть симптомов КАР с использованием классической 10-бальной шкалы ВАШ. С целью коррекции выявленных нарушений в ИС и системе интерферонов разработаны комплексные персонализованные для каждого ПИФ программы интерфероно- и иммунотерапии, включающие пролонгированную локальную (гель) и системную (суппозитории) терапию рIFN α 2b в комплексе с антиоксидантами, а также ГМДП для пациентов ГИ1, а для пациентов ГИ2 — ГМДП и гексапептид (Имунофан). Показана высокая иммунологическая и клиническая эффективность проводимой интерфероно- и иммунотерапии, что выразилось в тенденции к восстановлению имеющихся нарушений в ИС, а также в достижении контроля над симптомами КАР, с возможностью снижения объема базисной противоаллергической фармакотерапии. Таким образом, доказана актуальность разработки персонализованных программ реабилитации ИС для иммунокомпрометированных пациентов, страдающих КАР и сопутствующими рОРВИ и рХГВИ.

Ключевые слова: аллергический ринит, рекуррентные ОРВИ, хронические герпесвирусные инфекции, интерферон α 2b, глюкозаминилмурамилдипептид, гексапептид.

PERSONALIZED APPROACH TO IMMUNE SYSTEM REHABILITATION IN PATIENTS WITH YEAR-ROUND ALLERGIC RHINITIS SUFFERING FROM RECURRENT ARVI AND RECURRENT HERPES VIRUS INFECTIONS

Khalturina E.O.^{a,c}, Garskova N.V.^{b,c}, Shemetova A.D.^a

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

^b Academy of Postgraduate Education of the Federal Research and Clinical Centre FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

^c MEDSI Clinical Diagnostic Center at Belorusskaya, Moscow, Russian Federation

Abstract. Introduction. The problem of treating patients with respiratory allergopathology associated with recurrent infectious diseases, such as rARVI, frequent exacerbations of rCHVI, is becoming urgent. The presence of persistent inflammation and co-infection significantly complicates the treatment of immunocompromised patients with year-round allergic rhinitis (YAR) and necessitates the development of personalized programs, with the inclusion of immunomodulatory agents for restoring disorders in the immune system (IS) and interferon system (IFN). **Materials and methods.** The study group (SG) included 65 patients of both sexes aged 23–60 years, suffering from YAR associated with rARVI and rCHVI. The comparison group (CG) consisted of 50 healthy individuals, comparable in sex and age. All patients underwent standard physical, immunological and allergological examinations, including the use of serological (ELISA, ImmunoCUP), molecular genetic (PCR-RV) methods, FC, etc. Voluntary informed consent was obtained from all patients. The StatPlus computer program was used for statistical analysis. **Results and discussion.** In patients with YAR associated with rARVI and rCHVI, two variants of disorders in IS have been established, which are defined as pathological immunophenotypes (PIF). The PIF1 is characterized by a deficiency in the induced production of IFN α , a decrease in CD3⁺CD16⁺CD56⁺ EKKs, and a decrease in neutrophil granulocytes (NG). In the PIF2, along with a shortage of IFN α production, a decrease in EKKs is observed in combination with a decrease in CTLs, as well as a decrease in NGs. The clinical criteria for immunocompromising in this cohort of patients were studied. The severity of YAR symptoms was assessed by VAS. In order to correct the identified disorders in the IS and IFN system, complex personalized IFN- and immunotherapy programs have been developed for each PIF, including prolonged local and systemic therapy with rIFN α 2b in combination with antioxidants, as well as GMDP for patients of SG1, and for patients of SG2 — GMDP and hexapeptide. The high immunological and clinical efficacy of IFN- and immunotherapy was shown, which was expressed in the tendency to restore existing disorders, as well as in achieving control over the symptoms of YAR, with the possibility of reducing the volume of basic antiallergic pharmacotherapy.

Key words: allergic rhinitis, recurrent acute respiratory viral infection (ARVI), chronic herpes virus infections, interferon α 2b, glucosaminylmuramyl dipeptide, hexapeptide.

Введение

На сегодняшний день все более актуальной становится проблема лечения пациентов с респираторной аллергопатологией, ассоциированной с рецидивирующими инфекционными заболеваниями, такими как рОРВИ, частые обострения рХГВИ. Известно, что одним из наиболее часто встречаемых респираторных аллергических заболеваний является круглогодичный

аллергический ринит (КАР), для иммунопатогенеза которого характерно наличие персистирующего хронического воспаления на слизистых оболочках верхних дыхательных путей, различные нарушения в работе мукозального и системного иммунитета [7]. В ряде работ описаны нарушения, приводящие при КАР к дисбалансу Т1/Т2 иммунного ответа и, как следствие, к снижению индуцированной продукции интерферонов (IFN) 1 и 2 типов, дефи-

циту секреторного иммуноглобулина А (sIgA), снижению цитотоксического потенциала лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета (естественных киллерных клеток (ЕКК) и Т-цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ), нарушению функционирования системы нейтрофильных гранулоцитов [7, 10]. При этом описанные нарушения могут встречаться как в моно-, так и комбинированных вариантах [1, 7, 10]. Выявленные нарушения функционирования системы противоинфекционной иммунной защиты пациентов с АР являются предпосылками для коинфицирования, при этом, как показано, основными коинфицирующими агентами являются возбудители вирусных инфекций: семейство герпесвирусных инфекций (ВПГ1,2 типа, ВЧГ 6 типа, ВЭБ, ЦМВ) и возбудители ОРВИ [1, 15], а также ряд бактериальных патогенов [1, 3, 11, 13, 14]. Широко известен пантропизм герпесвирусов, который определяет их способность поражать в том числе и клетки иммунной системы, нарушая баланс иммунного ответа как на системном, так и локальном уровне, что способствует развитию и поддержанию гиперреактивности слизистых оболочек верхних отделов респираторного тракта, утяжелению симптомов КАР и расширению спектра сенсibilизации, с последующей манифестацией сопутствующих аллергических заболеваний [8, 12].

Вследствие длительного дисбаланса различных звеньев иммунной системы формируется толерантность к противоинфекционной и противовоспалительной терапии, что приводит к тяжелому и затяжному течению воспалительного процесса, частым рецидивам вирусных инфекций и учащению обострений аллергического заболевания, обуславливая необходимость не только в увеличении объема фармакотерапии, но и длительности лечения, а также создавая значительные трудности для проведения аллергенспецифической иммунотерапии (АСИТ) [3, 5].

Все эти факторы осложняют лечение иммунокомпрометированных пациентов с КАР и обуславливают необходимость в разработке персонализированных программ, с включением в терапию локальных и системных иммуномодулирующих препаратов, направленных на восстановление дисрегуляторных нарушений в иммунной системе и системе интерферонов [6, 9]. В настоящее время многочисленными исследованиями показана высокая эффективность препаратов рекомбинантного IFN α 2b (pIFN α 2b) в лечении респираторных и герпесвирусных инфекций. Установлено, что включение в схему терапии pIFN α 2b устраняет дефекты в системе интерферона и восстанавливает баланс Th1/Th2 лимфоцитов [2, 15]. Огромный интерес ученых вызывает препарат глюкозаминилмура-

милдипептид (ГМПД), который, воздействуя на макрофагально-моноцитарное звено, способствует восстановлению баланса Th1/Th2, повышает активность естественных киллерных лимфоцитов, восстанавливает количество нейтрофильных гранулоцитов. Кроме того, авторами показан элиминационный эффект ГМПД на условно-патогенную флору, нормализацию нормофлоры ротовой полости, что способствует восстановлению мукозального иммунитета. Рядом исследователей рассматриваются препараты пептидного тимического происхождения — гексапептиды (ГП) для лечения рецидивирующих бактериально-вирусных инфекций у пациентов с КАР [4].

Сложность реабилитации иммунной системы пациентов, страдающих КАР, ассоциированным с рОРВИ и рХГВИ, состоит в том, чтобы достичь не только снижения частоты рецидивирования вирусных инфекций, но снизить тяжесть течения аллергического воспаления верхних дыхательных путей, уменьшить потребность в фармакотерапии [8, 9, 11, 13, 15].

Цель исследования: на основании выявленных нарушений в иммунной системе и системе интерферонов у иммунокомпрометированных пациентов с КАР, ассоциированным с рОРВИ и рХГВИ, разработать дифференцированные программы таргетной интерфероно- и иммунотерапии с учетом различных иммунофенотипов и оценить их клинико-иммунологическую эффективность.

Материалы и методы

В группу исследования (ГИ) были включены 65 пациентов обоего пола в возрасте 23–60 лет, страдающие КАР, ассоциированным с рОРВИ и рХГВИ. Группу сравнения (ГС) составили 50 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами ГИ. Проведен анализ анамнестических данных и жалоб пациентов, выполнено физикальное обследование. Оценка тяжести симптомов КАР проводилась с использованием классической 10-бальной шкалы ВАШ и включала оценку выраженности таких симптомов как чихание, ринорея, заложенность носа, снижение обоняния, зуд в носу и т. д. Учет частоты эпизодов рОРВИ и обострений рХГВИ производился за год наблюдения. Всем пациентам ГИ выполнено аллергологическое обследование с применением иммуноферментного анализа (ИФА) и/или метода Immunosар (иммунофлюоресценция на твердой фазе) для оценки уровня специфических IgE к причинно-значимым ингаляционным аллергенам и уточнения спектра сенсibilизации. Для детекции герпесвирусов в различных биоматериалах (кровь, соскоб с миндалин, слюна и т. д.) использова-

ли молекулярно-генетический (ПЦР-РВ) и серологический (ИФА) методы исследования. Методом проточной цитометрии определяли основные параметры функционирования клеточных механизмов противовирусной иммунной защиты: Т-лимфоциты CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, естественные киллерные клетки (ЕКК) — CD3⁻CD16⁺CD56⁺, В-клетки — CD19⁺, а также системы интерферонов с оценкой индуцированной продукции IFN α , изучены показатели гемограмм пациентов.

Для пациентов, страдающих КАР, ассоциированным с частыми ОРВИ, было проведено обследование у оториноларинголога, с выполнением передней риноскопии, проведением микроскопического и бактериологического исследования материала из зева и носовых ходов, а также санация очагов хронической инфекции носоглотки по показаниям.

Исследование было проведено на базе клиничко-диагностического центра «Медси на Белорусской» (Москва). От всех пациентов получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Статистическая обработка проведена с использованием компьютерных программ StatPlus (версия 17.0 для Windows). Для анализа использованы методы непараметрической статистики, результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q₁; Q₃). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Все пациенты ГИ получали стандартную терапию антигистаминными препаратами второго поколения в сочетании с топическими ГКС-препаратами, антилейкотриеновыми пре-

паратами, однако данная терапия была недостаточно эффективна и не приводила к полному контролю над симптомами КАР.

Пациенты ГИ, страдающие КАР, ассоциированным с рХГВИ, дополнительно к основной терапии АР получали курсы супрессивной и противорецидивной терапии синтетическими противовирусными препаратами в соответствии с действующими клиническими рекомендациями. При этом на фоне проводимой терапии снижения частоты обострения рХГВИ отмечено не было.

В ходе исследования нами было проведено изучение ряда иммунологических и клинических критериев иммунокомпрометированности у пациентов исследуемой когорты.

При изучении состояния иммунной системы пациентов ГИ нами выявлены разнообразные комбинированные нарушения функционирования клеточных и гуморальных факторов противовирусной иммунной защиты у 41,7% пациентов, а также дефекты системы интерферонов в 100% случаев. Детальный анализ выявленных дисфункций позволил выделить и описать два патологических лабораторных иммунофенотипа (ПИФ), характерных для этих пациентов. Особенности первого патологического иммунофенотипа, характерного для 32 пациентов ГИ, являлись нарушения индуцированной продукции IFN α в 75% случаев, дефицит ЕКК, снижение количества нейтрофильных гранулоцитов периферической крови. Пациенты с первым патологическим ИФ составили группу исследования 1 (ГИ1). Установлено, что для второго патологического иммунофенотипа, детектированного у 33 пациентов ГИ, характерны нарушения индуцированной продукции IFN α в 72% случаев, дефицит ЕКК, дефицит CD3⁺CD8⁺ цитоток-

Таблица 1. Сравнительная характеристика иммунологических критериев иммунокомпрометированности пациентов ГИ1 и ГИ2 (Me [Q₁; Q₃])

Table 1. Comparative characterization of immunological criteria for immunocompromising patients SG1 and SG2 (Me [Q₁; Q₃])

Иммунологические критерии Immunological criteria	ГИ1 до лечения SG1 before therapy	ГИ2 до лечения SG2 before therapy	Группа сравнения Comparison group
Лейкоциты Leucocytes	5,15 [3,94; 5,41]	4,77 [4,58; 5,8]	5,7 [4,9; 6,35]
НГ NG (%)	44,0 [38,9; 52,9]	48,2 [45,7; 58,2]	53,2 [48,54; 59,4]**^
Лимфоциты (%) Lymphocytes (%)	41,2 [36,8; 46,4]	40,00 [35,0; 45,9]	34,2 [31,5; 37,8]
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	24,0 [21,1; 27,5]	16,5 [14,9; 20,7]*	26,9 [25,4; 29,8]^
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (%)	2,7 [2,0; 3,6]	4,0 [3,8; 4,6]*	15,7 [14,7; 16,8]**^
IFN α (пг/мл) IFN α (pg/ml)	80,0 [61,8; 100,0]	20,0 [20,0; 60,0]*	720,0 [640,0; 880,0]**^

Примечание. * — достоверность межгрупповых различий между ГИ1 и ГИ2 (при $p \leq 0,05$); ** — достоверность межгрупповых различий между ГИ1 и КГ (при $p \leq 0,05$); ^ — достоверность межгрупповых различий между ГИ2 и КГ (при $p \leq 0,05$).

Note. * — significance of differences between SG1 and SG2 (at $p \leq 0.05$); ** — significance of differences between SG1 and CG (at $p \leq 0.05$);

^ — significance of differences between SG2 and CG (at $p \leq 0.05$).

Таблица 2. Сравнительная характеристика клинических критериев иммунокомпromетированности пациентов ГИ1 и ГИ2 (Me [Q₁; Q₃])Table 2. Comparative characterization of clinical criteria for immunocompromising SG1 and SG2 patients (Me [Q₁; Q₃])

Клинические критерии Clinical criteria	ГИ1 до лечения SG1 before therapy	ГИ2 до лечения SG2 before therapy
Симптомы КАР (по ВАШ) Symptoms of YAR (by VAS)	5,5 [4,0; 6,5]	3,5 [2,62; 4,5]
Частота рХГВИ в год Rate of rHHVI per year	6,5 [5,0; 11,5]	6,5 [3,75; 10,5]
Частота рОРВИ в год Rate of rARVI per year	7,5 [4,75; 10,5]	6,5 [5,5; 10,5]

Примечание. * — достоверность межгрупповых различий между ГИ1 и ГИ2 (при $p \leq 0,05$).Note. * — significance of differences between SG1 and SG2 (at $p \leq 0.05$).

сических Т-лимфоцитов. Пациенты, имеющие второй патологический ИФ, составили группу исследования 2 (ГИ2) (табл. 1).

Таким образом, на основании уточнения особенностей функционирования основных клеточных эффекторов врожденного и адаптивного иммунитета, а также системы интерферонов, нами были выявлены и описаны два лабораторных патологических иммунофенотипа, в соответствии с которыми были сформированы две группы исследования ГИ1 и ГИ2.

При анализе клинических особенностей пациентов обеих групп были выявлены некоторые клинические критерии иммунокомпromетированности (критериальные признаки), являющиеся клиническими проявлениями имеющего иммунодефицита у этих пациентов (табл. 2). Выявлено, что у 35,5% пациентов ГИ1 имела место рХГВИ, вызываемая преимущественно ВПГ1 и/или ВПГ2, в то время как 28% пациентов страдали рХГВИ в сочетании с повторными ОРВИ, а еще 36,5% пациентов имели частые эпизоды рОРВИ, ассоциированные с активацией ВЭБ и ВЧГ 6 типа. Частота обострений рХГВИ, вызываемых ВПГ1 и/или ВПГ2, частота эпизодов рОРВИ составляла в среднем 6–7 раз в год. У 42,64% пациентов ГИ2 отмечались рОРВИ, ассоциированные с ВЭБ и ВЧГ6 типа, в 29,11% случаев — рХГВИ, у 28,25% пациентов выявлены рОРВИ в сочетании с рХГВИ. Частота эпизодов рХГВИ составила 6–7 раз в год, частота рОРВИ составила в среднем 7–8 раз в год (табл. 2).

Показано, что симптомы КАР среднетяжелой/тяжелой степени зафиксированы у большинства пациентов обеих групп. Установлено, что у пациентов ГИ1 в 78,25% случаев преобладал фенотип КАР средней степени тяжести по ВАШ, а в 21,75% КАР сочетался с сезонным аллергическим ринитом (САР). При изучении структуры сенсibilизации выявлены основные сенсibilизирующие агенты для пациентов этой группы: бытовые аллергены — в 34,6% случаев; грибковые аллергены — 27,4%, аллергены

пыльцы растений — 26,2%, эпидермальные аллергены — 11,8% (рис.)

Для пациентов ГИ2 был характерен аналогичный ГИ1 порядок распределения преобладающих фенотипов аллергического ринита, а именно у 73,26% пациентов отмечались только симптомы КАР, а в 26,74% случаев детектировано сочетание КАР и САР (табл. 2). Изучение профиля сенсibilизации выявило сенсibilизацию к бытовым аллергенам в 38,12% случаев, к аллергенам плесневых грибов — в 24,15%, к пыльцевым и эпидермальным аллергенам — в 18,87% (рис.).

В связи с отсутствием устойчивого позитивного эффекта от проводимой классической терапии и опираясь на выявленные особенности и дефекты функционирования основных звеньев противовирусной иммунной защиты, нами разработаны дифференцированные для каждого иммунофенотипа программы ком-

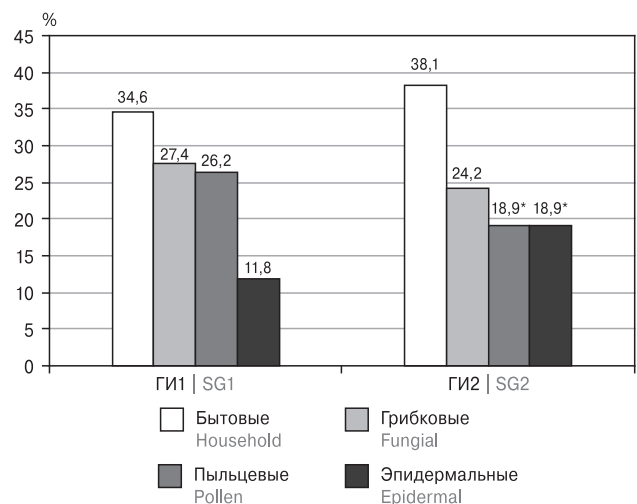
**Рисунок. Особенности профиля сенсibilизации пациентов ГИ1 и ГИ2**

Figure. Sensitization profile of patients SG1 and SG2

Примечание. * — достоверность межгрупповых различий (при $p \leq 0,05$).Note. * — differences between groups ($p \leq 0.05$).

плексного лечения иммунокомпрометированных пациентов, страдающих КАР, ассоциированным с рОРВИ и рХГВИ.

В рамках реализуемых программ пациентам обеих групп была продолжена начатая ранее фармакотерапия КАР, которая была дополнена персонализированными для каждого выявленного иммунофенотипа программами интерфероно- и иммунотерапии. Для пациентов обеих групп, имеющих выраженное снижение индуцированной продукции $IFN\alpha$, обе программы включали таргетную пролонгированную локальную и системную интерферонотерапию $rIFN\alpha 2b$ в комплексе с антиоксидантами, проводимую с целью коррекции интерферонового статуса.

Интерферонотерапия включала локальную (гель) и системную (суппозитории) терапию $rIFN\alpha 2b$ в комплексе с антиоксидантами в дозе 3 млн МЕ, ежедневно в течение 1 месяца, далее дозы препарата градуированно снижали каждые 3 недели вплоть до полной отмены. Курс интерферонотерапии составил 3,5 месяца. При обострении ВПГ 1 или ВПГ 2 назначался короткий курс синтетических противовирусных препаратов (валациклоvir) 1000 мг в сутки — 10 дней.

Пациентам ГИ1 для восстановления уровня НГ и коррекции количества и функциональной активности ЕКК в программу дополнительно был включен глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) — препарат Ликопид. ГМДП назначали в дозе 3 мг в сутки, сублингвально, в 3 приема в день равными дозами. Проведено три курса по 10 дней \times 1 раз в месяц в течение 3 месяцев.

Программа реабилитации иммунной системы пациентов ГИ2 помимо ГМДП включала применение гексапептида (аргинил- α -аспартил-

лизил-валил-тирозил-аргинин (ГП), синтетического аналога активного центра гормона тимопоэтина (препарат Имунофан) для восстановления цитотоксических Т-лимфоцитов. Пациенты ГИ2 получали курс лечения ГМПД в суточной дозе 3 мг, сублингвально, 3 приема в день равными дозами. Проведено три 10-ти дневных курса с частотой 1 раз в месяц в течение 3 месяцев. Курсы приема ГМПД чередовались с интраназальным применением гексапептида в дозе 45 мкг/доза, в режиме по 2 дозы 1 раз в сутки. Проведено три 10-дневных курса с частотой 1 раз в месяц на протяжении 3 месяцев.

После завершения курса комплексной интерфероно- и иммунотерапии нами была произведена оценка ее иммунологической и клинической эффективности с использованием выделенных ранее критериальных клинических признаков иммунокомпрометированности (частота рОРВИ и рХГВИ) и оценкой выраженности симптомов КАР по шкале ВАШ.

Данные по сравнительной оценке динамики иммунологических показателей до и после проводимой терапии для ГИ1 и ГИ2 представлены в табл. 3.

Показана позитивная динамика восстановления изучаемых параметров гемограмм пациентов обеих групп, а именно количественные характеристики нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов периферической крови пациентов ГИ1 и ГИ2 достигли аналогичных показателей ГС. В ГИ1 отмечено достоверное увеличение количества ЕКК $CD3^+CD16^+CD56^+$ в 2,7 раз, которое достигает уровня условно здоровых лиц. Наблюдается позитивный эффект в репарации индуцированной продукции $IFN\alpha$ (табл. 3)

Таблица 3. Сравнительная оценка иммунологической эффективности персонализированных программ таргетной интерфероно- и иммунотерапии пациентов ГИ1 и ГИ2 (Me [Q₁; Q₃])

Table 3. Comparative evaluation of immunological efficacy of targeted interferon and immunotherapy programs for patients with SG1 and SG2 (Me [Q₁; Q₃])

Иммунологические маркеры Immunological criteria	ГИ1/SG1		ГИ2/SG2	
	до лечения before therapy	после лечения after therapy	до лечения before therapy	после лечения after therapy
Лейкоциты Leucocytes	5,15 [3,94; 5,41]	6,22 [5,5; 7,5]^	4,77 [4,6; 5,4]	5,7 [5,6; 6,4]^
НГ NG (%)	44,0 [38,9; 52,9]	55,2 [49,2; 90,2]^	48,2 [45,7; 58,2]	56,0 [50,7; 59,7]^
Лимфоциты (%) Lymphocytes (%)	41,2 [36,8; 46,4]	33,5 [29,9; 37,5]^	40,00 [35,0; 45,9]	33,6 [30,1; 38,5]
$CD3^+CD8^+$ (%)	24,0 [21,1; 27,5]	25,5 [17,3; 30,9]	16,5 [14,9; 20,7]*	31,4 [31,3; 37,6]^
$CD3^+CD16^+CD56^+$ (%)	2,7 [2,0; 3,6]	14,1 [10,5; 14,1]^	4,0 [3,8; 4,6]*	8,0 [6,1; 9,9]^
$IFN\alpha$ (пг/мл) $IFN\alpha$ (pg/ml)	80,0 [61,8; 100,0]	160,0 [130,0; 320,0]^	20,0 [20,0; 60,0]	198,0 [160,0; 298,0]^

Примечание. ^ — достоверность различий между критериальными клиническими признаками до и после применения программ таргетной интерфероно- и иммунотерапии (при $p < 0,05$); * — достоверность различий между ГИ1 и ГИ2 (при $p < 0,05$).

Note. ^ — differences between criterion clinical signs before and after the use of targeted interferon and immunotherapy programs (with $p < 0.05$);

* — differences between SG1 and SG2 (at $p < 0.05$).

У пациентов ГИ2 после проведения программы интерфероно- и иммунотропной терапии отмечено достоверное увеличение количества цитотоксических Т-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ (в 2 раза), зафиксирована тенденция к восстановлению индуцированной продукции IFN α (табл. 3).

При сравнительной оценке динамики клинических критериев иммунокомпрометированности пациентов ГИ1 и ГИ2 были выявлены достоверные различия между изучаемыми параметрами до и после проведения дифференцированных программ таргетной интерфероно- и иммунотерапии (табл. 4)

Установлено, что у пациентов ГИ1 выраженность симптомов КАР после проведенной комплексной фармако- и иммунотерапии снизилась в 2,2 раза (оценка по ВАШ), а частота обострений рХГВИ уменьшилась в 2,6 раз. Кроме того зафиксировано достоверное снижение частоты обострений рОРВИ в 3 раза по сравнению с аналогичным показателем до начала терапии (табл. 4).

Аналогичная динамика клинических критериальных признаков была установлена и для пациентов ГИ2. Так, выраженность симптомов КАР снизилась в 2,3 раза (по шкале ВАШ), число эпизодов рОРВИ уменьшилось в 2,6 раз, частота обострений рХГВИ снизилась в 3,25 раза (табл. 4).

Обсуждение

Нами были получены данные о наличии различных дефектов врожденного и адаптивного звеньев иммунитета у пациентов страдающих КАР, ассоциированным с рОРВИ и рХГВИ. Показано, что имеющиеся дисрегуляторные изменения в системе противовирусной иммунной защиты и системы IFN на локальном и системном уровне создают благоприятные условия для рецидивирования респираторных и герпес-

вирусных инфекций, которые, в свою очередь, утяжеляют течение КАР, снижают контроль над симптомами на фоне классической противоаллергической терапии.

Установленные нами варианты нарушений механизмов врожденного и адаптивного иммунитета у пациентов ГИ были определены как патологические иммунофенотипы.

Первый вариант нарушений ИС при КАР (первый патологический иммунофенотип), отягощенном рОРВИ и рХГВИ, характеризуется дефицитом индуцированной продукции IFN α 2–3-й степени, снижением количества лимфоцитов врожденного иммунитета — ЕКК CD3⁻CD16⁺CD56⁺, снижением количества нейтрофильных гранулоцитов периферической крови.

Во втором варианте (второй патологический иммунофенотип) наряду с дефицитом продукции IFN α 2–3-й степени, наблюдается снижение количества клеток врожденного иммунитета (ЕКК CD3⁻CD16⁺CD56⁺) в сочетании со снижением количества лимфоцитов адаптивного иммунитета (CD3⁺CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов), а также снижение количества нейтрофильных гранулоцитов периферической крови.

Изученные клинические критерии иммунокомпрометированности позволили оценить степень и глубину имеющего иммунодефицита у этой когорты пациентов.

В связи с высокой частотой рецидивирования респираторных и герпесвирусных инфекций и практически полным отсутствием межрецидивного периода, инициация и проведение АСИТ у этой когорты пациентов представляла значительные трудности.

Разработанные нами комплексные программы интерфероно- и иммунотерапии включали пролонгированную локальную (гель) и системную (суппозитории) терапию рекомбинантным IFN α 2b в комплексе с антиоксидантами

Таблица 4. Сравнительная оценка клинической эффективности персонализированных программ таргетной интерфероно- и иммунотерапии пациентов ГИ1 и ГИ2 (Me [Q₁; Q₃])

Table 4. Comparative evaluation of the clinical efficacy of targeted interferon and immunotherapy programs for patients with SG1 and SG2 (Me [Q₁; Q₃])

Клинические критерии Clinical criteria	ГИ1/SG1		ГИ2/SG2	
	до лечения before therapy	после лечения after therapy	до лечения before therapy	после лечения after therapy
Симптомы КАР по шкале ВАШ (баллы) Symptoms of YAR by VAS (score)	5,5 [4,0; 6,5]	2,5 [1,5; 2,5]*	3,5 [2,62; 4,5]	1,5 [1,5; 2,5]*
Частота рХГВИ (в год) Rate of rARVI (per year)	6,5 [5,0; 11,5]	2,5 [1,5; 5,0]*	6,5 [5,5; 10,5]	2,5 [1,5; 4,25]*
Частота рОРВИ (в год) Rate of rCHHVI (per year)	7,5 [4,8; 10,5]	2,5 [1,5; 3,5]*	6,5 [5,5; 10,5]	2,0 [1,5; 2,5]*

Примечание. * — достоверность различий между критериальными клиническими признаками до и после применения программ таргетной интерфероно- и иммунотерапии (p < 0,05).

Note. * — differences between the criteria clinical signs before and after the use of targeted interferon and immunotherapy programs (p < 0.05).

(Виферон), применяемую с целью коррекции выявленных нарушений в системе интерферонов у пациентов обеих групп. С учетом выявленных нарушений в количественной и функциональной активности клеток ИС для их коррекции в состав терапии пациентов ГИ1 был включен ГМДП (Ликопад), а для пациентов ГИ2 — ГМДП и гексапептид (Имунофан).

Обе программы продемонстрировали позитивные клинические и лабораторные эффекты. Так, в обеих группах отмечена позитивная лабораторная динамика, восстановление нормального количества лейкоцитов, клеток врожденного иммунитета $EКК CD3^+CD16^+CD56^+$. В ГИ1 восстановлено количество нейтрофильных гранулоцитов, в ГИ2 отмечено восстановление количества $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов.

Позитивный клинический эффект отмечен в обеих ГИ, что проявлялось снижением выраженности симптомов КАР более, чем в 2 раза по шкале ВАШ уменьшением числа эпизодов рОРВИ/в год и обострений рХГВИ/в год в 3 раза. Таким образом, с учетом полученных нами данных установлено, что на фоне проведения комплексной интерфероно- и иммунотерапии направленной на восстановление противовирусной иммунной защиты, снижения вирусной нагрузки на слизистые верхних отделов респираторного тракта достоверно пока-

зано снижение выраженности симптомов КАР, о чем свидетельствовало снижение баллов при оценке по шкале ВАШ, снижение частоты обострений КАР.

Выводы

На основании полученных нами результатов лабораторного исследования можно сделать выводы об эффективности разработанных нами программ интерфероно- и иммунотерапии с учетом различных дефектов иммунной системы — патологических иммунофенотипов — у пациентов, страдающих КАР, ассоциированных с рОРВИ и рХГВИ в обеих ГИ.

Показана высокая клиническая эффективность проводимой интерфероно- и иммунотерапии, что выражалась в достижении контроля над симптомами КАР, с возможностью снижения объема базисной противоаллергической фармакотерапии.

Установлено достоверное снижение частоты эпизодов рОРВИ и обострений рХГВИ в обеих ГИ.

С учетом полученных позитивных лабораторных и клинических эффектов можно сделать выводы об актуальности разработки персонализированных программ реабилитации ИС для иммунокомпроментированных пациентов страдающих КАР и сопутствующими рОРВИ и рХГВИ.

Список литературы/References

1. Маркова Т.П., Чувилов Д.Г., Ярилина Л.Г., Чувилова А.Г., Шадыхева М.Б., Аршинова С.С. Аллергический ринит и коморбидность с инфекциями // Эффективная фармакотерапия. 2023. Т. 19, № 32. С. 8–14. [Markova T.P., Chuvirov D.G., Yarilina L.G., Chuvirova A.G., Shadyzheva M.B., Arshinova S.S. Allergic rhinitis and comorbidity with infections. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2023, vol. 19, no. 32, pp. 8–14. (In Russ.) doi: 10.33978/2307-3586-2023-19-32-8-14]
2. Нестерова И.В. Препараты интерферона альфа в клинической практике // Российский аллергологический журнал. 2010. Т. 7, № 2. С. 43–52. [Nesterova I.V. Interferon-a in clinical practice. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2010, vol. 7, no. 2, pp. 43–52. (In Russ.) doi: 10.36691/RJA892]
3. Нестерова И.В., Халтурина Е.О. Моно- и микст-герпесвирусные инфекции: ассоциированность с клиническими синдромами иммунодефицита // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2018. Т. 22, № 2. С. 226–234. [Nesterova I.V., Khalturina E.O. Mono- and mixed-herpesvirus infections: association with clinical syndromes of immunodeficiency. *Vestnik Rossiiskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Meditsina = RUDN Journal of Medicine*, 2018, vol. 22, no. 2, pp. 226–234. (In Russ.) doi: 10.22363/2313-0245-2018-22-2-226-234]
4. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Чапурина В.Н., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Тараканов В.А., Тетерин Ю.В., Пирогова А.И. Дифференцированность иммуномодулирующих эффектов аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина и глюкозаминилмурамилдипептида на эффекторные функции и фенотип функционально значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов в экспериментальной модели вирусно-бактериальной коинфекции // Иммунология. 2022. Т. 43, № 1. С. 89–102. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Chapurina V.N., Kovaleva S.V., Lomtaticheva L.V., Tarakanov V.A., Teterin Yu.V., Pirogova A.I. Differentiation of immunomodulatory effects of arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine and glucosaminylmuramyl dipeptide on effector functions and phenotype of functionally significant subpopulations of neutrophilic granulocytes in an experimental model of viral-bacterial coinfection. *Immunologiya = Immunology*, 2022, vol. 43, no. 1, pp. 89–102. (In Russ.) doi: 10.33029/0206-4952-2022-43-1-89-102]
5. Понежева Ж.Б., Купченко А.Н., Маннанова И.В., Горелов А.В. Интерфероны и противовирусный ответ // Эффективная фармакотерапия. Педиатрия. 2018. № 1 (14). С. 14–20. [Ponezheva Zh.B., Kupchenko A.N., Mannanova I.V., Gorelov A.V. Interferons and antiviral immunity. *Effektivnaya farmakoterapiya. Peditriya = Effective Pharmacotherapy. Pediatrics*, 2018, no. 1 (14), pp. 14–20. (In Russ.)]
6. Свистушкин В.М., Никифорова Г.Н., Левина Л.А., Золотова А.В., Шевчик Е.А. Реальные возможности оптимизации лечения больных аллергическим ринитом // Медицинский Совет. 2022. № 8. С. 98–104. [Svistushkin V.M., Nikiforova G.N., Levina L.A., Zolotova A.V., Shevchik E.A. Real possibilities of treatment of patients with allergic rhinitis. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2022, no. 8, pp. 98–104. (In Russ.) doi: 10.21518/2079-701X-2022-16-8-98-104]

7. Татауршикова Н.С. Особенности аллергического воспаления в оценке фенотипов аллергического ринита // Фарматека. 2018. № 51. С. 12–15. [Tataurshchikova N.S. Features of allergic inflammation in assessment of phenotypes of allergic rhinitis. *Farmateka = Pharmateca*, 2018, no. 51, pp. 12–15. (In Russ.)] doi: 10.18565/pharmateca.2018.s1.12-15
8. Татауршикова Н.С., Летяева О.И., Максимова А.В., Левкова Е.А. Герпетическая инфекция и аллергия как глобальная проблема современной медицины // Эффективная фармакотерапия. 2023. Т. 19, № 28. С. 24–29. [Tataurshchikova N.S., Letyaeva O.I., Maksimova A.V., Levkova E.A. Herpes infection and allergy as a global problem of modern medicine. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2023, vol. 19, no. 28, pp. 24–29. (In Russ.)] doi: 10.33978/2307-3586-2023-19-28-24-29
9. Татауршикова Н.С., Сангидорж Б., Русанова А.С. Локальная иммунотерапия в комплексном лечении пациентов с аллергическим ринитом // Эффективная фармакотерапия. 2022. Т. 18, № 12. С. 28–31. [Tataurshchikova N.S., Sangidorzh B., Rusanova A.S. Local immunotherapy in the complex treatment of patients with allergic rhinitis. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, vol. 18, no. 12, pp. 28–31. (In Russ.)] doi: 10.17116/otorino201782660-62
10. Царев С.В. Инфекция и аллергия: взаимосвязь и взаимовлияние // Русский медицинский журнал. 2016. № 12. С. 800–803. [Tsarev S.V. Infection and allergy: interrelationship and mutual influence. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2016, no. 12, pp. 800–803. (In Russ.)]
11. Baskakova D.V., Haldin A.A., Birko N.I. Clinical and epidemiological characteristics of diseases caused by herpes simplex herpes. *Russian Journal of Skin and Sexually Transmitted Diseases. Herpes App.*, 2006, no. 2, pp. 26–30.
12. Fokkens W.J., Lund V., Luong A.U., Orlandi R.R. A Comparison of International Guidelines for Rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2022, vol. 10, no. 6, pp. 1418–1422. doi: 10.1016/j.jaip.2022.01.013
13. Global Atlas of Allergic Rhinitis and Chronic Rhinosinusitis. Eds.: Akdis C.A., P.W. Hellings I. Agache. Zurich, Switzerland: European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2015. 422 p.
14. Goreiko T.V., Kalinina N.M., Drygina L.V. The modern conceptions about immunopathogenesis of infection caused by the Epstein–Barr virus. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, vol. 1, no. 2, pp. 121–130. doi: 10.15789/2220-7619-2011-2-121-130
15. Khalturina E.O., Nesterova I.V., Markova T.P. An optimized program of targeted combined interferon and immunotherapy in the treatment of atypical chronic active herpes virus co-infections. *Effective Pharmacotherapy*, 2022, vol. 18, no. 1, pp. 44–49.

Авторы:

Халтурина Е.О., д.м.н., доцент, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия; врач аллерголог-иммунолог КДЦ «Медси на Белорусской», Москва, Россия;

Гарскова Н.В., аспирант 3 года кафедры иммунопатологии и иммунодиагностики Академии постдипломного образования ФГБУ Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва, Россия; врач аллерголог-иммунолог КДЦ «Медси на Белорусской», Москва, Россия;

Шеметова А.Д., студентка 2 курса Института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия.

Authors:

Khalturina E.O., DSc (Medicine), Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology named after A.A. Vorobiev, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation; Allergist-Immunologist in Clinical Diagnostic Center “Medsi on Belorusskaya”, Moscow, Russian Federation;

Garskova N.V., 3rd year PhD Student, Department of Immunopathology and Immunodiagnosis, Academy of Postgraduate Education, Federal Research and Clinical Centre FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; Allergist-Immunologist in Clinical Diagnostic Center “Medsi on Belorusskaya”, Moscow, Russian Federation;

Shemetova A.D., 2nd year Student of Erismann Institute of Public Health, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.03.2024
Принята к печати 04.04.2024

Received 31.03.2024
Accepted 04.04.2024

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

Основные виды статей, публикуемых в журнале

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисованные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
 - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
 - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
 - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
 - полное название статьи, направляемой в редакцию;
 - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
 - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
 - дата отправления работы.
 - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»).

- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
 - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
 - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
- 6) Файл в формате .doc, .docx, .tif со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
- 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
- 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы www.e-library.ru . DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://iimmun.ru>) в рубрике «Рецензирование» раздела «О журнале».

Вы можете оформить подписку на журнал
«Инфекция и иммунитет» через отделения связи:
ООО «Урал-Пресс-Округ» и электронный каталог «Российская периодика»
в сети Internet на сайте www.agpk.org.
Подписной индекс 41392.
Подписка на электронную версию журнала
на сайте www.e-library.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абрамова Н.Д.	423	Калюжная Н.О.	423, 581	Поезжаев Е.А.	488
Абрамовских К.А.	544	Капустин И.В.	451	Порядин Г.В.	505
Акуленко М.В.	495	Карцев Н.Н.	557	Радаева О.А.	437
Аммур Ю.И.	581	Кашенко В.А.	429	Рак А.Я.	593, 601
Апт А.С.	525	Ким А.Э.	505	Рамазанова З.К.	451
Арсентьева Н.А.	429, 609	Ковалева С.В.	615	Рассказова Н.Д.	423
Астахова Е.А.	465	Колядко М.Г.	443	Рашупкин И.М.	575
Атажахова М.Г.	488	Коробова З.Р.	429	Рогожина Л.С.	505
Бажина А.В.	593	Королев И.Б.	459	Романова А.Ф.	471
Байкузина П.Г.	525	Королевская Л.Б.	586	Руденко Л.Г.	593, 601
Барова Н.К.	615	Коротаева А.А.	411	Русских И.И.	443
Басина В.В.	609	Коротецкая М.В.	525	Савочкина А.Ю.	544
Бацунов О.К.	609	Костинов М.П.	459	Сайдакова Е.В.	586
Бердюгина О.В.	476	Косякова Н.И.	495	Салмаси Ж.М.	505
Бец В.Д.	519	Котелева С.И.	451	Сальникова М.А.	539
Бляхер М.С.	451	Котова М.А.	575	Саматова А.И.	544
Бондарь Л.И.	459	Котомина Т.С.	593	Самойлова Е.В.	411
Бочкарева С.С.	451	Кравцова Е.О.	500	Сандалова С.В.	451
Булгакова И.Д.	500	Красноглазова К.А.	437	Свитич О.А.	416, 581
Бязрова М.Г.	471	Кузнецова М.В.	511	Симбирцев А.С.	437
Ванслав М.И.	443	Куляпкин В.В.	437	Сошенко Т.Д.	423
Величко А.В.	443	Курлянская Е.К.	443	Старич Эрьявец М.	511
Власова В.В.	586	Кучиев Д.Т.	411	Сухова М.М.	471
Волкова Н.В.	569	Лебедев Ю.Б.	539	Сычев И.А.	593
Волосникова Е.А.	569	Ли Ю.А.	459	Тетерин Ю.В.	615
Вон П.-Ф.	593	Литвинова Е.А.	519	Тотолян А.А.	429, 609
Гаврилова Н.Ф.	551	Ломтатидзе Л.В.	488, 615	Тульская Е.А.	451
Гарскова Н.В.	623	Любимова Н.Е.	429, 609	Усатова Г.Н.	500
Гончарова Е.П.	519	Лягуша Д.Э.	615	Федорова И.М.	451
Горбачева Д.В.	525	Макушева Ю.С.	519	Федорова К.С.	544
Губернаторова Е.О.	564	Маркелова Е.В.	459	Филатов А.В.	471
Гулимов М.К.	581	Масленникова И.Л.	511	Фирстова В.В.	557
Давлетшина В.В.	429	Меледина И.В.	575	Халтурина Е.О.	623
Даниленко Е.Д.	569	Мелконян К.И.	615	Хлынцева А.Е.	557
Денисевич Т.Л.	443	Меремьянина Е.А.	423	Чапурин В.Н.	615
Дмитраченко М.Н.	459	Минасова А.А.	544	Чепурнова Д.А.	411
Евстифеев В.В.	532	Михайлов А.А.	471	Черных Е.И.	429
Еремеев В.В.	437, 532	Михайлова Н.А.	551	Чудилова Г.А.	488
Ершов Ф.И.	416	Москалец О.В.	483	Шатова О.Г.	443
Есина Т.И.	569	Музуров А.Л.	557	Шатохин М.Н.	423
Жебелева М.С.	429	Негоднова Е.В.	437	Шейнова А.Д.	564
Желтова О.И.	575	Некрасова И.В.	511	Шеметова А.Д.	623
Жеребцов А.П.	551	Нижегородова Д.Б.	443	Шепелькова Г.С.	532
Задворных Е.А.	500	Никушкина К.В.	544	Шимица Г.Г.	569
Зайковская А.В.	569	Новикова Л.И.	451	Шкуратова М.А.	557
Зайцева Т.А.	423	Новицкая С.Ф.	443	Шмагель К.В.	586
Зафранская М.М.	443	Нохрин Д.Ю.	544	Шмагель Н.Г.	586
Зверев В.В.	500, 581	Одинцов Е.Е.	451	Шойхет Д.А.	500
Зотова М.А.	544	Оспельникова Т.П.	416	Шумкина А.А.	500
Исакова-Сивак И.Н.	593, 601	Палеев Ф.Н.	411	Щербаков Д.Н.	569
Искандярова М.С.	437	Панина М.И.	505	Эсауленко Е.В.	609
Казимирский А.Н.	505	Погосова Н.В.	411	Юсубалиева Г.М.	471
Калмантаева О.В.	557	Подосокорская О.А.	564	Яковлева И.В.	551

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

avidность антител	465	биоопенки	511
адаптивный иммунитет	539	биоценоз влагалища	544
адьювант	569	бронхообструктивный синдром	495
активная иммунизация	459	вакцинация	443, 459, 465, 539
активные формы кислорода	511	вирус гриппа	593, 601
алгоритм оценки	451	вирус краснухи	581
аллергический ринит	623	ВИЧ/ВГС коинфекция	586
анимикробные пептиды	564	В-клетки памяти	465, 471
антибиотики	519	воспаление	532
антинейраминидазные антитела	593	воспаление кишечника	564
антиретровирусная терапия	586	восприимчивость	525
антитела	557	ВПГ-1	500
антителосекретирующие клетки	471	врожденный иммунитет	459
артралгия	476	гаплотип	525
асептическое воспаление	505	гексапептид	615, 623
бактериальный вагиноз	544	гемолитико-уремический синдром	557
бактериостатическая активность	532	герпесвирусная инфекция	488, 575
белок S	569	гибридный иммунитет	443
белок нуклеокапсида	601	гибридом-продукенты	551
бета-глюканы	569	гиперэкспрессия	532

главный комплекс гистосовместимости	525	противовирусный ответ	581
глюкозаминилмурамилдипептид	623	протозойная инфекция	519
грипп	416	ПЦР	557
гуморальный иммунный ответ	443	растворимый рецептор IL-6	411
дети	615	рекуррентные ОРВИ	623
дефензин α	511	рекомбинантный белок FliC	551
дисбиоз влагалища	544	репертуар	539
дифференциальный анализ экспрессии генов	581	репродуктивное здоровье	544
длинные некодирующие РНК	581	рестрикция	539
желтая лихорадка	539	реципиенты сердечного трансплантата	443
живая гриппозная вакцина	601	РНК-секвенирование	581
иммунизация	569	сердечная недостаточность	483
иммунитет	519	синдром хронической усталости	488
иммунный ответ	569, 593	специфические антитела	443
иммуноактивные препараты	416	специфичность	539
иммуноблоттинг	557	Спутник V	465
иммунокомпрометированность	615	сроки возникновения	476
иммунологический неответ	586	Т-клетки памяти	451
иммуномодулирующая терапия	615	Т-клеточный рецептор	539
иммунопатогенез	609	Т-клеточный эпитоп	601
иммунотерапия	575	Т-лимфоциты	586
иммуноферментный анализ	557	туберкулез	525, 532
интерлекин-2	586	тяжесть течения COVID-19	476
интерферон	416	универсальная гриппозная вакцина	593
интерферон $\alpha 2b$	623	утомляемость	476
интерфероны	488	ферменты энергетического обмена клеток	495
инфекционное воспаление	505	ферритин	429
истощение	586	фибриноген	429
кишечник	519	фиброз печени	609
кластер	539	флагелин	551
клеточная смерть	586	хемокины	609
клеточный иммунный ответ	443	хронические герпесвирусные инфекции	623
клон	539	хронический вирусный гепатит В	609
когнитивные расстройства	488	циркадианные ритмы	437
конъюгация	511	цирроз печени	609
лабораторный штамм С-77	581	цитокиновый профиль	459
лимфопения	429	цитокиновый шторм	423
лимфоциты	601	цитокины	483, 488, 500, 615
линейные В-клеточные эпитопы	593	чек-пойнт молекулы	575
макрофаги	532	чувствительность	525
маркеры воспаления	505	шига-токсин	557
микобактерия	525	экспрессия	423
микробиота	564	экспрессия генов	500
микроглия	500	эссенциальная гипертензия	437
микроРНК	532	<i>Akkermansia muciniphila</i>	564
миокардит	483	С-реактивный белок	429
миокардитический кардиосклероз	483	COVID-19	411, 416, 423, 429, 437, 443, 459, 465, 483
МКА	551	CX3CL1/Fractalkine	609
моноклональные антитела	551	DSS колит	564
моноциты	575	D-димер	429
морфология лактобактерий	544	<i>Escherichia coli</i>	557
мукозальный иммунитет	423	IFN γ	451
муцин 2	519	IL-1 α	437
мышцы	569	IL-1 β	500
наивные В-клетки	471	IL-6	411, 500
нейродегенерация	500	IL-10	500
нейтрофилы	511	IL-18	411, 423
нейтрофильные сети	505	IL-18-связывающий белок	411
нейтрофильные экстраклеточные ловушки	505	IL-33	423
новые заболевания	476	IL-37	437
нуклеопротеин	601	<i>Lactobacillus</i> spp.	544
НЭЛ	505	<i>P. aeruginosa</i>	551
обострение хронических заболеваний	476	PD-1	575, 586
одиночные нити	505	RBD-специфические антитела	465
острая вирусная инфекция	539	SARS-CoV-2	429, 451, 459, 471
острые респираторные вирусные инфекции	416	SARS-CoV-2-ассоциированная пневмония	437
острый перитонит	615	sgp130	411
плазмобласты	471	TGF- β	500
плазматические клетки	471	Tim-3	575
постковидный синдром	476, 483, 488, 495	TNF α	500
пробиотик	564	<i>Trichomonas</i> spp.	519
провоспалительные цитокины	423	UPEC	511
пролиферация	586		
противовирусная защита	416		

Иллюстрация к статье «Эффект введения пробиотической бактерии *Akkermansia muciniphila* в норме и при DSS-индуцированном воспалении у мышей» (авторы: А.Д. Шейнова, О.А. Подосокорская, Е.О. Губернаторова) (с. 564–568)

Illustration for the article “The effect of the probiotic bacteria *Akkermansia muciniphila* in intestinal homeostasis and DSS-induced inflammation in mice” (authors: Sheynova A.D., Podosokorskaya O.A., Gubernatorova E.O.) (pp. 564–568)

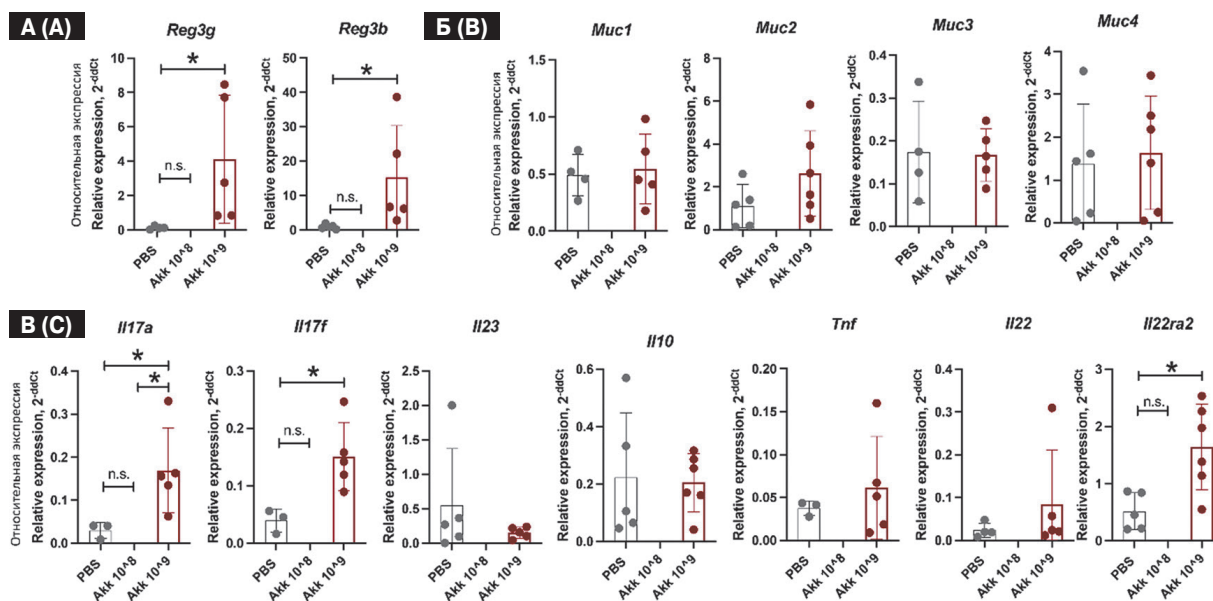


Рисунок 2. У мышей, принимавших *A. muciniphila* в высокой дозе, повышается экспрессия генов, поддерживающих барьерную функцию кишечника

Figure 2. Mice given a high dose of *A. muciniphila* increase the expression of genes that support intestinal barrier function

Примечание. Уровень экспрессии А) *Reg3b*, *Reg3g*, Б) *Muc1*, *Muc2*, *Muc3*, *Muc4*, В) *Il17a*, *Il17f*, *Il23*, *Il10*, *Tnf*, *Il22*, *Il22ra2* относительно *Actb* у мышей в группах, принимавших PBS, низкую (10^8 CFU) и высокую (10^9 CFU) дозы *A. muciniphila*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, n.s. (non-significant) — недостоверная разница. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Note. Expression level of А) *Reg3b*, *Reg3g*, Б) *Muc1*, *Muc2*, *Muc3*, *Muc4*, С) *Il17a*, *Il17f*, *Il23*, *Il10*, *Tnf*, *Il22*, *Il22ra2* relative to *Actb* in mice in groups treated with PBS, low (10^8 CFU) and high (10^9 CFU) dose of *A. muciniphila*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. (non-significant) — unreliable difference. Data are presented as mean and standard deviation.

Иллюстрация к статье «Длинные некодирующие РНК — регуляторы краснушной вирусной инфекции и противовирусного ответа» (авторы: М.К. Гулимов, Н.О. Калюжная, Ю.И. Амму, В.В. Зверев, О.А. Свитич) (с. 581–585)

Illustration for the article “Long non-coding RNAs — regulators of rubella virus infection and antiviral response” (authors: Gulimov M.K., Kalyuzhnaya N.O., Ammour Yu.I., Zverev V.V., Svitch O.A.) (pp. 581–585)

Идентификатор Gene ID	Символ Symbol	Наименование / Name	LogCPM (mean)	LogCPM rank (%)	LogFC	LogCPM	FDR (QLF test)	FDR (Mann-Wh.)	Контроль Control	Вирус краснухи Rubella virus
ENSG00000234741	GAS5	growth arrest specific 5	8,34	96,9	1,18	8,5	7,54E-07	0,0002	221,94	503,64
ENSG00000175061	SNHG29	small nucleolar RNA host gene 29	8,84	98,1	0,84	9,0	5,05E-06	0,0006	367,41	658,21
ENSG00000245532	NEAT1	nuclear paraspeckle assembly transcript 1	9,70	99,2	0,70	9,8	6,98E-06	0,0007	689,99	1118,43
ENSG00000248323	LUCAT1	lung cancer associated transcript 1	5,88	75,3	1,39	5,8	1,12E-05	0,0010	30,59	80,69
ENSG00000247095	MIR210HG	MIR210 host gene	4,56	51,6	1,83	4,5	1,12E-05	0,0010	9,72	35,63
ENSG00000233016	SNHG7	small nucleolar RNA host gene 7	6,48	84,1	1,08	6,6	1,85E-05	0,001	63,16	134,39
ENSG00000214548	MEG3	maternally expressed 3	5,66	71,3	1,16	5,8	3,46E-05	0,002	34,99	78,95
ENSG00000204387	SNHG32	small nucleolar RNA host gene 32	5,49	68,4	1,26	5,5	3,58E-05	0,002	25,98	62,62
ENSG00000224032	EPB41L4A-AS1	EPB41L4A antisense RNA 1	5,73	72,7	1,13	5,8	4,67E-05	0,002	34,02	74,74
ENSG00000197989	SNHG12	small nucleolar RNA host gene 12	4,75	54,6	1,57	4,3	5,03E-05	0,003	9,73	29,60
ENSG00000255717	SNHG1	small nucleolar RNA host gene 1	6,41	83,5	0,92	6,3	7,14E-05	0,003	55,76	106,00
ENSG00000177410	ZFAS1	ZNF1 antisense RNA 1	5,44	67,6	1,10	5,3	9,95E-05	0,004	25,34	54,67
ENSG00000268621	IGFL2-AS1	IGFL2 antisense RNA 1	7,32	92,3	-0,69	7,2	0,0001	0,004	185,37	114,79
ENSG00000226950	DANCR	differentiation antagonizing non-protein coding RNA	3,93	41,4	-1,34	3,9	0,0003	0,004	20,58	7,92

Рисунок 2. Экспрессия наиболее значимых днРНК (lncRNA) в клетках, инфицированных вирусом краснухи (FDR < 0,005)

Figure 2. Expression of the most significant dnRNAs (lncRNAs) in rubella virus-infected cells (FDR < 0.005)

Примечание. Гены с наиболее повышенной и пониженной экспрессией в клетках A549, зараженных вирусом краснухи, по сравнению с незараженными. CPM (Counts per million) — единица измерения экспрессии генов, нормирующаяся на глубину секвенирования. CPM rank (%) — позиция гена (0...100) в списке всех генов, отсортированных по уровню экспрессии (количество прочтений на миллион). LogFC — двоичный логарифм кратности изменения уровня экспрессии. FDR (false discovery rate) — коэффициент ложного обнаружения. QLF — квазивероятностный F-тест. Mann-Wh. — непараметрический U-тест Манна-Уитни. Control — значения экспрессии гена для незараженной культуры клеток A549. Rubella — значения экспрессии гена для зараженной вирусом краснухи культуры клеток A549.

Note. The most upregulated and downregulated genes in rubella virus-infected A549 cells compared to uninfected cells. CPM (Counts per million) — gene expression unit that normalizes only for sequencing depth (depth-normalized counts). position of a gene (0...100) in a list of all genes sorted by expression level (read counts per million). LogFC — binary logarithm of expression level fold change. QLF — quasi-likelihood F-test. Mann-Wh. — non-parametric Mann-Whitney U-test. Control — expression level fold change for uninfected A549 cells. Rubella — expression level fold change for rubella virus-infected A549 cells.

Подписной индекс:
Урал-Пресс – 41392

