

Российская академия наук  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»  
Федерального медико-биологического агентства



*И.И. Мечников*

Том 41  
2020

4

Volume 41, Number 4, 2020

# ИММУНОЛОГИЯ

Научно-практический рецензируемый журнал

Основан в 1980 г.

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий,  
рекомендованных Министерством науки и высшего образования Российской Федерации  
для публикации результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук  
Журнал индексируется в Scopus, Biological Abstracts, Chemical Abstracts,  
Ulrich's International Periodicals Directory, International Nuclear Information System (INIS Atomindex),  
Excerpta Medica, Russian Science Citation Index (на платформе Web of Science), elibrary

**Главный редактор**  
**академик РАН Хаитов Рахим Мусаевич**



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

- Хаитов Р.М.**, академик РАН, доктор мед. наук, профессор  
(главный редактор) (Москва, Россия)
- Акдис Ч.**, MD, профессор (Давос, Швейцария)
- Агаче И.**, MD, профессор (Брашов, Румыния)
- Атауллаханов Р.И.**, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)
- Болдырева М.Н.**, доктор мед. наук (Москва, Россия)
- Валента Р.**, MD, профессор (Вена, Австрия)
- Гариб Ф.Ю.**, доктор мед. наук, профессор (научный редактор) (Москва, Россия)
- Гудима Г.О.**, доктор биол. наук, профессор (заместитель главного редактора)  
(Москва, Россия)
- Гущин И.С.**, член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)
- Джонстон С.**, MD, профессор (Лондон, Великобритания)
- Емельянов А.В.**, доктор мед. наук, профессор (Санкт-Петербург, Россия)
- Ильина Н.И.**, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)
- Кадагидзе З.Г.**, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)
- Караулов А.В.**, академик РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)
- Мураро А.**, MD, профессор (Падуа, Италия)
- Пашенков М.В.**, доктор мед. наук (Москва, Россия)
- Петров Р.В.**, академик РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)
- Пинегин Б.В.**, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)
- Резников Ю.П.**, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)
- Сизякина Л.П.**, доктор мед. наук, профессор (Ростов-на-Дону, Россия)
- Симбирцев А.С.**, член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор  
(Санкт-Петербург, Россия)
- Филатов А.В.**, доктор биол. наук, профессор (Москва, Россия)
- Фрейдлин И.С.**, член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор  
(Санкт-Петербург, Россия)
- Хаитов М.Р.**, член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)
- Шиловский И.П.**, доктор биол. наук (Москва, Россия)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

- Карамов Э.В.**, доктор биол. наук, профессор (Москва, Россия)
- Козлов В.А.**, академик РАН, доктор мед. наук, профессор  
(Новосибирск, Россия)
- Медуницын Н.В.**, академик РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)
- Николаева И.А.**, доктор биол. наук (Москва, Россия)
- Сотникова Н.Ю.**, доктор мед. наук, профессор (Иваново, Россия)

## МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

- Арипова Т.У.**, академик АН РУз, доктор мед. наук, профессор  
(Ташкент, Узбекистан)
- Гамбаров С.С.**, доктор мед. наук, профессор (Ереван, Армения)
- Потапнев М.П.**, доктор мед. наук, профессор (Минск, Беларусь)
- Титов Л.П.**, доктор мед. наук, профессор (Минск, Беларусь)

Научно-практический рецензируемый журнал  
«Иммунология»  
Том 41, № 4, 2020

Свидетельство о регистрации средства массовой информации  
№ 0110435 от 19.03.1993

Периодичность: 6 номеров в год.

Редакция журнала доводит до сведения читателей, что в издании соблюдаются принципы международной организации «Комитет по издательской этике» (Committee On Publication Ethics – COPE).

Никакая часть издания не может быть воспроизведена без согласия редакции. При перепечатке публикаций с согласия редакции ссылка на журнал «Иммунология» обязательна.

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

Адрес редакции:  
115478, г. Москва,  
Каширское шоссе, д. 24

**Заведующая редакцией:**  
Гаврикова Галина Ивановна,  
editorial@immunologiya-journal.ru  
(для корреспонденции)

Сайт журнала: [www.immunologiya-journal.ru](http://www.immunologiya-journal.ru)

Журнал распространяется по подписке.  
Подписка через Интернет: [www.aks.ru](http://www.aks.ru); [www.pressa-rg.ru](http://www.pressa-rg.ru)  
Индексы по каталогу «Пресса России»:  
27877 – для индивидуальных подписчиков  
27878 – для предприятий и организаций

**Издатель**  
ООО Издательская группа  
«ГЭОТАР-Медиа»:  
115035, г. Москва,  
ул. Садовническая, д. 11, стр. 12  
Телефон: (495) 921-39-07  
[www.geotar.ru](http://www.geotar.ru)

Верстка: Килимник А.И.  
Корректор: Макеева Е.И.  
Выпускающий редактор: Исаева А.В.,  
[isaeva@geotar.ru](mailto:isaeva@geotar.ru)

Отдел рекламы: Туралина О.А.,  
[turalina@geotar.ru](mailto:turalina@geotar.ru)

Подписано в печать 10.08.2020.  
Тираж 3000 экземпляров.  
Формат 60 × 90 1/8.  
Печать офсетная. Печ. л. 14.

Отпечатано в ООО «Типография  
«Перфектум». 428000, г. Чебоксары,  
ул. К. Маркса, д. 52, оф. 102.  
Заказ №

Все права защищены.

© ООО Издательская группа  
«ГЭОТАР-Медиа», 2020.

Russian Academy of Sciences

National Research Center –  
Institute of Immunology  
Federal Medical-Biological Agency of Russia

# IMMUNOLOGIYA

Scientific-Practical Peer Reviewed Journal

Since 1980

Indexed in:

Scopus, Biological Abstracts,  
Chemical Abstracts, Excerpta Medica,  
Ulrich's International Periodicals Directory, International Nuclear Information System (INIS Atomindex), Russian Science Citation Index (no the Web of Science platform), eLibrary

**Editor-in-Chief**

**Rakhim Khaitov, academician  
of Russian Academy of Sciences**

**Immunologiya**

**Volume 41, N 4, 2020**

Mass media registration certificate  
N 0110435 from 19.03.1993

Periodicity: 6 issues per year.

Journal follows the standards of publication ethics of international organization «Committee On Publication Ethics» (COPE).

No part of the publication can be reproduced without the written consent of editorial office. Any reprint of publications with permission of editorial office should obligatory contain the reference to «Immunologiya» provided the work is properly cited.

Responsibility for authenticity information contained in the advertisement materials are borne by advertisers.

Address of the editorial office:  
Kashirskoe shosse, 24, Moscow, 115478, Russia

**Head of the editorial office:**

Gavrikova Galina,  
editorial@immunologiya-journal.ru  
(for correspondence)

**The website of the journal:**

www.immunologiya-journal.ru

**Publisher**

GEOTAR-Media Publishing Group:  
Sadovnicheskaya str., 11/12, Moscow, 115035, Russia  
Phone: + 7 (495) 921-39-07  
www.geotar.ru

Circulation of 3000 copies. Format 60 × 90 1/8.  
Offset printing Scientific sh.  
All rights reserved.

© GEOTAR-Media Publishing Group, 2020.

## EDITORIAL BOARD

**Khaitov Rakhim**, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Editor-in-Chief)  
(Moscow, Russia)

**Akdis Cezmi**, MD, PhD, prof. (Davos, Switzerland)

**Agache Ioana**, MD, PhD, prof. (Brasov, Romania)

**Ataullakhanov Ravshan**, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Boldyreva Margarita**, MD, PhD (Moscow, Russia)

**Emel'yanov Alexander**, MD, PhD, prof. (St. Petersburg, Russia)

**Filatov Alexander**, Dr.Sci, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Freydlin Irina**, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof.  
(St. Petersburg, Russia)

**Garib Firuz**, MD, PhD, prof. (Scientific Editor) (Moscow, Russia)

**Gudima Georgii**, Dr.Sci, PhD, prof. (Deputy Editor) (Moscow, Russia)

**Gushchin Igor**, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Ilina Natalia**, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Johnston Sebastian**, MD, PhD, prof. (London, United Kingdom)

**Kadagidze Zaira**, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Karaulov Alexander**, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Khaitov Musa**, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Muraro Antonella**, MD, PhD, prof. (Padova, Italy)

**Pashenkov Mikhail**, MD, PhD (Moscow, Russia)

**Petrov Rem**, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Pinegin Boris**, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Reznikov Yuriy**, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Simbirtsev Andrey**, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof.  
(St. Petersburg, Russia)

**Sizyakina Ludmila**, MD, PhD, prof. (Rostov-on-Don, Russia)

**Shilovskiy Igor**, Dr.Sci, PhD (Moscow, Russia)

**Valenta Rudolf**, MD, PhD, prof. (Vienna, Austria)

## EDITORIAL COUNCIL

**Karamov Edward**, Dr.Sci, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Kozlov Vladimir**, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Novosibirsk, Russia)

**Medunitsyn Nikolay**, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

**Nikolaeva Irina**, Dr.Sci, PhD (Moscow, Russia)

**Sotnikova Natalia**, MD, PhD, prof. (Ivanovo, Russia)

## INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

**Aripova Tamara**, academician of AS RUz, MD, PhD, prof. (Tashkent, Uzbekistan)

**Gambarov Spartak**, MD, PhD, prof. (Yerevan, Armenia)

**Potapnev Mikhail**, MD, PhD, prof. (Minsk, Belarus)

**Titov Leonid**, MD, PhD, prof. (Minsk, Belarus)

# Содержание

## Клеточная иммунология

**Гринько Е.К., Донецкова А.Д., Мухина Е.А., Андреева О.С., Шарова Н.И., Комогорова В.В., Литвина М.М., Марзанова С.Н., Митин А.Н.**

Динамика восстановления Т-лимфоцитов после индукции лимфопении циклофосфаном

**Милешина С.Е., Николин А.А., Козлов И.Г.**

Влияние коллагеновых матрикинов на функциональное состояние лейкоцитов человека

## Врожденный иммунитет

**Дагиль Ю.А., Пашенков М.В.**

Сопоставление трех видов клеточных тест-систем для оценки биологической активности агонистов рецептора NOD2

## Вакцины и вакцинация

**Шмаров М.М., Седова Е.С., Никонова А.Э., Елаков А.Л., Щербинин Д.Н., Артемова Э.А., Лебедева Е.С., Чулкина М.М., Лосич М.А., Зайкова О.Н., Чернышова Е.В., Алексеева С.В., Тутыхина И.Л., Сергеев О.В., Верховская Л.В., Пичугин А.В., Метлин А.Е., Баринский И.Ф., Гребеникова Т.В., Логунов Д.Ю., Атауллаханов Р.И., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л.**

Иммуногенные и защитные свойства рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующего ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма РВ-97

## Онкоиммунология

**Заботина Т.Н., Черткова А.И., Кадагидзе З.Г., Борунова А.А., Шоуа Э.К., Гордеева О.О., Мещеряков А.А.**

Популяция CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови и ее значение для непосредственных и отдаленных результатов лечения больных трижды негативным раком молочной железы

## Клиническая иммунология

**Авербах М.М., Панова Л.В., Овсянкина Е.С., Хитева А.Ю.**

Роль сывороточного амилоида А и С-реактивного белка в прогнозировании послеоперационных осложнений и обострения туберкулезного процесса после хирургического вмешательства у детей старшего возраста и подростков

**Маркелова Е.В., Лазанович В.А., Шуматов В.Б., Малков В.А., Евсегнеева И.В.**

Клиническая оценка В- и Т-лимфоцитов у пациентов с хирургическим сепсисом

**Смирнова О.В., Елманова Н.Г.**

Взаимобусловленность влияний I и II типов воспаления на процессы липопероксидации и антиоксидантной защиты у пациентов с механической желтухой желчнокаменного генеза в послеоперационном периоде

## Методы

**Невская Л.В., Капитанова В.К., Петрова Н.Э.**

Сравнительный анализ современных методов диагностики аллергических реакций немедленного типа

## Обзоры

**Балмасова И.П., Царев В.Н., Ющук Е.Н., Доровских А.С., Малова Е.С., Каракон К.Г., Эльбекьян К.С., Арутюнов С.Д.**

Заболевания пародонта и атеросклероз: микроэкологические, метаболические и иммунологические механизмы взаимосвязи

**Соломай Т.В., Семененко Т.А., Филатов Н.Н., Костинов М.П., Ильина Н.И.**

Вирус Эпштейна–Барр: разработка вакцин

## Юбилей

**Владимир Александрович КОЗЛОВ**

# Contents

## Cellular immunology

**285 Grinko E.K., Donetskov A.D., Mukhina E.A., Andreeva O.S., Sharova N.I., Komogorova V.V., Litvina M.M., Marzanova S.N., Mitin A.N.**

Dynamics of T-lymphocytes regeneration after lymphopenia induction by cyclophosphane

**295 Mileshina S.E., Nikolin A.A., Kozlov I.G.**

Effect of collagen matrikines on the functional state of human leukocytes

## Innate immunity

**304 Dagil Yu.A., Pashenkov M.V.**

A comparison of three types of cell-based test systems for the assessment of biological activity of NOD2 receptor agonists

## Vaccines and vaccination

**312 Shmarov M.M., Sedova E.S., Nikonova A.E., Elakov A.L., Shcherbinin D.N., Artemova E.A., Lebedeva E.S., Chulkina M.M., Losich M.A., Zaykova O.N., Chernishova E.V., Alekseeva S.V., Tutykhina I.L., Sergeev O.V., Verkhovskaya L.V., Pichugin A.V., Metlin A.E., Barinsky I.F., Grebennikova T.V., Logunov D.Y., Atullakhanov R.I., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L.**

Immunogenic and protective properties of the recombinant human adenovirus serotype 5 expressing the glycoprotein G gene of the rabies virus vaccine strain RV-97

## Oncoimmunology

**326 Zabolina T.N., Chertkova A.I., Kadagidze Z.G., Borunova A.A., Shoua E.K., Gordeeva O.O., Meshcheryakov A.A.**

Peripheral blood CD8<sup>+</sup>-lymphocytes populations and its value for direct and outlying treatment results in triple negative breast cancer patients

## Клиническая иммунология

**337 Averbakh M.M., Panova L.V., Ovsyankina E.S., Khiteva A.Yu.**

The importance of serum amyloid A and C-reactive protein in predicting postoperative complications and exacerbation of tuberculosis after surgical intervention in children of older age

**344 Markelova E.V., Lazanovich V.A., Shumatov V.B., Malkov V.A., Evsegneeva I.V.**

Clinical evaluation of B- and T-lymphocytes in patients with surgical sepsis

**354 Smirnova O.V., Elmanova N.G.**

Interconditionality of the effects of types I and II of inflammation on the processes of lipid peroxidation and antioxidant protection in patients with obstructive jaundice of gallstone origin in the postoperative period

## Методы

**363 Nevskaya L.V., Kapitanova V.K., Petrova N.E.**

Comparative analysis of modern methods for diagnostics of immediate allergic reactions

## Обзоры

**370 Balmasova I.P., Tsarev V.N., Yushchuk E.N., Dorovskikh A.S., Malova E.S., Karakov K.G., Elbekyan K.S., Arutyunov S.D.**

Periodontal diseases and atherosclerosis: microecological, metabolic and immunological mechanisms of interconnection

**381 Solomay T.V., Semenenko T.A., Filatov N.N., Kostinov M.P., Pina N.I.**

Epstein–Barr virus: vaccine development

## Jubilee

**391 Vladimir Alexandrovich KOZLOV**

© Коллектив авторов, 2020

Гринько Е.К.<sup>1</sup>, Донецкова А.Д.<sup>2,3</sup>, Мухина Е.А.<sup>2</sup>, Андреева О.С.<sup>2</sup>, Шарова Н.И.<sup>2</sup>, Комогорова В.В.<sup>2</sup>, Литвина М.М.<sup>2</sup>, Марзанова С.Н.<sup>1</sup>, Митин А.Н.<sup>2</sup>

## Динамика восстановления Т-лимфоцитов после индукции лимфопении циклофосфаном

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», 109472, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

### Резюме

**Введение.** Химиотерапевтические препараты, применяемые в медицине главным образом для лечения онкологических заболеваний, относятся к группе факторов, вызывающих повреждение иммунной системы. Исследование механизмов восстановления Т-клеточного звена иммунной системы после воздействия цитостатических препаратов имеет важное значение как для понимания патогенеза их повреждающего действия, так и для поиска адекватных способов коррекции возникающих нарушений.

**Цель работы** – изучить вклад тимуса и периферического отдела иммунной системы в восстановление популяции Т-клеток после воздействия циклофосфана на мышах линии C57BL/6.

**Материал и методы.** Экспериментальным животным вводили циклофосфан внутривенно однократно в дозе 125 мг/кг. Мышей забивали на 0, 10, 20, 30, 60-е сутки после введения циклофосфана. В тимусе и селезенке определяли общее количество клеток и субпопуляционный состав методом проточной цитофлуориметрии.

**Результаты.** Обнаружено, что активно делящиеся клетки тимуса более уязвимы к действию препарата, чем лимфоциты селезенки. В то же время восстановительные процессы в тимусе начинаются раньше (на 20-е сутки) с последующим медленным восстановлением лимфоцитов селезенки (к 60-м суткам). Однако полной регенерации субпопуляции цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) в селезенке не отмечается даже к 60-м суткам. Исследование возрастного фенотипа Т-клеточных субпопуляций показало, что в результате действия циклофосфана происходит усиление конверсии фенотипа наивных Т-клеток в центральные Т-клетки памяти.

**Заключение.** Циклофосфан оказывает выраженное цитотоксическое действие на Т-клеточное звено иммунной системы мышей линии C57BL/6 с преимущественным поражением быстро делящихся популяций тимоцитов. Тимопоэз не способен компенсировать дефицит периферических Т-клеточных популяций, что ведет к усилению гомеостатической пролиферации Т-клеток, конверсии фенотипа наивных Т-клеток и накоплению Т-хелперов и ЦТЛ с фенотипом центральных Т-клеток памяти. Следствием данных изменений может стать сужение репертуара Т-клеточных рецепторов с нарушением полноценного иммунного надзора и возможным ростом онкологических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний в последующем.

**Ключевые слова:** Т-лимфоциты; тимус; селезенка; циклофосфан; регенерация; проточная цитометрия

Статья поступила 06.05.2020. Принята в печать 16.06.2020.

**Для цитирования:** Гринько Е.К., Донецкова А.Д., Мухина Е.А., Андреева О.С., Шарова Н.И., Комогорова В.В., Литвина М.М., Марзанова С.Н., Митин А.Н. Динамика восстановления Т-лимфоцитов после индукции лимфопении циклофосфаном. Иммунология. 2020; 41 (4): 285–294. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-285-294>

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках проведения научно-исследовательских работ по заданию ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России в соответствии с соглашением № 388-02-2020-008 от 15.01.2020.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции  
Донецкова Альмира Дмитриевна –  
доктор медицинских наук,  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории  
дифференцировки лимфоцитов  
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»  
ФМБА России,  
профессор кафедры иммунологии  
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова  
Минздрава России,  
Москва, Российская Федерация  
E-mail: [almira\\_donetskova@yahoo.com](mailto:almira_donetskova@yahoo.com)  
<http://orcid.org/0000-0003-2465-2444>

Grinko E.K.<sup>1</sup>, Donetskova A.D.<sup>2,3</sup>, Mukhina E.A.<sup>2</sup>, Andreeva O.S.<sup>2</sup>, Sharova N.I.<sup>2</sup>, Komogorova V.V.<sup>2</sup>, Litvina M.M.<sup>2</sup>, Marzanova S.N.<sup>1</sup>, Mitin A.N.<sup>2</sup>

## Dynamics of T-lymphocytes regeneration after lymphopenia induction by cyclophosphane

<sup>1</sup> Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Skryabin, 109472, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

### Abstract

**Introduction.** Chemotherapy drugs used in medicine, mainly for the treatment of cancer, belong to a group of factors that cause damage of the immune system. The study of the mechanisms of T-cell recovery after exposure to cytostatic agents is important both for understanding the pathogenesis of their damaging action and for finding the correct therapy.

**Aim** of the study – to investigate the role of thymus and the peripheral lymphoid organs in T-cell restoration after exposure to cyclophosphamide in C57BL/6 mice.

**Material and methods.** Cyclophosphamide was administered intraperitoneally to experimental animals once at a dose of 125 mg/kg. Mice were euthanized on days 0, 10, 20, 30, and 60 after cyclophosphamide administration. The total number of cells and the lymphocyte subpopulations in the thymus and spleen were determined by flow cytometry.

**Results.** We found that actively dividing thymus cells are more defenseless to the action of the drug than spleen lymphocytes. At the same time, recovery processes in the thymus begin earlier (on day 20), followed by slow recovery of spleen lymphocytes (by day 60). However, complete regeneration of cytotoxic T-cells (CTLs) in the spleen is not observed even by 60 days. The study of the age phenotype of T-cell subpopulations showed that cyclophosphamide intensifies the phenomenon of the conversion of the naïve T-cells into central memory T-cells.

**Conclusion.** Cyclophosphamide has a heavy cytotoxic effect on the T cells of C57BL/6 mice, with predominant damage in highly dividing thymocyte populations. Thymopoiesis is unable to compensate for the deficiency of peripheral T-cell populations, which leads to an increase in homeostatic proliferation of T-cells, conversion of naïve T-cell phenotype and the accumulation of T-helpers and CTLs with the phenotype of central memory T-cells. These changes can narrow the repertoire of T-cell receptors, lead to impaired immune surveillance and the possible growth of oncological, autoimmune and infectious diseases in the future.

**Keywords:** T-lymphocytes; thymus; spleen; cyclophosphamide; regeneration; flow cytometry

Received 06.05.2020. Accepted 16.06.2020.

**For citation:** Grinko E.K., Donetskova A.D., Mukhina E.A., Andreeva O.S., Sharova N.I., Komogorova V.V., Litvina M.M., Marzanova S.N., Mitin A.N. Dynamics of T-lymphocytes regeneration after lymphopenia induction by cyclophosphane. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 285–94. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-285-294> (in Russian)

**Funding.** The study was carried out as part of research on the State task of the NRC Institute of Immunology FMBA of Russia under the agreement No. 388-02-2020-008 of 15.01.2020.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

### For correspondence

Almira D. Donetskova – MD,  
Leader Researcher of the Laboratory  
of Lymphocyte Differentiation,  
NRC «Institute of Immunology»  
FMBA of Russia,  
Professor of Immunology Department,  
N.I. Pirogov Russian National  
Research Medical University,  
Ministry of Health of the Russian  
Federation Moscow, Russian Federation  
E-mail: [almira\\_donetskova@yahoo.com](mailto:almira_donetskova@yahoo.com)  
<http://orcid.org/0000-0003-2465-2444>

### Введение

Лимфопения, в том числе затрагивающая Т-лимфоциты, развивается при разнообразных внешних воздействиях на организм (ионизирующие излучения, химические агенты, инфекции и пр.) [1]. При прекращении действия повреждающих факторов количество лимфоцитов и их субпопуляций в крови возвращается к норме. Восстановление количества Т-лимфоцитов происходит

за счет двух механизмов: тимопоэза в тимусе и гомеостатической пролиферации в периферическом отделе иммунной системы [1, 2].

Химиотерапевтические препараты, которые применяются в медицине в первую очередь для лечения онкологических заболеваний, относятся к группе факторов, которые способствуют атрофии тимуса и уменьшению пула циркулирующих лимфоцитов [2–4]. Алкилирующие

щие цитостатики (в частности циклофосфан) вызывают повреждение генетического аппарата активно делящихся клеток, что приводит к апоптозу как опухолевых клеток, так и иммунокомпетентных клеток в лимфоидных органах [3]. В проведенных ранее исследованиях при изучении действия циклофосфана в терапевтических дозах был установлен его выраженный иммуносупрессивный эффект, наиболее сильно затрагивающий Т-клеточное звено иммунной системы [1, 2, 5–7]. Этот эффект проявлялся при применении циклофосфана как в дозе 20 мг/кг (уменьшение количества Т-лимфоцитов на 50 %), так и в режиме высокодозовой химиотерапии – 200 мг/кг (снижение числа Т-клеток на 90 %) [6].

После воздействия цитостатиков число Т-клеток восстанавливается за счет усиления тимопоэза и гомеостатической пролиферации [2]. При этом тимопоэз можно рассматривать в качестве нормального способа восстановления дефицита Т-лимфоцитов, сохраняющего качественные характеристики периферических Т-клеток и полноценный репертуар Т-клеточных рецепторов (TCR), а гомеостатическую пролиферацию – в качестве вынужденной меры, ведущей к конверсии фенотипа наивных Т-клеток (Tnaïve), клональной экспансии и сужению репертуара TCR [7–9].

Оценка вклада каждого из этих механизмов в регенерацию Т-клеточного звена иммунной системы при различных патологических состояниях, сопровождающихся Т-клеточным дефицитом (в частности после воздействия цитостатических препаратов), имеет важное значение как для понимания патогенеза этих состояний, так и для поиска адекватных методов их коррекции. В частности, в ряде исследований показано, что иммуномодуляторы различной природы способны восстанавливать количественный и субпопуляционный состав лимфоидных клеток после действия цитостатиков [10–13].

Несмотря на длительную историю изучения циклофосфана и его побочных эффектов на иммунную систему до последнего времени не уделялось достаточного внимания исследованию спонтанного восстановления Т-клеточного звена иммунной системы после воздействия цитостатика. В данной работе мы исследовали вклад тимуса и периферического отдела иммунной системы (на примере селезенки) в восстановление популяции Т-клеток после воздействия цитостатика (циклофосфан) в терапевтической дозе.

## Материал и методы

Исследование проводилось на мышах линии C57BL/6 в возрасте 6–8 нед, самках массой 18–20 г, полученных из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Все манипуляции с экспериментальными мышами осуществляли в соответствии с правилами лабораторной практики [«Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (ETS N123), приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики»

и «Положение об этическом отношении к лабораторным животным «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)].

Экспериментальной группе животных вводили циклофосфан (препарат Циклофосфан-ЛЭНС®) внутривенно в дозе 125 мг/кг однократно (доза, используемая при терапии опухолей) [14–17]. Мышей забивали на 10, 20, 30 и 60-е сутки после введения препарата (по 5 мышей в каждой группе). Контролем служили мыши соответствующего возраста и того же помета, что и мыши экспериментальной группы, без введения циклофосфана (8 мышей, по 2 мыши в каждой точке исследования). Поскольку мыши контрольной группы в каждой точке исследования (10, 20, 30 и 60-е сутки) статистически значимо не отличались между собой по содержанию Т-лимфоцитов, при анализе полученных результатов они были объединены в одну группу («Контроль»).

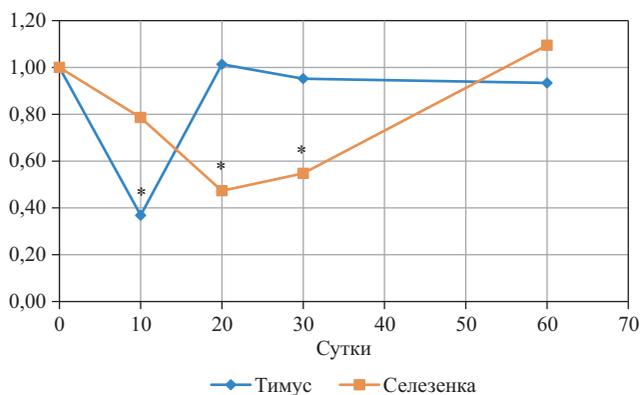
Мышей забивали цервикальной дислокацией. Извлекали тимус и селезенку, освобождали от соединительной ткани и гомогенизировали, эритроциты лизировали буфером фирмы eBioscience (США). Для дальнейшего анализа субпопуляционного состава лимфоидных органов полученные суспензии клеток переводили в фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с 1,0 % BSA и 0,1 % NaN<sub>3</sub>. Количество клеток в органах и их жизнеспособность определяли в камере Горяева, предварительно окрасив суспензию эозином. Для определения поверхностных маркеров клетки инкубировали с моноклональными антителами в течение 30 мин при 4 °С. Лазерную цитометрию клеток выполняли на проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, США) в стандартном режиме. Данные анализировали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva и FCS Express (США).

В настоящем исследовании определяли общее содержание клеток, процент и абсолютное содержание Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>) и их основных субпопуляций [суммарной фракции CD4<sup>+</sup>-Т-хелперов, включающей регуляторные Т-клетки, цитотоксических CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов (ЦТЛ)], а также возрастной фенотип Т-клеток, который оценивали по содержанию Tnaïve и центральных Т-клеток памяти (Tcm).

Использовали следующие комбинации моноклональных антител фирмы eBioscience (США) (препараты для изотипических контролей той же фирмы):

1. Анти-CD3-FITC + анти-CD4-PerCP-Cy5.5 + анти-CD8-APC-eFluor780 + анти-CD44-PE-Cy7 + анти-CD25-APC (тимус).
2. Анти-CD3-FITC + анти-CD4-PerCP-Cy5.5 + анти-CD8-APC-eFluor780 + анти-CD44-PE-Cy7 + анти-CD62L-PE (селезенка).

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрического анализа. Исследованные данные представляли в виде *Me* (LQ–UQ), где *Me* – медиана, LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль. Для сопоставления экспериментальных групп с контролем применяли *U*-критерий Манна–Уитни, при



**Рис. 1.** Динамика изменения общей численности клеток тимуса и селезенки мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

Здесь и на рис. 2–4, 6, 8: нормализованные относительно контроля данные, медианы соответствующих показателей в контроле приняты за единицу.

Здесь и на рис. 2–4, 6–8: \*  $p < 0,05$  в сравнении с контролем.

этом различие групп полагали статистически значимым при  $p < 0,05$ . Обработку проводили с помощью программного пакета Statistica 12.5 (Stat Soft Inc., США).

## Результаты

На рис. 1 в графической форме показана динамика изменения общего числа клеток в тимусе и селезенке

мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана в терапевтической дозе. Результаты представлены как нормализованные данные относительно интактного контроля, принятого за единицу. В тимусе число клеток было минимально на 10-е сутки после введения препарата и составляло 60,00 млн (57,00–66,00 млн) клеток при 162,80 млн (142,30–183,00 млн) клеток в контроле, т. е. снижение до 37 % от показателей интактного контроля ( $p < 0,05$ ; табл. 1). На 20-е сутки общая численность тимоцитов восстанавливалась, достигнув уровня контроля.

В селезенке клеточность снижалась более постепенно, достигая минимальных значений к 20-м суткам: 60,50 млн (56,50–64,50 млн) клеток при 127,88 млн (118,5–139,5 млн) клеток в контроле ( $p < 0,05$ ; табл. 2). Восстановление численности лимфоцитов селезенки происходило только к 60-м суткам после введения циклофосфана.

Динамика восстановления отдельных популяций тимоцитов представлена на рис. 2. На 10-е сутки после введения циклофосфана отмечалось статистически значимое снижение численности всех популяций тимоцитов, кроме двойных негативных (DN) тимоцитов ( $p > 0,05$ ). К 20-м суткам популяции двойных позитивных (DP) и CD4<sup>+</sup>-timoцитов практически достигали уровня контроля, а популяции DN- и одиночно позитивных (SP) CD8<sup>+</sup>-timoцитов превышали его, вернувшись к нормальным показателям через 2 мес после введения цитостатика (см. табл. 1; рис. 2).

**Таблица 1.** Численность тимоцитов у мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана, млн клеток на орган (тимус)

Сутки	Количество мышей	Тимоциты	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> (DN)	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (DP)	CD4 <sup>+</sup> (SP)	CD8 <sup>+</sup> (SP)
Контроль	8	162,80 (142,30–183,00)	2,69 (2,33–3,16)	139,05 (118,37–156,80)	17,39 (13,43–18,80)	3,45 (2,89–3,93)
10	5	60,00* (57,00–66,00)	0,92 (0,88–1,2)	51,41* (49,17–54,36)	3,60* (3,59–3,97)	0,86* (0,74–0,94)
20	5	165,00 (154,00–172,00)	8,61* (4,15–13,83)	129,69 (123,35–142,07)	13,25 (12,04–13,52)	8,62* (4,5–13,04)
30	5	155,00 (155,00–159,00)	4,33* (4,28–4,4)	130,86 (128,65–131,60)	14,21 (13,94–15,5)	5,22* (5,08–6,39)
60	5	152,00 (148,50–162,00)	2,35 (1,81–2,74)	131,48 (129,64–135,27)	12,58 (12,28–14,23)	4,01 (3,25–4,1)

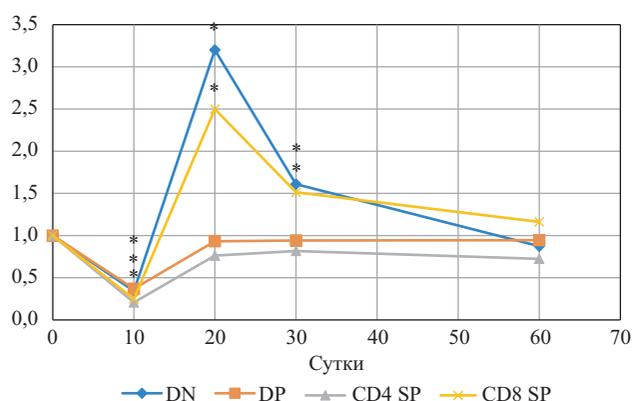
**Примечание.** Здесь и в табл. 2–4: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с интактным контролем.

Здесь и в табл. 3: DN – двойные негативные; DP – двойные позитивные; SP – одиночно позитивные тимоциты.

**Таблица 2.** Численность основных Т-клеточных субпопуляций в селезенке мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана, млн клеток на орган

Сутки	Количество мышей	Лимфоциты	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> – Т-хелперы	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> – ЦТЛ
Контроль	8	127,88 (118,5–139,5)	26,17 (23,93–29,41)	24,9 (24,38–26,26)
10	5	100,50 (91,00–100,50)	17,67 (14,39–20,19)	13,39* (12,55–13,58)
20	5	60,50* (56,50–64,50)	12,61* (12,17–13,29)	6,55* (6,16–7,28)
30	5	70,00* (62,50–71,25)	16,34* (12,73–17,66)	6,14* (6,13–6,60)
60	5	140,00 (110,00–148,50)	27,37 (21,52–27,39)	18,97* (13,58–20,45)

**Примечание.** ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты.



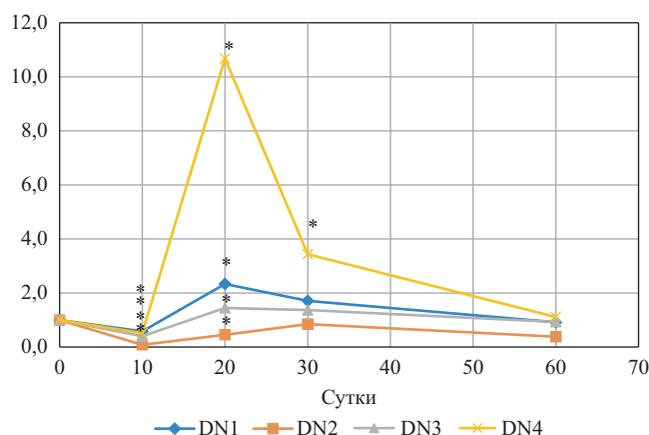
**Рис. 2.** Динамика изменения численности основных популяций тимоцитов мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

Здесь и на рис. 3: DN – двойные негативные; DP – двойные позитивные; SP – одинарно позитивные тимоциты.

Исследование субпопуляций DN-timoцитов выявило их статистически значимое снижение на 10-е сутки в сравнении с интактным контролем (табл. 3; рис. 3). Увеличение общего содержания DN-timoцитов на 20-е и 30-е сутки связано с ростом уровня тимоцитов, находящихся на последней стадии дифференцировки – DN4: 6,62 млн клеток (2,38–9,81 млн) и 2,13 млн клеток (1,65–2,27 млн) против 0,62 млн клеток (0,48–0,71 млн) в контроле соответственно ( $p < 0,05$ ).

Оценка восстановления периферических Т-клеток в селезенке выполнена отдельно для Т-хелперов (фенотип CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (фенотип CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). Оценивались динамика восстановления обеих Т-клеточных популяций и их возрастной фенотип.

После введения циклофосфана численность обеих популяций в селезенке снижалась (см. табл. 2; рис. 4). Минимальное значение числа Т-хелперов и ЦТЛ отмечалось на 20-е сутки: 12,61 млн (12,17–13,29 млн) клеток при 26,17 млн (23,93–29,41 млн) клеток в контроле для Т-хелперов и 6,55 млн (6,16–7,28 млн) клеток при 24,9 млн (24,38–26,26 млн) клеток в контроле для ЦТЛ. Количество последних снижалось более выраженно и быстро: уже на 10-е сутки оно составило 54 % от уровня интактного контроля ( $p < 0,05$ ). Восстановление численности обеих популяций начиналось с 30-х суток.



**Рис. 3.** Динамика изменения численности субпопуляций DN-timoцитов мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

К 60-м суткам количество Т-хелперов полностью восстанавливалось. В то же время уровень ЦТЛ не восстанавливался даже через 2 мес после введения циклофосфана: 18,97 млн (13,58–20,45 млн) клеток при 24,9 млн (24,38–26,26 млн) клеток в контроле ( $p < 0,05$ ).

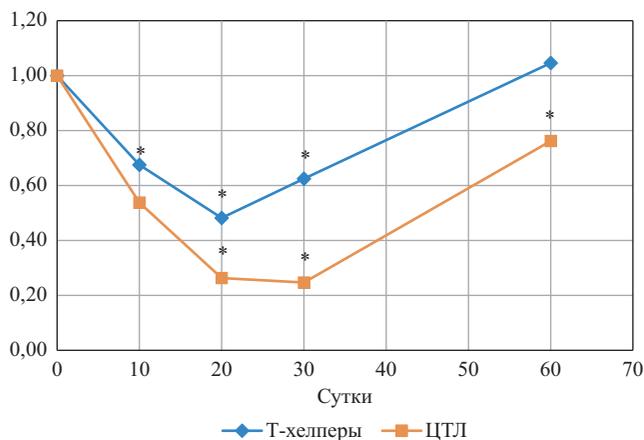
Исследование возрастного фенотипа у мышей проводилось по коэкспрессии поверхностных маркеров CD44 и CD62L: Tnaïve – фенотип CD62L<sup>+</sup>44<sup>low/-</sup>, а Tcm – CD62L<sup>+</sup>44<sup>high</sup> (рис. 5).

Выявлено, что численность Tnaïve, как и всей популяции в целом, снижалась до 20 сут после введения химиопрепарата (табл. 4, рис. 6). Снижение численности Т-хелперов с фенотипом Tcm начиналось только после 10-х суток, достигая минимальных значений на 30-е сутки, и было менее выражено, чем Tnaïve – 51 % и 29 % от уровня интактного контроля соответственно.

Дальнейшее восстановление численности возрастных субпопуляций Т-хелперов происходило с преобладанием лимфоцитов с фенотипом Tcm: на 60-е сутки их содержание составляло 1,51 млн (0,84–1,59 млн) клеток при 0,79 млн (0,68–0,96 млн) клеток в контроле. Численность Tnaïve даже через 2 мес после введения циклофосфана не достигала уровня контроля: 13,94 млн (9,1–15,38 млн) клеток при содержании 20,33 млн (16,27–21,64 млн) клеток у интактных мы-

**Таблица 3.** Численность субпопуляций DN-timoцитов у мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана, млн клеток на орган (тимус)

Сутки	Количество мышей	DN1	DN2	DN3	DN4
Контроль	8	0,24 (0,20–0,26)	0,79 (0,72–0,98)	1,03 (0,87–1,23)	0,62 (0,48–0,71)
10	5	0,14* (0,13–0,21)	0,064* (0,05–0,065)	0,41* (0,29–0,43)	0,32* (0,2–0,33)
20	5	0,56* (0,41–0,71)	0,36* (0,24–0,43)	1,49* (1,34–2,1)	6,62* (2,38–9,81)
30	5	0,41 (0,32–0,43)	0,67 (0,56–0,71)	1,41 (1,32–1,5)	2,13* (1,65–2,27)
60	5	0,22 (0,20–0,23)	0,30* (0,26–0,28)	0,96 (0,83–1,39)	0,69 (0,49–0,93)



**Рис. 4.** Динамика изменения численности основных популяций лимфоцитов селезенки мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты.

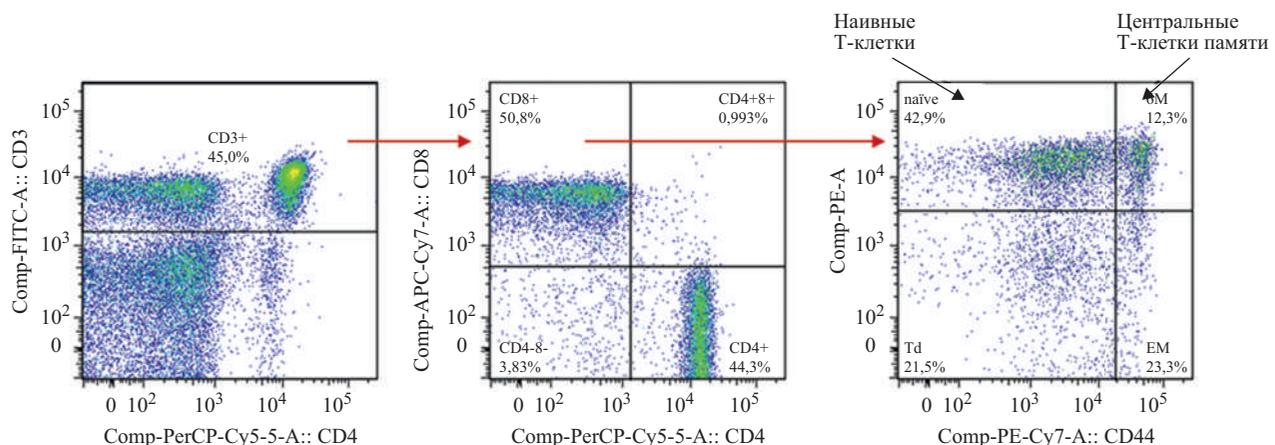
шей ( $p < 0,05$ ). Эта тенденция наглядно продемонстрирована на графике изменения соотношения числа  $T_{naïve}$  и  $T_{cm}$  –  $T_{naïve}/T_{cm}$ , которое у Т-хелперов статистически значимо снижалось с 23,6 (показатель интактных мышей) до 10,4 на 60-е сутки после введения циклофосфана ( $p < 0,05$ ; рис. 7).

Восстановление численности возрастных субпопуляций ЦТЛ с преобладанием лимфоцитов с фено-

типом  $T_{cm}$  выявлялось лишь в конце восстановления численности обеих субпопуляций – в период с 30-х по 60-е сутки после назначения циклофосфана (табл. 4, рис. 8). На 60-е сутки содержание лимфоцитов с фенотипом  $T_{cm}$  составляло 4,29 млн (3,18–5,07 млн) клеток при 3,44 млн (3,24–4,51 млн) клеток у интактных мышей. Численность наивных ЦТЛ, как и наивных Т-хелперов, через 60 дней после введения цитостатика не достигала уровня контроля: 11,82 млн (7,55–12,01 млн) клеток при 15,45 млн (13,3–16,1 млн) клеток в контроле ( $p < 0,05$ ). При этом соотношение численности ЦТЛ с фенотипами  $T_{naïve}$  и  $T_{cm}$  так же, как и у Т-хелперов, снижалось с 3,9 у интактных мышей до 2,4 у животных на 60-е сутки после введения цитостатика, отличие статистически значимо ( $p < 0,05$ ; см. рис. 7).

## Обсуждение

При исследовании клеточности лимфоидных органов было показано, что тимоциты быстрее реагируют на токсическое действие циклофосфана: уже на 10-е сутки их количество статистически значимо упало до  $1/3$  от показателей интактного контроля с последующим восстановлением начиная с 20-х суток. Результаты подтверждаются предыдущими исследованиями морфологической структуры тимуса, в которых показано, что при введении циклофосфана наблюдается тимическая атрофия с уменьшением размеров органа и обеднением морфологии долек с миелометапластическими из-

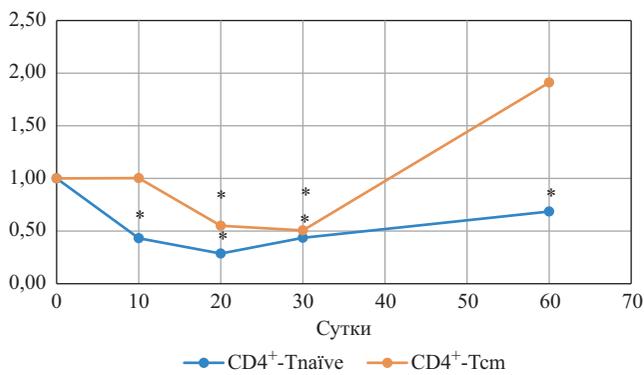


**Рис. 5.** Алгоритм цитометрического определения субпопуляций наивных и центральных Т-клеток памяти на примере ЦТЛ селезенки интактной мыши линии C57BL/6

**Таблица 4.** Численность основных возрастных субпопуляций Т-хелперов ( $CD4^+$ ) и цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD8^+$ ) в селезенке мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана, млн клеток на орган

Сутки	Количество мышей	$CD4^+$ - $T_{naïve}$	$CD4^+$ - $T_{cm}$	$CD8^+$ - $T_{naïve}$	$CD8^+$ - $T_{cm}$
Контроль	8	20,33 (16,27–21,64)	0,79 (0,68–0,96)	15,45 (13,3–16,1)	3,44 (3,24–4,51)
10	5	8,77* (7,18–9,81)	0,79 (0,65–0,94)	5,41* (4,31–5,59)	1,36* (1,17–1,36)
20	5	5,81* (5,18–5,97)	0,43* (0,38–0,46)	3,94* (3,85–4,12)	0,94* (0,92–1,21)
30	5	8,87* (7,7–8,93)	0,40* (0,4–0,59)	3,40* (3,35–3,95)	1,07* (0,64–1,08)
60	5	13,94* (9,1–15,38)	1,51 (0,84–1,59)	11,82* (7,55–12,01)	4,29 (3,18–5,07)

**Примечание.**  $T_{naïve}$  – наивные Т-клетки;  $T_{cm}$  – центральные Т-клетки памяти.

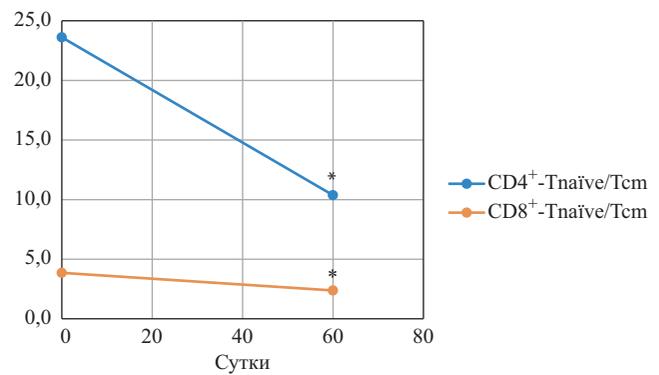


**Рис. 6.** Динамика изменения численности возрастных субпопуляций Т-хелперов мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

Здесь и на рис. 7, 8: Tnaïve – наивные Т-клетки; Tcm – центральные Т-клетки памяти.

менениями в субкапсулярной и кортико-медуллярной зонах, увеличением количества апоптотических клеток с фрагментированной ДНК [1, 18, 19]. В то же время численность лимфоцитов селезенки к 10-м суткам снизилась менее существенно и только к 20-м суткам их количество стало значимо отличаться от показателей интактных мышей, достигнув 47 % от их уровня. Следовательно, можно говорить о более высокой чувствительности активно пролиферирующих тимоцитов к действию циклофосфана по сравнению со зрелыми клетками селезенки, а также, ввиду быстрого восстановления тимопоэза, об отсутствии выраженного токсического действия цитостатика на гемопоэтические предшественники тимоцитов и строму центральных органов иммунной системы (костного мозга и тимуса). Отсрочка восстановления количества лимфоцитов селезенки указывает на зависимость этого процесса от лимфопоэза, идущего в центральных органах иммунной системы.

При исследовании динамики восстановления отдельных популяций тимоцитов (DN, DP, SP CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>) было показано, что их содержание статистически значимо снизилось в ранние сутки после введения циклофосфана (за исключением популяции DN-timoцитов, уровень снижения которой не был статистически значимым). Похожие результаты были получены в работе R. Frawley и соавт., которые показали, что циклофосфан, как и ряд других иммуносупрессивных препаратов, вызывает атрофию тимуса с прямым повреждающим действием на развивающиеся CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>-timoциты [5]. К 20-м суткам численность всех популяций тимоцитов достигла уровня контроля, а популяции DN- и CD8<sup>+</sup>-SP-timoцитов на 20-е и 30-е сутки даже значимо превосходили уровень интактного контроля, вернувшись к нормальным показателям на 60-е сутки. С другой стороны, анализ отдельных субпопуляций DN-timoцитов показал, что, в отличие от суммарной популяции, снижение численности для каждой из них на 10-е сутки оказалось статистически зна-

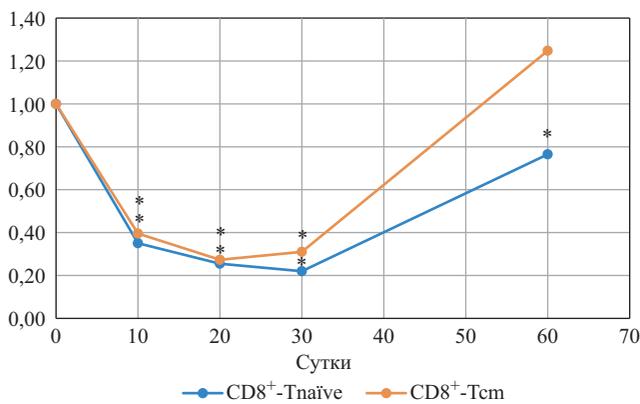


**Рис. 7.** Изменение соотношения наивных и центральных Т-клеток памяти среди Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>) в селезенке мышей линии C57BL/6 на 60-е сутки после однократного введения циклофосфана

чимым, а рост на 20-е и 30-е сутки обусловлен чрезмерным увеличением количества DN4-timoцитов, что косвенно указывает на более высокую интенсивность восстановительных процессов в костном мозге по сравнению с тимопоэзом, который не справляется с дифференцировкой всех поступающих предшественников, формируя своеобразный блок дифференцировки на стадии DN4.

Таким образом, можно констатировать, что после однократного введения циклофосфана в терапевтических дозах происходит кратковременное угнетение тимопоэза, которое к 20-м суткам полностью устраняется и даже сопровождается компенсаторным усилением дифференцировки, в частности популяции CD8<sup>+</sup>-SP-timoцитов. В то же время восстановление тимопоэза несколько отстает от восстановления лимфопоэза, идущего в костном мозге, что может свидетельствовать или о меньшей чувствительности гемопоэтических стволовых клеток и стромы костного мозга к повреждающему действию циклофосфана, или, в целом, о более высоком регенеративном потенциале костного мозга по сравнению с тимусом.

После введения циклофосфана численность как Т-хелперов, так и ЦТЛ в селезенке стала постепенно снижаться, достигнув минимальных значений на 20-е сутки, причем снижение ЦТЛ было более выраженным и быстрым, а Т-хелперы оказались более устойчивыми к действию циклофосфана (снижение их численности стало статистически значимым только на 20-е сутки). В опубликованных ранее работах проводилось исследование клеточного состава селезенки и периферической крови в ранние сроки после введения циклофосфана мышам линии Balb/c [20, 21]. Авторами было показано, что в ранние сроки (исследование проводилось начиная с 4-го часа после введения препарата) отмечалось статистически значимое снижение количества CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, в то время как изменения количества CD8<sup>+</sup>-клеток не наблюдалось; авторы отмечали восстановление исходных показателей лимфоидного роста



**Рис. 8.** Динамика изменения численности возрастных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана

на 5–7-е сутки после введения цитостатика [20]. В работе Х.Н. Нууан и соавт. также было показано, что при введении циклофосфана мышам в дозах 100 и 150 мг/кг отмечалось дозозависимое снижение количества CD3<sup>+</sup>- и CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов и увеличение количества CD8<sup>+</sup>-клеток на 4-й день после введения химиопрепарата [21].

В нашем исследовании восстановление численности обеих популяций лимфоцитов началось с 30-х суток и полностью завершилось для Т-хелперов на 60-е сутки после введения цитостатика, тогда как ЦТЛ полностью не восстановили свою численность даже к 60-м суткам, достигнув только 76 % от уровня контроля, несмотря на полное восстановление CD8<sup>+</sup>-SP-популяции в тимусе. Таким образом, можно утверждать, что ЦТЛ являются более уязвимой популяцией при назначении циклофосфана в терапевтических дозировках по сравнению с Т-хелперами: восстановление их численности требует большего времени и не компенсируется полностью восстановленным тимопоэзом.

Вторым существенным механизмом поддержания и восстановления численности периферических Т-клеток является гомеостатическая пролиферация, которая при значительном своем повышении в условиях Т-лимфопении ведет к конверсии фенотипа Tnaive. Последний феномен заключается в приобретении Tnaive фенотипа Tcm в отсутствие контакта с антигеном. Оценив их соотношение, можно судить о вкладе тимопоэза и гомеостатической пролиферации в процесс восстановления популяций периферических Т-лимфоцитов [1, 2].

Восстановление численности возрастных субпопуляций Т-хелперов проходило с явным преобладанием лимфоцитов с фенотипом Tcm, уровень которых на 60-е сутки после введения препарата почти в 2 раза превышал уровень интактного контроля, тогда как численность наивных Т-хелперов достигла только 69 % от показателя нормальных мышей.

При анализе возрастных субпопуляций ЦТЛ селезенки после введения циклофосфана тенденция к пре-

обладанию лимфоцитов с фенотипом Tcm памяти начинала проследиваться только в конце восстановления численности обеих субпопуляций.

Таким образом, анализ спектра Tnaive и Т-клеток памяти в популяции Т-лимфоцитов регенерирующих лимфоидных органов свидетельствует о высокой эффективности восстановления Т-клеток памяти и неполноценности этого процесса для Tnaive. Однако по всей вероятности значительный (если не основной) вклад в восстановление Т-клеток памяти (по крайней мере их центральной фракции) вносит не их пролиферация, а формирование за счет конверсии фенотипа пролиферирующих Tnaive.

Анализ возрастного фенотипа периферических Т-клеток указывает на существенный вклад гомеостатической пролиферации в восстановление численности как Т-хелперов, так и ЦТЛ, а также на обусловленный этим процессом абсолютный и относительный рост числа клеток с фенотипом Tcm у мышей линии C57BL/6 после однократного введения циклофосфана в терапевтической дозировке.

## Заключение

Подводя итог исследования, можно констатировать, что циклофосфан оказывает выраженное цитотоксическое действие на Т-клеточное звено иммунной системы мышей линии C57BL/6 с преимущественным поражением быстро делящихся популяций тимоцитов. Препарат в меньшей степени затрагивает гемопоэтические стволовые клетки и строму центральных лимфоидных органов – костного мозга и тимуса. Восстановление Т-клеточного звена иммунной системы начинается с центральных лимфоидных органов: нормализации лимфо- и тимопоэза. Однако уровень повреждения периферических Т-клеток оказывается таким глубоким, что восстановившийся к 20-м суткам тимопоэз не способен компенсировать дефицит Т-клеточных популяций как минимум в течение 60 сут после однократного введения циклофосфана. Сохраняющийся дефицит периферических Т-лимфоцитов, в свою очередь, ведет к усилению гомеостатической пролиферации и конверсии фенотипа Tnaive и накоплению Т-хелперов и ЦТЛ с фенотипом Tcm. Клональная экспансия периферических Т-клеток ведет к сужению репертуара Т-клеточных рецепторов, возможному накоплению аутоагрессивных клонов и преждевременному старению иммунной системы, что необходимо учитывать при назначении циклофосфана в терапевтических целях.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Митин А.Н., Марзанова С.Н., Донецкова А.Д.; сбор и обработка материала – Гринько Е.К., Мухина Е.А., Андреева О.С., Шарова Н.И.; анализ цитометрических данных – Литвина М.М.; статистическая обработка – Гринько Е.К., Комогорова В.В.; написание и редактирование текста – Донецкова А.Д.

## ■ Литература

1. Ярилин А.А. Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов. *Иммунология*. 2004; 25 (5): 312–20.
2. Williams K.M., Hakim F.T., Gress R.E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin. Immunol.* 2007; 19 (5): 318–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.004>
3. ten Berge R.J., Schellekens P.T. Immunosuppressive drugs in clinical medicine. *Neth. J. Med.* 1994; 45 (6): 329–38.
4. Ito K., Okamoto M., Inaguma Y. et al. Influence of R-CHOP Therapy on immune system restoration in patients with B-Cell lymphoma. *Oncology*. 2016; 91 (6): 302–10. DOI: <https://doi.org/10.1159/000449251>
5. Frawley R., White K. Jr., Brown R. et al. Gene expression alterations in immune system pathways in the thymus after exposure to immunosuppressive chemicals. *Environ. Health Perspect.* 2011; 119 (3): 371–6. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.1002358>
6. Motoyoshi Y., Kaminoda K., Saitoh O. et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncol. Rep.* 2006; 16 (1): 141–6.
7. Mahajan V.S., Leskov I.B., Chen J.Z. Homeostasis of T cell diversity. *Cell. Mol. Immunol.* 2005; 2 (1): 1–10.
8. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 745–63. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>
9. Boyman O., Letourneau S., Krieg C., Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39 (8): 2088–94. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200939444>
10. Стеценко О.Н., Борзова Н.В., Линднер Д.П., Иванова А.С. Влияние иммуномодулятора полиоксидония на восстановление костного мозга, поврежденного действием гидрокортизона и циклофосфана. *Иммунология*. 2005; 26 (1): 27–32.
11. Artym J., Zimecki M., Kruzal M.L. Reconstitution of the cellular immune response by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice is correlated with renewal of T cell compartment. *Immunobiology*. 2003; 207 (3): 197–205. DOI: <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00233>.
12. Jung J.Y., Shin J.S., Rhee Y.K. et al. In vitro and in vivo immunostimulatory activity of an exopolysaccharide-enriched fraction

from *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Microbiol.* 2015; 118 (3): 739–52. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12742>

13. Feng H., Fan J., Lin L. et al. Immunomodulatory effects of phosphorylated radix cyathulae officinalis polysaccharides in immunosuppressed mice. *Molecules*. 2019; 24 (22): 4150. Published 2019 Nov 15. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24224150>

14. Schiavoni G., Mattei F., Di Pucchio T. et al. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44(hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood*. 2000; 95 (6): 2024–30.

15. Kuwatani M., Ikarashi Y., Mineishi S. et al. An irradiation-free nonmyeloablative bone marrow transplantation model: importance of the balance between donor T-cell number and the intensity of conditioning. *Transplantation*. 2005; 80 (9): 1145–52. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000183289.79693.3d>

16. Ramirez D.A., Collins K.P., Aradi A.E. et al. Kinetics of cyclophosphamide metabolism in humans, dogs, cats, and mice and relationship to cytotoxic activity and pharmacokinetics. *Drug Metab. Dispos.* 2019; 47 (3): 257–68. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.118.083766>

17. Arai Y., Choi U., Corsino C.I. et al. Myeloid conditioning with c-kit-Targeted CAR-T cells enables donor stem cell engraftment. *Mol. Ther.* 2018; 26 (5): 1181–97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.03.003>

18. Milicevic N.M., Milicevic Z. Restriction of regenerative capacity of the rat thymus after the application of cyclophosphamide. *J. Comp. Pathol.* 1984; 94 (3): 425–31.

19. Prakash, Gupta V., Singh S.M. et al. Effect of intrauterine exposure of murine fetus to cyclophosphamide on development of thymus. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2007; 29 (1): 17–30. DOI: <https://doi.org/10.1080/08923970701277635>

20. Лебединская Е.А., Лебединская О.В., Годовалов А.П. и др. Морфологические характеристики индуцированной иммуносупрессии. В сб.: Новые задачи современной медицины : материалы I Международной научной конференции (г. Пермь, январь 2012 г.). Пермь : Меркурий, 2012: 63–7.

21. Huyen X.H., Lin Y.P., Gao T. et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *Int. Immunopharmacol.* 2011; 11 (9): 1293–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.04.011>

## ■ References

1. Yarinlin A.A. Homeostatic processes in the immune system. Control of lymphocyte population. *Immunologiya*. 2004; 25 (5): 312–20. (in Russian)
2. Williams K.M., Hakim F.T., Gress R.E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin. Immunol.* 2007; 19 (5): 318–30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.004>
3. ten Berge R.J., Schellekens P.T. Immunosuppressive drugs in clinical medicine. *Neth. J. Med.* 1994; 45 (6): 329–38.
4. Ito K., Okamoto M., Inaguma Y. et al. Influence of R-CHOP Therapy on immune system restoration in patients with B-Cell lymphoma. *Oncology*. 2016; 91 (6): 302–10. DOI: <https://doi.org/10.1159/000449251>
5. Frawley R., White K. Jr., Brown R. et al. Gene expression alterations in immune system pathways in the thymus after exposure to immunosuppressive chemicals. *Environ. Health Perspect.* 2011; 119 (3): 371–6. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.1002358>
6. Motoyoshi Y., Kaminoda K., Saitoh O. et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide. *Oncol. Rep.* 2006; 16 (1): 141–6.
7. Mahajan V.S., Leskov I.B., Chen J.Z. Homeostasis of T cell diversity. *Cell. Mol. Immunol.* 2005; 2 (1): 1–10.
8. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 745–63. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>
9. Boyman O., Letourneau S., Krieg C., Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39 (8): 2088–94. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200939444>
10. Stetsenko O.N., Borzova N.V., Lindner D.P., Ivanova A.S. The effect of the immunomodulator polyoxidonium on the bone mar-

row restoration damaged by the action of hydrocortisone and cyclophosphamide. *Immunologiya*. 2005; 26 (1): 27–32. (in Russian)

11. Artym J., Zimecki M., Kruzal M.L. Reconstitution of the cellular immune response by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice is correlated with renewal of T cell compartment. *Immunobiology*. 2003; 207 (3): 197–205. DOI: <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00233>.

12. Jung J.Y., Shin J.S., Rhee Y.K., et al. In vitro and in vivo immunostimulatory activity of an exopolysaccharide-enriched fraction from *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Microbiol.* 2015; 118 (3): 739–52. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.12742>

13. Feng H., Fan J., Lin L. et al. Immunomodulatory effects of phosphorylated radix cyathulae officinalis polysaccharides in immunosuppressed mice. *Molecules*. 2019; 24 (22): 4150. Published 2019 Nov 15. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24224150>

14. Schiavoni G., Mattei F., Di Pucchio T. et al. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44(hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood*. 2000; 95 (6): 2024–30.

15. Kuwatani M., Ikarashi Y., Mineishi S. et al. An irradiation-free nonmyeloablative bone marrow transplantation model: importance of the balance between donor T-cell number and the intensity of conditioning. *Transplantation*. 2005; 80 (9): 1145–52. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000183289.79693.3d>

16. Ramirez D.A., Collins K.P., Aradi A.E., et al. Kinetics of cyclophosphamide metabolism in humans, dogs, cats, and mice and relationship to cytotoxic activity and pharmacokinetics. *Drug Metab. Dispos.* 2019; 47 (3): 257–68. DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.118.083766>

17. Arai Y., Choi U., Corsino C.I., et al. Myeloid conditioning with c-kit-Targeted CAR-T cells enables donor stem cell engraft-

ment. Mol. Ther. 2018; 26 (5): 1181–97. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.03.003>

18. Milicevic N.M., Milicevic Z. Restriction of regenerative capacity of the rat thymus after the application of cyclophosphamide. J. Comp. Pathol. 1984; 94 (3): 425–31.

19. Prakash, Gupta V., Singh S.M., et al. Effect of intrauterine exposure of murine fetus to cyclophosphamide on development of thymus. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2007; 29 (1): 17–30. DOI: <https://doi.org/10.1080/08923970701277635>

## Сведения об авторах

**Гринько Екатерина Константиновна** – студентка ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Российская Федерация; e-mail: [virys.s@yandex.ru](mailto:virys.s@yandex.ru), <http://orcid.org/0000-0002-2771-4535>

**Донецкова Альмира Дмитриевна** – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, профессор кафедры иммунологии ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России; Москва, Российская Федерация; e-mail: [almira\\_donetskova@yahoo.com](mailto:almira_donetskova@yahoo.com), <http://orcid.org/0000-0003-2465-2444>

**Мухина Елена Александровна** – научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [mukhina\\_mnioi@mail.ru](mailto:mukhina_mnioi@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-4197-9492>

**Андреева Ольга Сергеевна** – научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [helgaa1997@gmail.com](mailto:helgaa1997@gmail.com), <http://orcid.org/0000-0001-8912-9393>

**Шарова Нина Ивановна** – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [ni\\_sharova@mail.ru](mailto:ni_sharova@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-6774-961X>

**Комогорова Виктория Вячеславовна** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [polbor@inbox.ru](mailto:polbor@inbox.ru), <http://orcid.org/0000-0002-3460-7981>

**Литвина Марина Михайловна** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [litvina@inbox.ru](mailto:litvina@inbox.ru), <http://orcid.org/0000-0003-3766-9843>

**Марзанова Саида Нурбиевна** – к.б.н., доцент кафедры иммунологии и биотехнологии ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина; Москва, Российская Федерация; e-mail: [s.marzanova@mail.ru](mailto:s.marzanova@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0001-9895-8046>

**Митин Александр Николаевич** – к.м.н., заведующий лабораторией дифференцировки лимфоцитов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [mitin@inbox.ru](mailto:mitin@inbox.ru), <http://orcid.org/0000-0003-1333-0757>

20. Lebedinskaya E.A., Lebedinskaya O.V., Godovalov A.P., et al. Morphological characteristics of induced immunosuppression. In collection: New Tasks of Modern Medicine: Materials of the I International Scientific Conference (Perm, January 2012). Perm: Merkuriy, 2012: 63–7. (in Russian)

21. Huyan X.H., Lin Y.P., Gao T., et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. Int. Immunopharmacol. 2011; 11 (9): 1293–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.04.011>

## Authors' information

**Ekaterina K. Grinko** – student MSAVM&B – MVA named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation; e-mail: [virys.s@yandex.ru](mailto:virys.s@yandex.ru), <http://orcid.org/0000-0002-2771-4535>

**Almira D. Donetskova** – MD, Leader Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia; Prof. of Immunology Department of N.I. Pirogov RNRMU MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [almira\\_donetskova@yahoo.com](mailto:almira_donetskova@yahoo.com), <http://orcid.org/0000-0003-2465-2444>

**Elena A. Mukhina** – Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [mukhina\\_mnioi@mail.ru](mailto:mukhina_mnioi@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-4197-9492>

**Olga S. Andreeva** – Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [helgaa1997@gmail.com](mailto:helgaa1997@gmail.com), <http://orcid.org/0000-0001-8912-9393>

**Nina I. Sharova** – PhD, Leader Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [ni\\_sharova@mail.ru](mailto:ni_sharova@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-6774-Russian Federation>

**Viktoriya V. Komogorova** – PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [polbor@inbox.ru](mailto:polbor@inbox.ru), <http://orcid.org/0000-0002-3460-7981>

**Marina M. Litvina** – PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [litvina@inbox.ru](mailto:litvina@inbox.ru), <http://orcid.org/0000-0003-3766-9843>

**Saida N. Marzanova** – PhD, Associate Prof. of Immunology and Biotechnology Department, MSAVM&B – MVA named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation; e-mail: [s.marzanova@mail.ru](mailto:s.marzanova@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0001-9895-8046>

**Alexander N. Mitin** – PhD, Head of the Laboratory of Lymphocyte Differentiation of NRC – Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [mitin@inbox.ru](mailto:mitin@inbox.ru), <http://orcid.org/0000-0003-1333-0757>

© Коллектив авторов, 2020

Милешина С.Е.<sup>1,2</sup>, Николин А.А.<sup>1,2</sup>, Козлов И.Г.<sup>1,3,4</sup>

## Влияние коллагеновых матрикинов на функциональное состояние лейкоцитов человека

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет им. И. Канта» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 236041, г. Калининград, Российская Федерация

<sup>4</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127994, г. Москва, Российская Федерация

### Резюме

**Введение.** Матрикины – биологически активные соединения, образующиеся при частичном протеолизе белков и гликозаминогликанов внеклеточного матрикса, действуют как эндогенные регуляторы многих физиологических и патологических процессов организма. Полученные из коллагеновых белков матрикины (КМ) усиливают пролиферацию клеток соединительной ткани, стимулируют их адгезию, миграцию и синтез различных компонентов экстраклеточного матрикса, цитокинов и ростовых факторов. КМ регулируют тонус и проницаемость сосудов, участвуют в белок-белковых взаимодействиях, изменяющих функции других молекул, способствуют регенерации нервной ткани. Однако воздействие КМ в отношении клеток иммунной системы изучено далеко не полностью.

**Цель исследования** – комплексная оценка действия низкомолекулярных КМ на функциональную активность лейкоцитов периферической крови человека.

**Материал и методы.** Фракцию низкомолекулярных КМ (мол. масса <10 кДа) получали гидролизом коллагенового матрикса бактериальной коллагеназой. В зависимости от метода исследования изучение действия КМ проводили либо в цельной гепаринизированной венозной крови, либо во фракции нейтрофилов, выделенных из крови здоровых доноров. Оценивали влияние КМ на поглотительную и переваривающую функции лейкоцитов, а также на продукцию ими активных форм кислорода.

**Результаты.** Получены данные, что КМ способны изменять эффекторные функции фагоцитов: хотя пептиды и не повышают поглотительную способность клеток, они стимулируют их бактерицидную и синтетическую активность. Эффективность КМ зависит от их концентрации: максимальный эффект наблюдался при низких и средних концентрациях КМ (10–100 мкг/мл) и нивелировался при максимальной концентрации КМ (1000 мкг/мл).

**Заключение.** Таким образом, КМ проявляют иммунорегуляторную активность в отношении клеток врожденного иммунитета.

**Ключевые слова:** коллагеновые матрикины; лейкоциты; фагоциты; синтез активных форм кислорода; бактерицидные функции; поглотительная способность

Статья получена 13.05.2020. Принята к печати 16.06.2020.

**Для цитирования:** Милешина С.Е., Николин А.А., Козлов И.Г. Влияние коллагеновых матрикинов на функциональное состояние лейкоцитов человека. Иммунология. 2020; 41 (4): 295–303. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-295-303>

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции  
Козлов Иван Генрихович –  
доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий лабораторией  
экспериментальной  
и клинической фармакологии  
ФГБУ НМИИ ДГОИ  
им. Дмитрия Рогачева  
Минздрава России,  
Москва, Российская Федерация  
E-mail: [immunopharmacology@yandex.ru](mailto:immunopharmacology@yandex.ru)  
<https://orcid.org/0000-0002-9694-5687>

Mileshina S.E.<sup>1,2</sup>, Nikolin A.A.<sup>1,2</sup>, Kozlov I.G.<sup>1,3,4</sup>

## Effect of collagen matrikines on the functional state of human leukocytes

<sup>1</sup> Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 236041, Kaliningrad, Russian Federation

<sup>4</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of the Russian Federation, 127994, Moscow, Russian Federation

## Abstract

**Introduction.** Matrikines – biologically active compounds formed during partial proteolysis of proteins and glycosaminoglycans of the extracellular matrix, act as endogenous regulators of many physiological and pathological processes of the body. Matrikines obtained from collagen proteins (CM) enhance the proliferation of connective tissue cells, stimulate their adhesion, migration and synthesis of various components of the extracellular matrix, cytokines and growth factors. CM regulate vascular tone and permeability, participate in protein-protein interactions that change the functions of other molecules, and contribute to the regeneration of nervous tissue. However, the effects of CM on immune system cells have not been fully studied.

**The aim** of this study was a comprehensive assessment of the effect of low-molecular weight CM on the functional activity of human peripheral blood leukocytes.

**Material and methods.** The fraction of low-molecular weight CM (Mw <10 kDa) was obtained by hydrolysis of the collagen matrix with bacterial collagenase. Depending on the method of investigation, the study of the effect of CM was performed either in whole heparinized venous blood, or in the fraction of neutrophils isolated from the blood of healthy donors. The effect of CM on the absorption and digesting functions of white blood cells, as well as their production of reactive oxygen species, was been evaluated.

**Results.** There has been evidence that CM are able to change the effector functions of phagocytes: although peptides do not increase the absorption capacity of phagocytes, they stimulate their bactericidal and synthetic activity. The effectiveness of CM depends on their concentration: the maximum effect was observed at low and medium concentrations of CM (10–100 mcg/ml) and was leveled at the maximum concentration of CM (1000 mcg/ml).

**Conclusion.** Thus, CM exhibit immunoregulatory activity against innate immune cells.

**Keywords:** collagen matrikines; leukocytes; phagocytes; synthesis of reactive oxygen species; bactericidal functions; absorption capacity

Received 13.05.2020. Accepted 16.06.2020.

**For citation:** Mileshina S.E., Nikolin A.A., Kozlov I.G. Effect of collagen matrikines on the functional state of human leukocytes. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 295–303. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-295-303> (in Russian)

**Funding.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

## Введение

Наряду с гормонами, цитокинами и нейропептидами в организме существует еще один тип регуляторных молекул – матрикины, которые образуются при деградации структурных компонентов экстраклеточного матрикса. По своей природе это низкомолекулярные пептиды или гликопептиды, способные оказывать влияние на функции клеток практически всех гистотипов. Матрикины воздействуют на клетки даже в очень низких концентрациях; в силу своего малого размера обладают высоким потенциалом распределения по тканям; проявляют устойчивость к действию тканевых протеаз.

Образование матрикинов происходит при естественном обновлении экстраклеточного матрикса [1]. При повреждении ткани их концентрация существенно нарастает [2, 3]. Действие матрикинов на клетки высокоспецифично, опосредуется через связывание с опреде-

ленными рецепторами, наиболее известные из которых относятся к семейству интегринов [4]. Они способны регулировать миграцию [1, 2], пролиферацию, апоптоз клеток, синтез компонентов экстраклеточного матрикса [4, 5], а также других регуляторных молекул и протеаз. За счет этого матрикины принимают участие в нормальных и патологических процессах [1, 3, 5, 6].

Основными структурными компонентами экстраклеточного матрикса являются коллагеновые белки, и именно они – наиболее вероятный источник образования регуляторных пептидов. Во многих исследованиях были получены доказательства участия коллагеновых матрикинов (КМ) как в нормальных физиологических процессах, так в патологических реакциях организма, таких как патологическое заживление ран, фиброз, воспаление и опухолевая инвазия. Для многих КМ установлены химическая структура, биологичес-

## For correspondence

Ivan G. Kozlov –  
Head of the Laboratory  
of Experimental and Clinical  
Pharmacology,  
Dmitry Rogachev National  
Medical Research Center  
of Pediatric Hematology, Oncology  
and Immunology,  
Ministry of Health  
of the Russian Federation,  
Moscow, Russian Federation

E-mail: [immunopharmacology@yandex.ru](mailto:immunopharmacology@yandex.ru)  
<https://orcid.org/0000-0002-9694-5687>

кие функции, определены рецепторы и сигнальные пути [7], через которые они участвуют в регуляции клеточной активности. Так, например, хорошо изучен и успешно применяется в медицине полученный из коллагена I типа медь-содержащий трипептид (ГНК- $\text{Cu}^{2+}$ ). Он участвует в регуляции ремоделирования дермы на поврежденном участке: стимулирует синтез коллагена и гликозаминогликанов фибробластами, усиливает пролиферацию базальных эпителиальных клеток, экспрессию интегринов кератиноцитами [8], активирует пролиферацию фибробластов [9, 10], индуцирует последовательно синтез MMP-2 и MMP-9 [11]. Этот матрикин используется в дерматологии и косметологии аппликационно в месте повреждения кожи, ускоряя ее заживление и препятствуя формированию келоидного рубца. Также были получены данные, что ГНК- $\text{Cu}^{2+}$  является хемоаттрактантом для моноцитов/макрофагов и тучных клеток [11], поддерживает регенерацию нервной ткани [14], стимулирует ангиогенез [11], митотическую активность гепатоцитов [13] и нейронов [12, 14]. Другой коллагеновый пентапептид КТТКС, представляющий собой фрагмент проколлагена I, стимулирует выработку коллагенов I, III и VI типов, фибронектина, эластина и гликозаминогликана [15, 16]. ГНК и КТТКС широко применяются в дерматологии для замедления проявлений возрастных изменений кожи [17].

Трипептид RGD (Arg-Gly-Asp), образующийся при протеолизе матричных белков (коллагенов, ламининов, фибронектина), белков плазмы крови (витронектина и фибриногена) и белков, синтезируемых в месте повреждения тканей (остеопонтина и тенасцина) [18], также обладает значительным регуляторным потенциалом. Матрикины, содержащие в составе последовательность RGD, усиливают адгезию клеток к матриксу (фибробласты, кератиноциты, хондроциты, эпителиоциты, тромбоциты, эндотелиоциты, клетки островков Лангерганса и др.) [18, 19], активируют клеточную пролиферацию и дифференцировку (мегакариоциты, эндотелиоциты), регулируют тонус сосудов [19, 20], ингибируют синтез провоспалительных цитокинов фагоцитирующими клетками [18, 21], активируют нейтрофилы [21]. Лекарственный препарат, содержащий RGD-мотив (эпitifибатит) активно используют в качестве антиагрегантного средства при остром коронарном синдроме и при проведении чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики из-за его способности быстро и эффективно блокировать GpIIb/IIIa-рецепторы тромбоцитов [22]. В настоящее время разрабатываются различные подходы в терапии онкологических заболеваний, где RGD-мотив используется в качестве посредника, прицельно доставляющего цитостатики и другие антибластомные средства в опухолевую ткань [23, 24]. Кроме того, RGD-пептиды используют для создания интегрин-таргетных диагностических молекулярных зондов для визуализации первичных опухолей и метастазов [25].

Пептиды GPR из коллагенов I–III типов и KPGEPK из коллагена III типа, вступая во взаимодействие с фиб-

рином, ингибируют его полимеризацию [26], в то время как матрикины PGP, PG и WP блокируют формирование тромбинового комплекса [27].

Отдельные КМ оказывают значительные эффекты и на лейкоцитарное звено. Матрикины PGP [3, 6, 28], (PPG)<sub>5</sub> и (PHурG)<sub>5</sub> [29] являются хемоаттрактантами для нейтрофилов. PGP усиливает выработку нейтрофилами супероксида, МР-9 и ИЛ-8, высвобождение провоспалительного медиатора эндотелина-1 из эндотелиальных клеток [6, 30]. Пептиды (PPG)<sub>5</sub> и (PHурG)<sub>5</sub> способны активировать в нейтрофилах синтез свободных радикалов и блокировать их апоптоз, а также они обладают активностью в отношении моноцитов/макрофагов: индуцируют их хемотаксис и продукцию свободных радикалов, протеолитических ферментов и синтез нейтрофильных хемоаттрактантов [21, 29, 31].

**Целью** настоящего исследования было комплексное изучение влияния низкомолекулярных КМ на функционирование лейкоцитов периферической крови человека.

## Материал и методы

Методы исследования выбирали в соответствии с рекомендациями, приведенными в руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств [32].

**Получение препарата низкомолекулярных КМ.** В работе изучали эффекты фракции низкомолекулярных пептидов, полученных ферментативной деградацией коллагена I типа. Источником коллагена I типа служили хвостовые сухожилия лабораторных беспородных крыс. Сухожилия экстрагировали в 100-кратном объеме 0,3 % уксусной кислоты, центрифугировали для удаления оставшихся фрагментов, собранную надосадочную жидкость нейтрализовали гидроксидом натрия до pH 7,2 и диализовали против двух смен 1,2 М хлорида натрия. Коллаген высаливали в градиенте хлорида натрия (2,0–2,5 М), осадок собирали центрифугированием, отмывали дистиллированной водой и перерастворяли в 0,3 % растворе уксусной кислоты. Раствор коллагена стерилизовали центрифугированием (20 часов, 1700 об/мин). Концентрацию коллагена в растворе определяли спектрофотометрически с помощью специфического окрашивания оксипролина реактивом Эрлиха [33].

Для получения препарата КМ из раствора коллагена формировали матрикс путем повышения ионной силы и pH раствора. Матрикс механически разрушали, коллагеновые фибриллы собирали центрифугированием, двукратно отмывали раствором Хенкса и проводили гидролиз осадка (24 часа, 37 °C) очищенной бактериальной коллагеназой (кlostридиопептидаза А, соотношение фермент : субстрат – 1:20). Гидролизат центрифугировали, отбирали супернатант и помещали в пробирки для ультрафильтрации (Millipore, диаметр пор 10 кДа). Центрифугировали (25 мин, 4000 об/мин), отбирали фракцию с молекулярной массой ниже 10 кДа и стерилизовали фильтрованием через фильтры с диаметром пор

0,2 мкм. Концентрацию КМ определяли спектрофотометрически по оксипролину [33]. Препарат ампулировали и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Выделение нейтрофилов периферической крови человека.** Образцы крови для исследования были получены из отделения трансфузиологии НМИЦ «ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России после предварительного тестирования в соответствии с протоколом заготовки препаратов донорской крови. Нейтрофилы выделяли из крови в стерильных условиях стандартным методом, используя двойной градиент плотности [34]. Для этого венозную гепаринизированную кровь, разведенную 1:2 раствором Хенкса, настилали на градиент плотности: нижний слой – плотность  $1,119 \text{ г/см}^3$ , верхний – плотность  $1,077 \text{ г/см}^3$  и центрифугировали в горизонтальном роторе 30 мин, 400g. Полученную на границе фаз фракцию нейтрофилов дважды отмывали центрифугированием в растворе Хенкса (10 мин, 200g), а затем переносили в среду RPMI 1640. Количество выделенных нейтрофилов подсчитывали в камере Горяева по стандартной методике.

**Исследование поглотительной активности лейкоцитов.** Количественную оценку поглотительной активности фагоцитов крови проводили методом проточной лазерной цитометрии, используя в качестве агента для фагоцитоза стафилококк, меченный флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) [35, 36]. На первом этапе производили мечение бактерий ФИТЦ: суточную культуру *Staphylococcus aureus*, штамм *Cowan I* (ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Россия) стерилизовали, осаждали центрифугированием 25 мин, 1000g, отмывали  $0,1 \text{ M}$  карбонатно-бикарбонатным буфером pH 9,5, и концентрацию бактерий доводили по стандарту мутности до  $2 \cdot 10^8/\text{мл}$ , а затем инкубировали с ФИТЦ (50 мкг на  $1 \cdot 10^8$  бактерий). Не связавшуюся с микроорганизмами флуоресцентную метку отмывали центрифугированием в фосфатно-солевом буфере (1000g, 10 мин). ФИТЦ-*S. aureus* аликвотировали и хранили при  $-50^{\circ}\text{C}$ .

Реакцию поглощения лейкоцитами ФИТЦ-*S. aureus* ставили в цельной гепаринизированной крови: к меченому стафилококку ( $2 \cdot 10^8/\text{мл}$ ), добавляли кровь и КМ в концентрациях 1–1000 мкг/мл (в контрольные образцы добавляли раствор Хенкса). После инкубации (30 мин,  $37^{\circ}\text{C}$  и 5 %  $\text{CO}_2$ ) проводили лизис эритроцитов в течение 10 мин., далее дважды центрифугировали клетки (250g, 5 мин) в отмывочном растворе, а затем фиксировали осадок в фиксирующем растворе (все растворы были получены от BD Biosciences, Бельгия). Сбор клеток и обработку полученных результатов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США) с программным обеспечением СХР. Настройки цитометра: на диаграмме прямого и бокового светорассеивания размещались три облака: нейтрофилы, моноциты и лимфоциты. Соответственно облакам нейтрофилов и моноцитов выводились гистограммы флуоресценции, настроенные на ФИТЦ. Усиление устанавливалось таким образом, чтобы пики нефлуоресцирующих ( $M_1$ ) и флуоресцирующих ( $M_2$ ) фагоцитов находились по

разные стороны от 100-канала. При оценке действия КМ на поглотительную активность фагоцитов сравнивали в опытных и контрольных (без добавления КМ) образцах количество флуоресцирующих клеток к общему числу нейтрофилов или моноцитов.

**Исследование эффективности фагоцитоза.** Оценка поглотительной и переваривающей способности фагоцитов проводили в цельной венозной крови, используя модификацию классического микробиологического метода [33]. Реакцию поглощения проводили так же, как было описано выше, используя в качестве агента для фагоцитоза живую суточную культуру *Staphylococcus aureus*, штамм *Cowan I*. Время инкубации клеток со стафилококком составляло 30 и 60 мин. КМ добавляли в пробы в концентрациях 1–1000 мкг/мл, а в контроль – эквивалентные объемы раствора Хенкса. По истечении времени культивирования пробы центрифугировали (10 мин, 200g,  $4^{\circ}\text{C}$ ), собирали осадок и готовили мазки на обезжиренных предметных стеклах. Препараты высушивали при комнатной температуре, фиксировали 10 мин в смеси Никифорова и затем окрашивали в течение 30 мин по методу Романовского-Гимза. Результаты учитывали микроскопически при увеличении  $90 \times 10$ , подсчитывая такие параметры, как фагоцитарный индекс (ФИ, количество фагоцитировавших клеток из 100 подсчитанных нейтрофилов) и фагоцитарное число (ФЧ, среднее число микроорганизмов, поглощенных одним нейтрофилом). Для оценки бактерицидной функции фагоцитов определяли показатель завершенности фагоцитоза (ПЗФ) по формуле:

$$\text{ПЗФ} = \frac{\text{общее количество переваренных микроорганизмов}}{\text{общее количество поглощенных микроорганизмов}}$$

При оценке действия пептидов сравнивали данные показатели в пробах, обработанных КМ, и в контроле.

**Исследование продукции активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами и моноцитами.** В работе использовали стандартный метод хемилюминесценции (ХЛ) с 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазидионом (люминол). В качестве индуктора ХЛ использовали зимозан А, предварительно опсонизированный сывороткой крови человека (25 мг зимозана, 1,25 мл раствора Хенкса и 1,25 мл сыворотки,  $37^{\circ}\text{C}$ , 30 мин). После опсонизации зимозан трижды отмывали раствором Хенкса центрифугированием (10 мин, 300g).

Цельную гепаринизированную кровь инкубировали (60 мин,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) в присутствии КМ в концентрациях от 1 до 1000 мкг/мл (контроль – раствор Хенкса). Для измерения ХЛ использовали хемилюминометр CLM-3 (AD Instruments, Австралия), оценивая сначала уровень спонтанного свечения клеток, а затем уровень активированной ХЛ (добавляли зимозан А до  $0,56 \text{ мг/мл}$ ), которую фиксировали в течение 5–8 мин. Кинетику ответа клеток регистрировали и обрабатывали с помощью рабочей станции MacLab (AD Instruments, Австралия: Macintosh LC 475+MacLab/2E+Chart V 3.4.1). При ана-

лизе кривых ХЛ использовали два основных параметра: максимум интенсивности спонтанной ХЛ и амплитуда интенсивности, активированной зимозаном ХЛ (max активированной ХЛ – среднее спонтанной ХЛ).

Для оценки действия КМ на продукцию клетками АФК сравнивали максимумы интенсивности спонтанной ХЛ и амплитуды интенсивности, активированной ХЛ в контроле и при обработке КМ. Результат выражали в процентах от контроля.

**Статистическая обработка результатов.** Характер вариабельности результатов экспериментов подчинялся законам нормального распределения. Статистическую обработку результатов экспериментальных данных проводили с помощью пакета анализа данных программного обеспечения «Microsoft Excel» путем расчета средней арифметической ( $M$ ) и средней ошибки средней арифметической ( $m$ ). Для оценки достоверности выявленных различий средних арифметических в группах использовали  $t$ -критерий Стьюдента, разницу считали достоверной при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Оценку регуляторного потенциала КМ в отношении лейкоцитов человека начали с изучения их влияния на поглощательную способность клеток. В предварительных экспериментах было установлено, что период полного поглощения ФИТЦ-*S. aureus* интактными лейкоцитами составляет 30 мин, и это время было выбрано для данного этапа работы. К сожалению, такие условия эксперимента не позволили выявить отличия в ФЧ нейтрофилов и макрофагов в присутствии всех исследуемых концентраций КМ по сравнению с контролем ( $80,0 \pm 4,0$  % vs.  $74,3 \pm 3,6$  %, соответственно). В связи с этим время инкубации лейкоцитов с ФИТЦ-*S. aureus* было увеличено до 3 ч. Однако это не привело ни к увеличению ФЧ в контроле, ни к различиям в опытных и контрольных образцах по этому показателю. Таким образом, единственный вывод из этого этапа исследований заключается в том, что КМ не блокируют фагоцитоз микроорганизмов макрофагами и нейтрофилами периферической крови человека.

На следующем этапе работы было решено исследовать действие КМ на эффективность фагоцитоза, используя хорошо зарекомендовавший себя в клинической практике рутинный метод иммерсионной микроскопии мазков цельной крови, окрашенных по методу Романовского-Гимза, после предварительной инкубации клеток с различными концентрациями КМ (опыт) или в их отсутствии (контроль). Оценивали ФИ, ФЧ и ПЗФ.

Были получены данные, подтверждающие результаты проточной лазерной цитометрии: добавление КМ в образцы, независимо от их концентрации, не приводило к изменению числа фагоцитирующих клеток по сравнению с контролем. Так, после 30-минутной инкубации с бактериями, ФИ в среднем составлял  $83,6 \pm 3,4$  %, а после 60-минутной инкубации –  $88,2 \pm 5,3$  %.

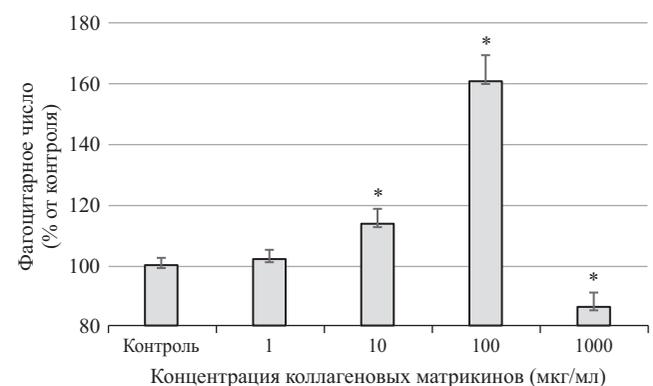
Однако при исследовании качественных характеристик фагоцитоза были получены интересные данные: КМ существенно повышали эффективность фагоцитоза

лейкоцитов, и при этом прослеживался четкий дозозависимый эффект. В 30-минутных образцах, содержащих 1 мкг/мл КМ, ФЧ было сравнимо с контрольным значением. В средних концентрациях (10–100 мкг/мл) КМ значительно усиливали фагоцитарную активность клеток, причем доза КМ в 100 мкг/мл давала наиболее выраженный эффект: ФЧ составляло  $160,8 \pm 8,6$  % от контроля ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). При использовании максимальной дозы КМ (1000 мкг/мл) наблюдалось ингибирование фагоцитарной активности клеток.

Те же изменения наблюдались и при 60-минутной инкубации. Уже при добавлении КМ в концентрации 1 мкг/мл наблюдалось усиление бактерицидной активности нейтрофилов и моноцитов: ПЗФ при этой дозе КМ составлял  $40,6 \pm 0,8$  % ( $p < 0,05$ ), превышая, таким образом, показатели в контрольных образцах почти в 2 раза (рис. 2). Увеличение концентрации пептидов приводило к еще большему увеличению показателя ПЗФ и достигало максимума при дозе КМ в 100 мкг/мл ( $74,8 \pm 1,8$  %,  $p < 0,05$ ). В дозе 1000 мкг/мл КМ ингибировали бактерицидную функцию фагоцитов (рис. 2).

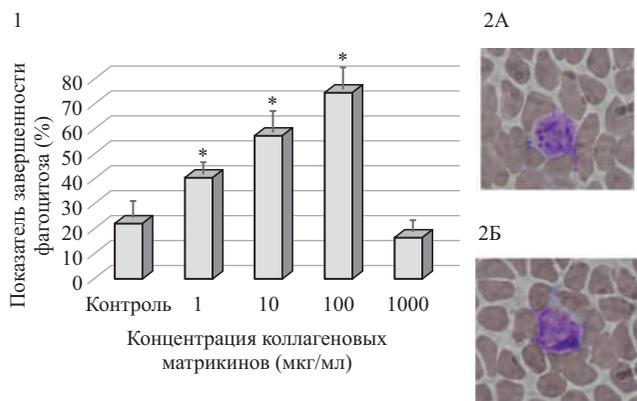
При иммерсионной микроскопии мазков хорошо видно, что воздействие КМ усиливает бактерицидную активность лейкоцитов. В присутствии КМ в низких и средних концентрациях (1–100 мкг/мл) по сравнению с контрольными образцами в клетках наблюдается больше разрушенных бактерий, которые имеют маленькие размеры и окрашены в розовый цвет (см. рис. 2). При добавлении КМ в максимальной концентрации микроскопическая картина аналогична таковой в контрольных образцах: преобладают целые бактерии фиолетового цвета.

Механизмом усиления бактерицидной функции фагоцитов может быть активация синтеза в клетках актив-



**Рис. 1.** Зависимость поглощательной активности лейкоцитов периферической крови человека от присутствия коллагеновых матрикинов

Реакция поглощения лейкоцитами *S. aureus* в цельной гепаринизированной крови здоровых доноров (30 мин, 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>) в присутствии различных концентраций КМ (1–1000 мкг/мл) по сравнению с контролем (эквивалентные объемы раствора Хенкса). В иммерсионной системе подсчитывали фагоцитарное число (в контроле принято за 100%). Звездочки указывают на достоверные различия ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента).

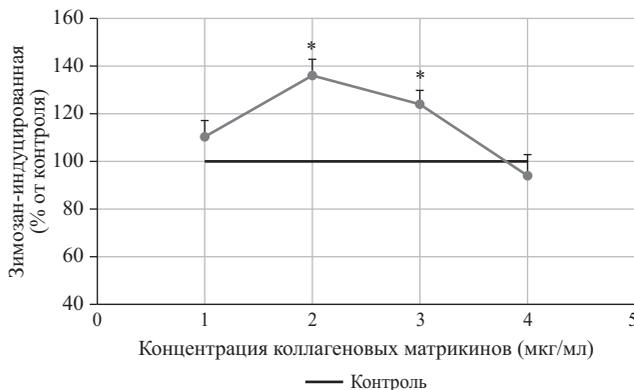


**Рис. 2.** Влияние коллагеновых матрикинов на завершенность фагоцитоза лейкоцитов периферической крови человека

Реакция поглощения лейкоцитами живого *S. aureus* (суточная культура) в цельной гепаринизированной крови здоровых доноров (60 мин, 37 °С и 5 %  $CO_2$ ) в присутствии разных концентраций КМ 1–1000 мкг/мл по сравнению с контролем (эквивалентные объемы раствора Хенкса).

1. Показатель завершенности фагоцитоза при иммерсионной микроскопии мазков (увеличение  $90\times 10$ , окраска по Граму). Звездочки указывают на достоверные различия ( $p < 0,05$ , *t*-критерий Стьюдента).

2. Иммерсионная микроскопия мазков периферической крови человека после 60 мин инкубации (увеличение  $90\times 10$ , окраска по Граму): А – без КМ; Б – в присутствии КМ (100 мкг/мл).



**Рис. 3.** Изменение интенсивности активированной хемилюминесценции под действием коллагеновых матрикинов

Сравнение хемилюминесценции лейкоцитов цельной гепаринизированной крови (здоровые доноры), преинкубированных (1 ч, 37 °С, 5 %  $CO_2$ ) с различными концентрациями КМ и активированных зимозаном А, с контролем (раствор Хенкса). Показатель хемилюминесценции в контроле принят за 100 %. Звездочки указывают на достоверные различия ( $p < 0,05$ , *t*-критерий Стьюдента).

По оси абсцисс: концентрации коллагеновых матрикинов (мкг/мл): 1 – 1 мкг/мл; 2 – 10 мкг/мл; 3 – 100 мкг/мл; 4 – 1000 мкг/мл.

По оси ординат: интенсивность хемилюминесценции.

ных форм кислорода. Для проверки этого предположения мы провели ряд опытов, направленных на изучение влияния КМ на уровень продукции свободных радикалов в лейкоцитах периферической крови человека. В исследовании использовали метод люминол-зависимой хемилюминесценции: сравнивали уровень спонтанной и активированной зимозаном А ХЛ в образцах, преинкубированных с различными концентрациями КМ (1–1000 мкг/мл), с контролем (раствор Хенкса). Результаты выражали в процентах.

Уровень спонтанной ХЛ в контрольных образцах достигал плато через 4–5 мин и составлял в среднем  $3,0 \pm 1,4$  мВ. Ни одна из добавленных доз КМ не приводила к изменению интенсивности спонтанной ХЛ по сравнению с контролем ( $p > 0,05$ ).

При измерении зимозан-индуцированной ХЛ эффект зависел от дозы добавленных пептидов: в дозе 1 мкг/мл КМ амплитуда ХЛ не отличалась от контрольных значений (в среднем 310 мВ,  $p > 0,05$ ), в дозе 10 и 100 мкг/мл КМ выражено увеличивали амплитуду ХЛ ( $135,7 \pm 7,1$  и  $124,0 \pm 6,0$  % от уровня контроля, соответственно,  $p < 0,05$ ), а в дозе КМ 1000 мкг/мл опять наблюдалось снижение показателей ХЛ, сравнимое с контрольными значениями (рис. 3).

## Обсуждение

Коллагеновые белки I типа – одни из самых распространенных в организме – они выявляются практически во всех тканях в качестве основы экстраклеточного матрикса. В некоторых тканях их количество достигает 100 мг на 1 г ткани. Коллагены I типа очень стабильны и имеют период «жизни» более 100 суток. Катаболизм этих белков в физиологических условиях осуществляется внутриклеточно, где они расщепляются до отдельных аминокислот, причем большинство из них реутилизируются в реакциях синтеза белка, а две маркерные аминокислоты (оксипролин и оксализин) выводятся из организма с мочой [28].

В условиях воспалительной патологии (инфекции, травмы и др.) в силу быстрой тканевой деструкции разрушение коллагенов I типа идет в основном экстраклеточно с привлечением свободных радикалов, а также целого ряда протеиназ как самого хозяина, так и микроорганизмов. Этот протеолиз происходит не полностью и сопровождается накоплением фрагментов коллагена в очаге патологического процесса с их последующим попаданием в системный кровоток [2, 28].

Учитывая широкий функциональный потенциал коллагена как основного белка экстраклеточного матрикса, естественно было предположить, что его фрагменты также могут обладать разнообразной активностью в отношении клеток многих гистотипов. Это предположение сегодня имеет достаточное экспериментальное подтверждение, а физиологически активные пептиды получили название «матрикины» [1, 5].

В данной работе было изучено влияние КМ на параметры фагоцитоза нейтрофилов и макрофагов периферической крови человека, т.е. на клетки врожденного

иммунитета, находящиеся на первой линии иммуновоспалительной реакции и осуществляющие основные эффекторные функции. В качестве КМ использовали смесь пептидов коллагена I типа, полученную избыточным протеолизом этого белка высокоочищенной клостридиопептидазой А. Известно, что этот фермент расщепляет коллаген до коротких пептидов из 3–8 аминокислот, которые вполне могут сохранять биологическую активность. КМ исследовали в конечных дозировках от 1 до 1000 мг/мл.

Даже в самой высокой дозе КМ не снижали количество фагоцитирующих клеток обеих популяций. Увеличение данного показателя во всем исследованном диапазоне концентраций КМ также выявить не удалось. Однако ответ на вопрос о возможной стимуляции фагоцитоза лейкоцитов под влиянием КМ остается открытым, так как сама модель скорее рассчитана на выявление нарушений фагоцитоза со знаком минус, а не на его стимуляцию (85–95 % фагоцитирующих клеток в нестимулированном контроле).

В отличие от количественного показателя фагоцита, качественные параметры этого процесса под действием КМ менялись и зависели от дозы. Так, при средних концентрациях КМ (10–100 мкг/мл) существенно увеличивались поглотительная и переваривающая активность клеток, а также продукция свободных радикалов. При высоких дозах КМ (1000 мкг/мл), напротив, наблюдалось ингибирование всех трех показателей.

С учетом современных представлений о динамике иммуновоспалительного процесса, полученные данные позволяют предположить, что повреждение тканей (инфекции, травма) приводят к локальному нарастанию концентрации КМ, которые при достижении определенного уровня активируют эффекторный потенциал фагоцитов. Это в свою очередь способствует усилению

очистки очага повреждения от микроорганизмов и продуктов деградации тканей, что создает предпосылки для начала процессов регенерации. Ингибирование эффекторного потенциала фагоцитов при высоких концентрациях КМ может быть объяснено необходимостью ограничения деструктивных процессов (по аналогии с механизмом отрицательной обратной связи).

Таким образом, результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что КМ проявляют свойства иммунорегуляторных веществ, способных усиливать активность клеток первичного звена противоинфекционной защиты исходя из их первоначального функционального состояния.

## Выводы

1. Во всех исследованных концентрациях КМ (10–1000 мкг/мл) не влияют на количество фагоцитирующих *S. aureus* макрофагов и нейтрофилов.

2. КМ усиливают бактерицидный потенциал лейкоцитов, что выражается в увеличении поглотительной и переваривающей способности клеток, а также в усилении клетками продукции свободных радикалов.

3. Наиболее выраженные эффекты КМ проявляют в концентрациях 10–100 мкг/мл. В дозе 1000 мкг/мл КМ ингибируют функциональную активность лейкоцитов.

## Вклад авторов

Планирование и выполнение экспериментов, обсуждение результатов, подготовка текста статьи – Милешина С.Е.; выполнение экспериментов, статистическая обработка результатов, обсуждение результатов – Николин А.А.; планирование экспериментов, выделение коллагена и получение коллагеновых матрикинов, обсуждение результатов, подготовка текста статьи – Козлов И.Г.

## Литература

1. Maquart F.X., Bellon G., Pasco S., Monboisse J.C. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie*. 2005; 87 (3–4): 353–60. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.10.006
2. Gaggari A., Jackson P.L., Noerager B. D., O'Reilly Ph. J., McQuaid D.B., Rowe S.M. et al. A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J. Immunol*. 2008; 180 (8): 5662–59. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5662
3. Amit G., Weathington N. Bioactive extracellular matrix fragments in lung health and disease. *J. Clin. Invest*. 2016; 126 (9): 3176–84. DOI: 10.1172/JCI83147.
4. Simeon A., Monier F., Emonard H., Wegrowski Y., Bellon G., Monboisse J.C. et al. Fibroblast-cytokine-extracellular matrix interactions in wound repair. *Curr. Top Pathol*. 1999; 93: 95–101. DOI: 10.1007/978-3-642-58456-5\_10
5. Tran K.T., Lamb P., Deng J.S. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J. Dermatol. Sci*. 2005; 40: 11–20. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2005.05.001
6. Patel D.F., Snelgrove R.J. The multifaceted roles of the matrikine Pro-Gly-Pro in pulmonary health and disease. *Eur Respir Rev*. 2018; 27 (148): 180017. DOI: 10.1183/16000617.0017-2018
7. Klaus L., Zhichao F. Chapter 5: Leukocyte adhesion. In book: ed. Klaus Ley. *Inflammation. Fundamental mechanisms*. World scientific, 2018.
8. Choi H.R., Kang Y.A., Ryoo S.J., Shin J.W., Na J.I., Huh C.H., Park K.C. Stem cell recovering effect of copper-free GHK in skin.

*Journal of Peptide Science*. 2012; 18 (11): 685–90. DOI: 10.1002/psc.2455

9. Gruchlik A., Chodurek E., Dzierzewicz Z. Influence of selected peptides and their copper complexes on antioxidant enzyme activities in human skin fibroblasts. *Postepy Dermatologii i Alergologii*. 2010; 27 (1): 29.

10. Fu S.-Ch., Cheuk Y.-Ch., Chiu W.-Y.V., Yung Sh.-H., Rolf Ch.G., Chan K.-M. Tripeptide-copper complex GHK-Cu (II) transiently improved healing outcome in a rat model of ACL reconstruction. *J. Orthop Res*. 2015; 33 (7): 1024–33. DOI: 10.1002/jor.22831

11. Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., Margolina A. GHK peptide as a natural modulator of multiple cellular pathways in skin regeneration. *J. Biomed. Biotechnol*. 2015. DOI: 10.1155/2015/648108

12. Simeon A., Emonard H., Hornebeck W. et al. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu<sup>2+</sup> stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci*. 2000; 67 (18): 2257–65. DOI: 10.1016/S0024-3205(00)00803-1

13. Smakhtin M.Y., Sever'yanova L.A., Konoplya A.I., Shveinov I.A. Tripeptide Gly-His-Lys is a hepatotropic immunosuppressor. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2002; 133 (6): 586–7. DOI: 10.1023/a:1020242127443

14. Pickart L., Vasquez-Soltero J. M., Margolina A. The effect of the human peptide GHK on gene expression relevant to nervous system function and cognitive decline. *Brain Sci*. 2017; 7 (2): 20. DOI: 10.3390/brainsci7020020

15. Aldag C., Nogueira Teixeira D., Leventhal P.S. Skin rejuvenation using cosmetic products containing growth factors, cytokines, and matrikines: A review of the literature. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2016; 9: 411–9. DOI: 10.2147/CCID.S116158
16. Tsai W.-C., Hsu C.-C., Chung C.-Y., Lin M.-S., Li S.-L., Pang J.-H.S. The pentapeptide KTTKS promoting the expressions of type I collagen and transforming growth factor- $\beta$  of tendon. 2007; (12): 1629–34. DOI: 10.1002/jor.20455
17. Schagen S.K. Topical peptide treatments with effective anti-aging results. *Cosmetics.* 2017; 4: 16.
18. Davis G.E., Bayless K.J., Davis M.J., Meininger G.A. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am. J. of Pathol.* 2000; 156 (5): 1489–98. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65020-1
19. Davis G.E., Senger D.R. Endothelial extracellular matrix. *Circulation Research.* 2005; 97 (11): 1093–107. DOI: 10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3
20. Martinez-Lemus L.A., Wu X., Wilson E. et al. Integrins as unique receptors for vascular control. *J. Vasc. Res.* 2003; 40 (3): 211–33. DOI: 10.1159/000071886
21. Garnotel R., Monoboisse J.-C., Randoux A. et al. The binding of type I collagen to lymphocyte function-associated antigen (LFA) 1 integrin triggers the respiratory burst of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (46): 27495–503. DOI: 10.1074/jbc.270.46.27495
22. Pasala T., Sattayaprasert P., Bhat P.K., Athappan G., Gandhi S. Clinical and economic studies of eptifibatid in coronary stenting. *Ther. Clin. Risk. Manag.* 2014; 10: 603–14. DOI: 10.2147/TCRM.S35664
23. Zamora A., Gandioso A., Massaguer A., Buenestado S., Calvis C., Hernández J.L. et al. Toward angiogenesis inhibitors based on the conjugation of organometallic platinum(II) complexes to RGD peptides. *ChemMedChem.* 2018; 13 (17): 1755–62. DOI: 10.1002/cmcd.201800282
24. Dou X., Nomoto T., Takemoto H., Tomoda M.M.K., Nishiyama N. Effect of multiple cyclic RGD peptides on tumor accumulation and intratumoral distribution of IRDye 700DX-conjugated polymers. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 8126. DOI: 10.1038/s41598-018-26593-0
25. Shuang L. Radiolabeled cyclic RGD peptide bioconjugates as radiotracers targeting multiple integrins. *Bioconjug Chem.* 2015; 26 (8): 1413–38. DOI: 10.1021/acs.bioconchem.5b00327
26. Maruyama S., Nonaka I., Tanaka H. Inhibitory effects of enzymatic hydrolysates of collagen and collagen-related synthetic peptides on fibrinogen/thrombin clotting. *Bochim. Biophys. Acta.* 1993; 1164 (2): 215–8. DOI: 10.1016/0167-4838(93)90250-u
27. Кирилина Е.А., Михайлова А.А., Малахов А.А., Гурьянов С.А., Ефремов М.А. Механизм иммунокорректирующего действия миелопида. *Иммунология.* 1998; 4: 27–9.
28. Koelink P.J., Overbeek S.A., Braber S., Morgan M.E., Henricks P.A.J., Roda M.A. et al. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2014; 63: 578–87. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303252
29. Wang L., Fuster M., Sriramarao P., Esko J.D. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 2005; 6 (9): 902–10.
30. Hahn C.S., Scott D.W., Xu X., Abdul Roda M., Payne G.A., Wells J.M. et al. The matrikine N-a-PGP couples extracellular matrix fragmentation to endothelial permeability. *Science Advances.* 2015; 1 (3). DOI: 10.1126/sciadv.1500175
31. Laskin D.L., Soltys R.A., Berg R.A., Riley D.J. Activation of alveolar macrophages by native and synthetic collagen-like polypeptides. *Am. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1994 Jan; 10 (1): 58–64. DOI: 10.1165/ajrcmb.10.1.8292381
32. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н., Буна-тян Н.Д. и др. Москва : ЗАО «Гриф и К», 2012.
33. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. СПб : Интермедика. 1999: 294–5.
34. Подосинников И.С., Нилова Л.Г., Бабаченко И.В. и др. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов. *Лаб. Дело.* 1981; 8: 468–70.
35. Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Пинегин Б.В. Оценка внутриклеточного киллинга стафилококка фагоцитами периферической крови с помощью проточной цитометрии. *Иммунология.* 2000; 2: 57–9.
36. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Оценка иммунного статуса человека в норме и при патологии. *Иммунология.* 2001; 4: 4–6.

## References

1. Maquart F.X., Bellon G., Pasco S., Monboisse J.C. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie.* 2005; 87 (3–4): 353–60. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.10.006
2. Gaggari A., Jackson P.L., Noerager B.D., O'Reilly Ph.J., McQuaid D.B., Rowe S.M., et al. A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J. Immunol.* 2008; 180 (8): 5662–9. DOI: 10.4049/jimmunol.180.8.5662
3. Amit G., Weathington N. Bioactive extracellular matrix fragments in lung health and disease. *J. Clin. Invest.* 2016; 126 (9): 3176–84. DOI: 10.1172/JCI83147
4. Simeon A., Monier F., Emonard H., Wegrowski Y., Bellon G., Monboisse J.C., et al. Fibroblast-cytokine-extracellular matrix interactions in wound repair. *Curr Top Pathol.* 1999; 93: 95–101. DOI: 10.1007/978-3-642-58456-5\_10
5. Tran K.T., Lamb P., Deng J.S. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J. Dermatol. Sci.* 2005; 40: 11–20. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2005.05.001
6. Patel D.F., Snelgrove R.J. The multifaceted roles of the matrikine Pro-Gly-Pro in pulmonary health and disease. *Eur. Respir. Rev.* 2018; 27 (148): 180017. DOI: 10.1183/16000617.0017-2018
7. Klaus L., Zhichao F. Chapter 5: Leukocyte adhesion. In book: ed. Klaus Ley. *Inflammation. Fundamental mechanisms.* World scientific, 2018.
8. Choi, H.R., Kang, Y.A., Ryoo, S.J., Shin, J.W., Na, J.I., Huh, C.H., Park, K.C. Stem cell recovering effect of copper-free GHK in skin. *Journal of Peptide Science.* 2012; 18 (11): 685–90. DOI: 10.1002/psc.2455
9. Gruchlik A., Chodurek E., Dzierzewicz Z. Influence of selected peptides and their copper complexes on antioxidant enzyme activities in human skin fibroblasts. *Postepy Dermatologii i Alergologii.* 2010; 27 (1): 29.
10. Fu S.-Ch., Cheuk Y.-Ch., Chiu W.-Y.V., Yung Sh.-H., Rolf Ch.G., Chan K.-M. Tripeptide-copper complex GHK-Cu (II) transiently improved healing outcome in a rat model of ACL reconstruction. *J. Orthop Res.* 2015; 33 (7): 1024–33. DOI: 10.1002/jor.22831
11. Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., Margolina A. GHK peptide as a natural modulator of multiple cellular pathways in skin regeneration. *J. Biomed. Biotechnol.* 2015. DOI: 10.1155/2015/648108
12. Simeon A., Emonard H., Hornebeck W., et al. The tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu<sup>2+</sup> stimulates matrix metalloproteinase-2 expression by fibroblast cultures. *Life Sci.* 2000; 67 (18): 2257–65. DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00803-1
13. Smakhtin M.Y., Sever'yanova L.A., Konoplya A.I., Shveinov I.A. Tripeptide Gly-His-Lys is a hepatotropic immunosuppressor. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2002; 133 (6): 586–7. DOI: 10.1023/a:1020242127443
14. Pickart L., Vasquez-Soltero J.M., Margolina A. The effect of the human peptide GHK on gene expression relevant to nervous system function and cognitive decline. *Brain Sci.* 2017; 7 (2): 20. DOI: 10.3390/brainsci7020020
15. Aldag C., Nogueira Teixeira D., Leventhal P.S. Skin rejuvenation using cosmetic products containing growth factors, cytokines, and matrikines: A review of the literature. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2016; 9: 411–9. DOI: 10.2147/CCID.S116158
16. Tsai W.-C., Hsu C.-C., Chung C.-Y., Lin M.-S., Li S.-L., Pang J.-H.S. The pentapeptide KTTKS promoting the expressions of type I collagen and transforming growth factor- $\beta$  of tendon. 2007; (12): 1629–34. DOI: 10.1002/jor.20455
17. Schagen S.K. Topical peptide treatments with effective anti-aging results. *Cosmetics.* 2017; 4: 16.
18. Davis G.E., Bayless K.J., Davis M.J., Meininger G.A. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am. J. of Pathol.* 2000; 156 (5): 1489–98. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65020-1

19. Davis G.E., Senger D.R. Endothelial Extracellular matrix. *Circulation Research*. 2005; 97 (11): 1093–107. DOI: 10.1161/01.RES.0000191547.64391.e3
20. Martinez-Lemus L.A., Wu X., Wilson E., et al. Integrins as unique receptors for vascular control. *J. Vasc. Res.* 2003; 40 (3): 211–233. DOI: 10.1159/000071886
21. Garnotel R., Monoboisse J.-C., Randoux A., et al. The binding of type I collagen to lymphocyte function-associated antigen (LFA) 1 integrin triggers the respiratory burst of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (46): 27495–503. DOI: 10.1074/jbc.270.46.27495
22. Pasala T., Sattayaprasert P., Bhat P.K., Athappan G., Gandhi S. Clinical and economic studies of eptifibatid in coronary stenting. *Ther. Clin. Risk. Manag.* 2014; 10: 603–14. DOI: 10.2147/TCRM.S35664
23. Zamora A., Gandioso A., Massaguer A., Buenestado S., Calvis C., Hernández J.L., et al. Toward angiogenesis inhibitors based on the conjugation of organometallic platinum(II) complexes to RGD peptides. *ChemMedChem*. 2018; 13 (17): 1755–62. DOI: 10.1002/cmdc.201800282
24. Dou X., Nomoto T., Takemoto H., Tomoda M.M.K., Nishiyama N. Effect of multiple cyclic RGD peptides on tumor accumulation and intratumoral distribution of IRDye 700DX-conjugated polymers. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 8126. DOI: 10.1038/s41598-018-26593-0
25. Shuang L. Radiolabeled cyclic RGD peptide bioconjugates as radiotracers targeting multiple integrins. *Bioconjug Chem.* 2015; 26 (8): 1413–38. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00327
26. Maruyama S., Nonaka I., Tanaka H. Inhibitory effects of enzymatic hydrolysates of collagen and collagen-related synthetic peptides on fibrinogen/thrombin clotting. *Bochim. Biophys. Acta.* 1993; 1164 (2): 215–8. DOI: 10.1016/0167-4838(93)90250-u
27. Kirilina E.A., Mikhailova A.A., Malakhov A.A., Guryanov S.A., Efremov M.A. Mechanism of immunocorrection action of myelopid. *Immunologiya*. 1998; 4: 27–9. (in Russian)
28. Koelink P.J., Overbeek S.A., Braber S., Morgan M.E., Henricks P.A.J., Roda M.A., et al. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2014; 63: 578–87. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303252
29. Wang L., Fuster M., Sriramarao P., Esko J.D. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 2005; 6 (9): 902–10.
30. Hahn C.S., Scott D.W., Xu X., Abdul Roda M., Payne G.A., Wells J.M., et al. The matrikine N-a-PGP couples extracellular matrix fragmentation to endothelial permeability. *Science Advances*. 2015; 1 (3). DOI: 10.1126/sciadv.1500175
31. Laskin D.L., Soltys R.A., Berg R.A., Riley D.J. Activation of alveolar macrophages by native and synthetic collagen-like polypeptides. *Am. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1994; 10(1): 58–64. DOI: 10.1165/ajrcmb.10.1.8292381
32. Guidelines for preclinical drug research. Ed. Mironov A.N., Bunatyan N.D., et al. Moscow: ZAO «Grif i K», 2012. (in Russian)
33. Karpishchenko A.I. Medical laboratory technology. Reference book. Saint Petersburg: Intermedika. 1999: 294–5. (in Russian)
34. Podosinnikov I.S., Nilova L.G., Babachenko I.V., et al. Method for determining chemotactic activity of white blood cells. *Lab. Delo*. 1981; 8: 468–70. (in Russian)
35. Mazurov D.V., Dambaeva S.V., Pinegin B.V. Evaluation of Staphylococcus intracellular killing by peripheral blood phagocytes using flow cytometry. *Immunologiya*. 2000; 2: 57–59. (in Russian)
36. Khaïtov R.M., Pinegin B.V. Assessment of the human immune status in normal and pathological conditions. *Immunologiya*. 2001; 4: 4–6. (in Russian)

## Сведения об авторах

**Милешина Светлана Евгеньевна** – к.м.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, доцент кафедры фармакологии педиатрического факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: svetikshrv@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8082-9393>

**Николин Алексей Александрович** – к.х.н., младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: nikson111@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8082-9393>

**Козлов Иван Генрихович** – д.м.н., проф., заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва, профессор Центра иммунологии и клеточных технологий ФГАОУ ВО БФУ им. И. Канта» Минобрнауки России, Калининград, профессор кафедры управления и организации лекарственного обеспечения ФДПО ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация; e-mail: immunopharmacology@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9694-5687>

## Authors' information

**Svetlana E. Mileshina** – PhD, Research Associate at the Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology of the Dmitry Rogachev NMRC PHOI of the MOH of Russia, Associate Prof. of the Department of Pharmacology, Pediatric Faculty of the N.I. Pirogov RNRMU MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: svetikshrv@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8082-9393>

**Alexey A. Nikolin** – PhD, Junior Researcher Associate at the Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology of the Dmitry Rogachev NMRC PHOI MOH of Russia, Associate Prof. of the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical Faculty of the N.I. Pirogov RNRMU of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: nikson111@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8579-2083>

**Ivan G. Kozlov** – MD, Prof., Head of the Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology of the Dmitry Rogachev NMRC PHOI of the MOH of Russia, Moscow, Prof. of the Center for immunology and cell technologies of I. Kant BFU of the MSHE, Kaliningrad, Prof. of the Department of management and organization of drug supply FPDE of I.M. Sechenov FMSMU of the MOH of Russia (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; e-mail: immunopharmacology@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9694-5687>

© Дагиль Ю.А., Пащенко М.В., 2020

Дагиль Ю.А., Пащенко М.В.

## Сопоставление трех видов клеточных тест-систем для оценки биологической активности агонистов рецептора NOD2

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

### Резюме

**Введение.** Агонисты рецептора NOD2 представляют собой перспективный класс активаторов врожденного иммунитета. Актуально создание тест-систем для качественного и количественного определения их биологической активности.

**Цель работы** – сопоставить основные характеристики трех видов репортерных клеток, предназначенных для оценки биологической активности агонистов NOD2: с эндогенной экспрессией NOD2, с временной гиперэкспрессией NOD2 и со стабильной гиперэкспрессией NOD2.

**Материал и методы.** Репортерные клетки с эндогенной экспрессией NOD2 (293Luc) были получены путем стабильной трансфекции клеток HEK-293T геном люциферазы под контролем NF-κB-зависимого промотора. Клетки с временной гиперэкспрессией NOD2 (293Luc-tNOD2) получали путем временной трансфекции клеток 293Luc плазмидой, кодирующей ген *NOD2* под конститутивным промотором. При длительном культивировании NOD2-трансфицированных клеток с селективным антибиотиком были получены клетки, стабильно гиперэкспрессирующие NOD2 (293Luc-stNOD2). Для каждого вида клеток были получены контрольные клетки, позволяющие подтверждать активацию NF-κB через рецептор NOD2. Эти клетки стимулировали 24 ч агонистом NOD2 – мурамилдипептидом (МДП); на выходе измеряли люциферин-зависимую хемилюминесценцию клеточных лизатов.

**Результаты.** Фоновый сигнал у клеток 293Luc-tNOD2 и 293Luc-stNOD2 был повышен соответственно в 30 и в 170 раз по сравнению с клетками 293Luc, что указывает на активацию NF-κB в отсутствие агониста. В то же время предел количественного определения МДП в среде у клеток 293Luc-stNOD2 был на порядок меньше, чем у 293Luc (1,6 и 20 нМ соответственно). У систем с использованием клеток 293Luc и 293Luc-stNOD2 отмечались приемлемые значения правильности и повторяемости, тогда как клетки 293Luc-tNOD2 характеризовались неудовлетворительной повторяемостью, а также требовали повышенного расхода реактивов и рабочего времени.

**Заключение.** Клеточные линии 293Luc и 293Luc-stNOD2 могут использоваться для определения биологической активности агонистов рецептора NOD2.

**Ключевые слова:** NOD2; мурамилдипептид; NF-κB; люцифераза; врожденный иммунитет

Статья поступила 15.05.2020. Принята в печать 16.06.2020.

**Для цитирования:** Дагиль Ю.А., Пащенко М.В. Сопоставление трех видов клеточных тест-систем для оценки биологической активности агонистов рецептора NOD2. Иммунология. 2020; 41 (4): 304–311. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-304-311>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках госзадания «Изучение подходов к созданию иммуотропных препаратов» (шифр: Подход-16), соглашения № 388-00049-16 от 25.01.2016, 388-03-108 от 30.01.2017, 388-03-2018-179 от 1.02.2018, 388-03-2019-110 от 8.02.2019, 388-02-2020-008 от 15.01.2020.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Dagil Yu.A., Pashenkov M.V.

## A comparison of three types of cell-based test systems for the assessment of biological activity of NOD2 receptor agonists

National Research Center Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, 115522, Moscow, Russian Federation

Для корреспонденции  
Пащенко Михаил Владимирович –  
доктор медицинских наук,  
и.о. заведующего  
лабораторией клинической  
иммунологии,  
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»  
ФМБА России,  
Москва, Российская Федерация  
E-mail: [mvpashenkov@yandex.ru](mailto:mvpashenkov@yandex.ru)  
<https://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

## Abstract

**Introduction.** NOD2 receptor agonists are a promising class of activators of innate immunity. Test systems for qualitative and quantitative measurements of their biological activity are required.

**Aim** – to compare main characteristics of three reporter cell types devised to assess biological activity of NOD2 agonists: cells with endogenous NOD2 expression, with transient NOD2 overexpression, with stable NOD2 overexpression.

**Material and methods.** Reporter cells with endogenous NOD2 expression (293Luc) were obtained by stably transfecting HEK-293T cells with luciferase reporter gene under an NF- $\kappa$ B-dependent promoter. Cells with transient NOD2 overexpression (293Luc-tNOD2) were obtained by transiently transfecting 293Luc cells with a plasmid encoding *NOD2* gene under a constitutive promoter. Cells with stable NOD2 overexpression (293Luc-stNOD2) were obtained by prolonged culture of NOD2-transfected cells with selective antibiotic. For each cell type, control cells were created enabling to confirm NOD2-dependent NF- $\kappa$ B activation. Cells were stimulated for 24 h with a NOD2 agonist, muramyl dipeptide (MDP); as the readout, luciferin-dependent chemiluminescence of cell lysates was measured.

**Results.** Background signal in 293Luc-tNOD2 and 293Luc-stNOD2 was, respectively, 30 and 170 times higher than in 293Luc cells, pointing at NF- $\kappa$ B activation in the absence of NOD2 agonists. At the same time, limit of quantitation of MDP by 293Luc-stNOD2 cells was an order of magnitude lower than by 293Luc cells (1.6 nM and 20 nM, respectively). Systems based on 293Luc and 293Luc-stNOD2 cells possessed acceptable accuracy and repeatability, 293Luc-tNOD2 cells showed unsatisfactory repeatability as well as increased time and reagent consumption.

**Conclusion.** 293Luc and 293Luc-stNOD2 cell lines can be used to measure biological activity of NOD2 receptor agonists.

**Keywords:** NOD2; muramyl dipeptide; NF- $\kappa$ B; luciferase; innate immunity

**Received** 15.05.2020. **Accepted** 16.06.2020.

**For citation:** Dagil Yu.A., Pashenkov M.V. A comparison of three types of cell-based test systems for the assessment of biological activity of NOD2 receptor agonists. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 304–11. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-304-311> (in Russian)

**Funding.** The work was performed in the framework of the State task «Study of approaches to the creation of immunotropic drugs» (cipher: Approach-16), contracts No 388-00049-16 from 25.01.2016, 388-03-108 from 30.01.2017, 388-03-2018-179 from 1.02.2018, 388-03-2019-110 from 8.02.2019, No 388-02-2020-008 from 15.01.2020.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

## Введение

Активаторы врожденного иммунитета представляют большой интерес как средства профилактики и лечения инфекционных заболеваний человека. Одной из наиболее разработанной в фармакологическом отношении групп этих препаратов являются агонисты рецептора NOD2 врожденной иммунной системы. Базовым агонистом этого рецептора является фрагмент бактериального пептидогликана – мурамилдипептид (МДП, или N-ацетил-D-мурамил-L-аланил-D-изоглутамин) [1]. В России из этой группы препаратов наиболее хорошо известен глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП, или N-ацетил-D-глюкозаминил-N-ацетил-D-мурамил-L-аланил-D-изоглутамин) [2]. В мире группа NOD2-агонистов представлена также препаратами мурабутид, ромуртид и мифамуртид [3–5]. Ведутся разработки других, более эффективных, агонистов, а также антагонистов рецептора NOD2 [6–8], что требует создания надежных, информативных и удобных в применении тест-систем для оценки биологической активности и фармакокинетики вновь создаваемых соединений.

Большинство рецепторов врожденного иммунитета, в том числе NOD2 и его ближайший родственник NOD1, передают сигнал в ядро при помощи факторов транскрипции семейства NF- $\kappa$ B [9, 10]. Поэтому для оценки биологической активности различных активаторов врожденного иммунитета используются репортерные клеточные линии, в которых измеряемым параметром является NF- $\kappa$ B-зависимая экспрессия репортерного белка, например люциферазы, щелочной фосфатазы или зеленого флюоресцентного белка. Для введения в клетки репортерных генов, регулируемых NF- $\kappa$ B-зависимым промотором, используют плазмидные или вирусные векторы. Транфекция репортерными конструкциями может быть временной (делается в каждом эксперименте, что повышает трудозатраты и снижает воспроизводимость) или стабильной. Последний вариант реализован в виде репортерных клеточных линий, созданных, в частности, фирмой Invivogen (США).

Для придания системе специфичности в отношении конкретного рецептора, как правило, прибегают к временной или стабильной гиперэкспрессии данного

## For correspondence

Mikhail V. Pashenkov –  
MD, Acting Head of the  
Laboratory of Clinical Immunology,  
NRC Institute of Immunology  
FMBA of Russia,  
Moscow, Russian Federation  
E-mail: [mvpashenkov@yandex.ru](mailto:mvpashenkov@yandex.ru)  
<https://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

рецептора, для чего используют векторные конструкции, в которых экспрессия интересующего рецептора регулируется конститутивно активным промотором. Однако гиперэкспрессия рецептора может приводить к нежелательным последствиям, в частности к активации NF-κB в отсутствие специфических агонистов [9, 10]. Кроме того, репортерные клетки экспрессируют эндогенные рецепторы врожденного иммунитета, что в ряде случаев может затруднять интерпретацию результатов. Альтернативным подходом является использование эндогенной экспрессии интересующего рецептора репортерными клетками, без его искусственной гиперэкспрессии; специфичность таких систем контролируют созданием вариантов репортерных клеток с нокаутом или нокаутом данного рецептора.

В данной работе мы сравнили ключевые характеристики трех видов репортерных клеток, предназначенных для оценки биологической активности агонистов NOD2: 1) с использованием эндогенной экспрессии NOD2; 2) с использованием временной гиперэкспрессии NOD2; 3) с использованием стабильной гиперэкспрессии NOD2. Все три вида клеток получены на основе клеточной линии HEK-293T, стабильно трансфицированной репортерным геном люциферазы под контролем NF-κB-зависимого промотора. Вариант 2 характеризуется наибольшими разбросами измеряемого показателя (хемилюминесценции) в пределах опыта, а также требует наибольших затрат времени и реактивов. Варианты 1 и 3 характеризуются хорошей воспроизводимостью и взаимно дополняют друг друга с точки зрения эффективного диапазона концентраций агониста, что позволяет применять их как для качественных, так и для количественных исследований агонистов NOD2-рецептора.

## Материал и методы

**Плазмиды и реактивы.** Использовали следующие плазмиды: 1) pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro], кодирующую репортерный ген люциферазы (luc2P) под контролем NF-κB-зависимого промотора (Promega, США); 2) pUNO-hNOD2a, кодирующую ген NOD2 человека под контролем конститутивного промотора (Invivogen, США); 3) контрольную плазмиду pcDNA3.1 (Life Technologies, Великобритания); 4) pcDNA3.3-Cas9n, кодирующую Cas9-никазу (Cas9n) [11]; 5) плазмиды pKS-gRNA-NOD2.1 и pKS-gRNA-NOD2.2, таргетирующие два близлежащих сайта в гене NOD2 человека [12]; 6) плазмиды pKS-gRNA-NOD1.1 и pKS-gRNA-NOD1.2, таргетирующие два близлежащих сайта в гене NOD1 человека [12]. N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (МДП) и бластицидин S были приобретены у фирмы Invivogen, липофектамин 2000, гигромицин В и рекомбинантный фактор некроза опухолей (ФНО) человека – у Life Technologies. N-ацетил-D-глюкозаминил-N-ацетил-D-сорбитоламинил-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамил-мезодиаминопимелиновая кислота (ГС-триДАП) была получена, как описано ранее [12] и любезно предоставлена к.х.н. В.Л. Львовым (Институт иммунологии).

**Получение репортерных клеток, содержащих ген люциферазы под контролем NF-κB-зависимого промотора.** Клетки HEK293T культивировали в среде DMEM («Панэко», Российская Федерация) с добавлением 2 mM L-глутамин (Sigma, США) и 10 % инактивированной фетальной телячьей сыворотки (РАА, Австрия). Клетки трансфицировали плазмидой pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] в комплексе с липофектамином 2000 согласно инструкции производителя. Селекцию стабильных трансфектантов выполняли в присутствии 200 мкг/мл гигромицина В (Life Technologies). Полученную клеточную линию, названную 293Luc, далее вели с указанной концентрацией гигромицина В, пассируя 2–3 раза в нед.

**Получение клеток 293Luc со стабильной гиперэкспрессией NOD2.** Экспоненциально растущие клетки 293Luc высевали в 24-луночный планшет по  $10^5$  на лунку. По достижении конfluence 50 % (примерно  $2 \cdot 10^5$  клеток на лунку) клетки трансфицировали плазмидой pUNO-hNOD2a в дозе от  $4 \cdot 10^4$  до 4 копий плазмиды на клетку в комплексе с липофектамином 2000. Через 2 дня начинали селекцию стабильных трансфектантов в присутствии гигромицина В и бластицидина S (10 мкг/мл). Минимальное количество плазмиды, при котором клетки приобретали резистентность к бластицидину S, составило 400 копий на клетку. Клеточная линия, трансфицированная указанной дозой плазмиды и стабильно растущая в присутствии гигромицина В и бластицидина S на 21-й день после трансфекции, была названа 293Luc-stNOD2 (stable NOD2). Полученная клеточная линия является аналогом клеточной линии HEK-Blue™ hNOD2 (Invivogen).

**Получение вариантов клеток 293Luc с нокаутом генов NOD2 и NOD1.** Для нокаутирования генов использовали технологию CRISPR-Cas9 [12, 13]. Вкратце, клетки 293Luc котрансфицировали плазмидами pcDNA3.3-Cas9n и двумя плазмидами, таргетирующими ген NOD2 или NOD1. Через 3 суток трансфицированные клетки пересевали для получения клеточных клонов. Через 3 нед собирали клоны, среди которых отбирали те, у которых отсутствовал ответ на специфический агонист нокаутуемого рецептора при сохранности ответа на ФНО. Наличие изменений геномных последовательностей генов NOD2 и NOD1 в отобранных клонах подтверждали путем секвенирования по Сэнгеру. В работе использовали по одному клону с нокаутом NOD2 и NOD1 (293Luc-ΔNOD2 и 293Luc-ΔNOD1).

**Стимуляция клеток 293Luc и их вариантов с нокаутом гена NOD2 и со стабильной гиперэкспрессией NOD2.** Клетки высевали в плоскодонные 96-луночные планшеты (SPL Life Sciences, Республика Корея) по  $10^4$  клеток на 100 мкл на лунку. Через 48 ч, когда монослой достигал конfluence 70–80 %, добавляли МДП в необходимой конечной концентрации либо рекомбинантный ФНО человека в конечной концентрации 100 нг/мл (положительный контроль). В лунки отрицательного контроля добавляли DMEM в том же объеме. Все стимуляции делали в дублях или триплетах. Еще через

24 ч в лунки добавляли лизирующий субстрат Bright-Glo (Promega), полученные клеточные лизаты переносили в 96-луночные планшеты из белого пластика (SPL Life Sciences) и измеряли люциферазную активность (хемилюминесценцию) на приборе Lucy II (Anthos, Австрия). Результаты выражали в относительных световых единицах (ОСЕ). Для корректного сравнения экспериментов результаты нормализовали, принимая ответ данного вида клеток на ФНО в каждом эксперименте за 100 %.

**Временная гиперэкспрессия NOD2 в клетках 293Luc в сочетании со стимуляцией МДП.** Клетки с временной гиперэкспрессией NOD2 ниже называются 293Luc-tNOD2 (transient NOD2). Методика описана в других работах [14]. 96-луночные планшеты с клетками 293Luc готовили, как описано выше. В день эксперимента готовили комплексы, содержащие: 1) требуемое количество МДП (контроль – среда без МДП); 2) плазмиду pUNO-hNOD2a в количестве 2 нг/лунку или примерно  $1,0-1,5 \cdot 10^4$  копий на клетку (контроль – плазида pсDNA3.1, 2 нг/лунку); 3) липофектамин 2000 (0,4 мкл/лунку). Комплексы добавляли к клеткам в течение 10–15 мин после приготовления. В качестве положительного контроля использовали ФНО. Через 24 ч измеряли люциферазную активность, как описано выше.

**Анализ данных.** Отношение сигнала к шуму рассчитывали как отношение ОСЕ в лунках с агонистами (МДП или ФНО) к ОСЕ в лунках без агонистов (фон). Предел количественного определения (ПКО) устанавливали путем анализа образцов, не содержащих МДП и содержащих низкие концентрации МДП, все в 6 повторностях. ПКО определяли как наименьшую концентрацию МДП, при которой получаемый сигнал еще удовлетворял следующим 3 критериям [15]: 1) сигнал в любой из 6 лунок с данной концентрацией МДП должен быть выше, чем  $M + 1,645\sigma$  фонового сигнала; 2) наличие высокодостоверного отличия сигнала при данной концентрации МДП от фонового сигнала ( $p < 0,001$  при использовании *t*-критерия Стьюдента); 3) коэффициент вариации сигнала при данной концентрации МДП – не более 20 %. Правильность и повторяемость оценивали путем 6-кратного определения

концентрации МДП в растворе, содержащем известное количество МДП. Правильность рассчитывали как  $M \pm \sigma$  относительного отклонения измеренной концентрации МДП от фактической, выраженного в процентах. Повторяемость (сходимость) оценивали по коэффициенту вариации измеренной концентрации МДП (в процентах). Для статистического анализа использовали *t*-критерий Стьюдента.

## Результаты

### Базальные и индуцированные показатели хемилюминесценции у трех видов репортерных клеток. Отношение полезного сигнала к шуму

На рисунке и в табл. 1 показаны базальные и индуцированные показатели хемилюминесценции клеток 293Luc, 293Luc-tNOD2 и 293Luc-stNOD2.

Фоновый сигнал у клеток 293Luc-tNOD2 был примерно в 30 раз выше, а у клеток 293Luc-stNOD2 – в 170 раз выше, чем у клеток 293Luc (см. табл. 1). Таким образом, гиперэкспрессия NOD2 приводит к резкому повышению фоновой (в отсутствие специфического агониста) активации NF-κB.

ФНО индуцировал примерно одинаковую люциферазную активность во всех трех типах клеток (см. табл. 1). Однако, поскольку фоновые сигналы резко различались, отношение сигнала к шуму при стимуляции ФНО у клеток 293Luc составило  $2450 \pm 820$ , тогда как у клеток 293Luc-tNOD2 –  $137 \pm 91$ , а у клеток 293Luc-stNOD2 – всего  $12,2 \pm 3,7$ .

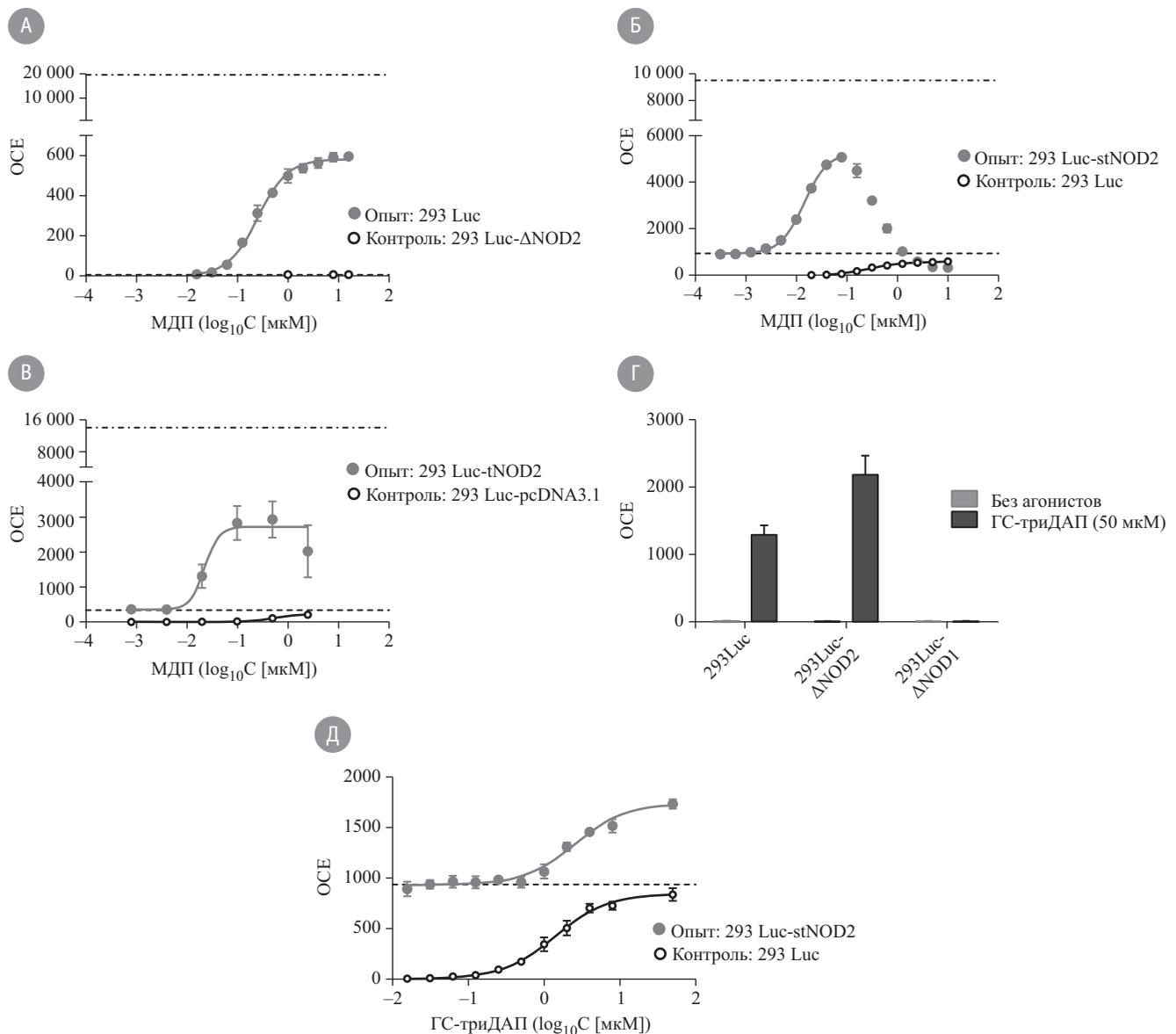
Зависимость ответа от логарифма концентрации МДП у клеток 293Luc, экспрессирующих эндогенный NOD2, носила характер сигмоидной функции (рисунок А). Верхнее плато ответа на МДП у клеток 293Luc не превышало 5 % от ответа на ФНО,  $EC_{50}$  составила  $0,18 \pm 0,05$  мкМ ( $\lg EC_{50} = -0,77 \pm 0,14$ ). Однако в связи с низкой базальной хемилюминесценцией клетки 293Luc характеризовались наибольшими среди трех видов клеток отношениями полезного сигнала к шуму при ответе на МДП (см. табл. 1).

У клеток 293Luc-stNOD2 кривая ответа на МДП имела колоколообразную форму (см. рисунок Б). Максимум ответа на МДП, составляющий > 50 % ответа

**Таблица 1.** Функциональные свойства клеток 293Luc, 293Luc-tNOD2 и 293Luc-stNOD2\*

Агонист	Показатель (ед. измерения)	293Luc	293Luc-tNOD2	293Luc-stNOD2
–	Сигнал (ОСЕ)	$6,6 \pm 2,9$	$201 \pm 182$	$1109 \pm 504$
ФНО (100 нг/мл)	Сигнал (ОСЕ)	$15036 \pm 3482$	$15299 \pm 1599$	$12359 \pm 2864$
	ОСШ	$2450 \pm 820$	$137 \pm 91$	$12,2 \pm 3,7$
МДП (100 нМ)	Сигнал (ОСЕ)	$140 \pm 69$	$1800 \pm 978$	$9975 \pm 3173$
	ОСШ	$22,7 \pm 9,8$	$11,3 \pm 6,6$	$10,4 \pm 5,1$
МДП (1 мкМ)	Сигнал (ОСЕ)	$409 \pm 212$	$2011 \pm 616$	$1143 \pm 170$
	ОСШ	$64,6 \pm 31,8$	$16,8 \pm 11,3$	$1,46 \pm 0,52$
МДП	$\lg_{10} EC_{50}$	$-0,77 \pm 0,14$	$-1,64 \pm 0,25$	$-1,68 \pm 0,15$
МДП	Предел количественного определения (мкМ)	0,02	$\leq 0,02$	0,0016

**Примечание.** \* – значения средних и стандартных отклонений рассчитаны по результатам 7–15 независимых экспериментов; ОСШ – отношение сигнала к шуму; ФНО – фактор некроза опухоли; здесь и в табл. 2: МДП – мурамилдипептид.



Примеры ответов клеток 293Luc, 293Luc-tNOD2 и 293Luc-stNOD2, а также соответствующих контрольных клеток на агонисты NOD-рецепторов.

*А* – ответ клеток 293Luc и контрольных клеток 293Luc-ΔNOD2 на мурамилдипептид (МДП); *Б* – ответ клеток 293Luc-stNOD2 и контрольных клеток 293Luc на МДП; *В* – ответ на МДП клеток 293Luc-tNOD2 и контрольных клеток 293Luc, трансфицированных плазмидой pcDNA3.1; *Г* – ответ клеток 293Luc, 293Luc-ΔNOD2 и 293Luc-ΔNOD1 на ГС-триДАП; *Д* – ответ клеток 293Luc-stNOD2 и контрольных клеток 293Luc на ГС-триДАП. На всех графиках показаны результаты 1 репрезентативного эксперимента из не менее чем 3 для каждой серии ( $M \pm \sigma$  по 3 повторностям в каждом эксперименте). На графиках А, Б, В и Д пунктирной линией отмечена средняя фоновая хемилюминесценция опытных клеток, точечно-пунктирной линией – средняя ФНО-индуцированная хемилюминесценция опытных клеток.

на ФНО, достигался при концентрации около 0,1 мкМ. При дальнейшем повышении концентрации МДП ответ падал, так что при концентрациях свыше 1 мкМ уровни хемилюминесценции были даже ниже базального, что может быть обусловлено истощением пулов сигнальных молекул при гиперактивации NOD2. Левая часть кривой «доза–ответ» аппроксимировалась сигмоидной функцией (рисунок Б), причем  $EC_{50}$  была примерно на порядок ниже, чем у клеток 293Luc ( $EC_{50} = 0,021 \pm 0,008$  мкМ,  $\log_{10}EC_{50} = -1,68 \pm 0,15$ ; см. табл. 1). Отношения сигнала к шуму у клеток

293Luc-stNOD2 были существенно ниже, чем у клеток 293Luc, за счет как более высокой базальной хемилюминесценции, так и аутоингибирования сигнала при высокой концентрации МДП.

Клетки 293Luc-tNOD2 занимали промежуточное положение по указанным показателям (см. табл. 1). При наиболее высокой исследованной концентрации МДП (2,5 мкМ) тоже отмечалась тенденция к аутоингибированию сигнала, хотя и не столь выраженная, как у клеток 293Luc-stNOD2 (рисунок В). Также у клеток 293Luc-tNOD2 обращают на себя внимание

большие стандартные отклонения сигнала в пределах опыта, что указывает на низкую воспроизводимость методики.

### Предел количественного определения

Предел количественного определения МДП составил у клеток 293Luc – 20 нМ, у клеток 293Luc-stNOD2 – 1,6 нМ (см. табл. 1). Для клеток 293Luc-tNOD2 этот показатель не был точно определен, он находился в диапазоне 4–20 нМ.

### Специфичность

Как любые другие клетки, клеточная линия HEK293T и ее модифицированные варианты экспрессируют не только NOD2, но и другие паттерн-распознающие рецепторы, стимуляция которых может приводить к активации NF-κB. В связи с этим необходима проверка специфичности сигнала, получаемого под действием исследуемых соединений.

При использовании линии 293Luc контролями специфичности служат варианты этой клеточной линии с нокаутами генов *NOD2* и других паттерн-распознающих рецепторов. Например, клетки с нокаутом *NOD2* (293Luc-ΔNOD2) не отвечают на МДП в концентрациях вплоть до 50 мкМ (см. рисунок А). Тем самым подтверждается, что МДП активирует NF-κB в клетках 293Luc исключительно через рецептор NOD2. Для сравнения, другое вещество мурамилпептидной природы, ГС-триДАП, тоже вызывает активацию NF-κB в клетках 293Luc, но эта активность сохраняется в клетках 293Luc-ΔNOD2 и исчезает в клетках 293Luc-ΔNOD1 с нокаутом гена *NOD1*, что указывает на избирательность ГС-триДАП по отношению к рецептору NOD1 (см. рисунок Г).

Контролем для клеток 293Luc-stNOD2 служат клетки 293Luc. Как было отмечено выше, клетки 293Luc-stNOD2 отвечают на МДП в концентрациях на порядок ниже, чем клетки 293Luc, что подтверждает активность МДП по отношению к рецептору NOD2 (см. рисунок Б). Вещество ГС-триДАП, являющееся агонистом NOD1, тоже активирует NF-κB и в клетках 293Luc, и в клетках 293Luc-stNOD2 (см. рисунок Д). Однако  $EC_{50}$  для ГС-триДАП в клетках 293Luc-stNOD2 даже несколько выше, чем в клетках 293Luc (в опыте на рисунке Д – 2,54 мкМ и 1,43 мкМ соответственно). Следовательно, активация NF-κB в клетках 293Luc-stNOD2 под действием ГС-триДАП не обусловлена активацией NOD2.

### Правильность и повторяемость

Для оценки правильности и повторяемости методик исследовали одно и то же разведение МДП в 6 повторностях (расчетная конечная концентрация МДП в среде составляла 100 нМ в случае клеток 293Luc и 293Luc-tNOD2 и 10 нМ в случае 293Luc-stNOD2), после чего по калибровочным кривым рассчитывали концентрацию МДП в среде. Как видно из табл. 2, клетки 293Luc и 293Luc-stNOD2 позволяли правильно определять концентрацию МДП в среде при достаточно хорошей повторяемости. В то же время клетки 293Luc-tNOD2

характеризовались неудовлетворительной повторяемостью, о чем свидетельствует высокий коэффициент вариации.

### Обсуждение

NOD2-репортерные клеточные линии могут использоваться для решения нескольких задач: 1) фундаментальные исследования рецептора NOD2, в частности изучение его сигнальных путей; 2) изучение биологической активности вновь создаваемых агонистов и антагонистов NOD2, а также контроль качества производственных партий этих групп препаратов; 3) определение содержания агонистов NOD2 в биологических жидкостях. Различия свойств полученных клеточных линий определяют их сферы применения. Ниже мы исключаем из сравнения клетки 293Luc-tNOD2 с временной гиперэкспрессией NOD2, поскольку данная модель является наиболее затратной с точки зрения рабочего времени и расходных материалов и обладает наихудшей воспроизводимостью.

#### Изучение сигнальных путей рецептора NOD2.

Клетки 293Luc характеризуются естественной экспрессией рецептора NOD2, низкой фоновой активацией NF-κB, а также высоким отношением сигнала к шуму при стимуляции классическим агонистом NOD2 (МДП), что позволяет использовать их для изучения сигнальных путей рецептора NOD2, например путем нокаутирования или ингибирования известных или предполагаемых компонентов сигнальных путей. Клетки 293Luc-stNOD2 менее пригодны для этой цели, поскольку избыточная экспрессия белка NOD2 может приводить к его неестественным взаимодействиям с другими белками, искажая естественную картину NOD2-зависимой передачи сигнала. Проявлением этого может служить высокая фоновая активация NF-κB в клетках 293Luc-stNOD2 в отсутствие специфического агониста, что уже было описано в литературе [9, 10].

#### Изучение биологической активности агонистов и антагонистов NOD2.

Для определения биологической активности агонистов NOD2 пригодны обе клеточные линии. Хотя антагонисты NOD2 в работе не изучались за неимением коммерчески доступных соединений этого класса, есть основания для предположения, что и этот класс соединений может быть изучен с помощью полученных клеточных линий. Однако необходимо учитывать, что избыточная чувствительность клеток 293Luc-stNOD2 к агонистам NOD2 способна приводить к искажению показателей активности изучаемых соединений, в связи с чем требуется перепроверка данных, полученных с помощью 293Luc-stNOD2, на клетках 293Luc с естественной экспрессией NOD2, которая сопоставима с экспрессией NOD2 в макрофагах человека [12].

**Определение агонистов NOD2 в биологических жидкостях.** Как клетки 293Luc, так и клетки 293Luc-stNOD2 могут в перспективе быть использованы для количественного определения агонистов NOD2 в биологических жидкостях, например при фармакокине-

тических исследованиях. Оба вида клеток характеризуются приемлемыми показателями правильности и повторяемости. Предел определения МДП у клеток 293Luc и 293Luc-stNOD2 сопоставим или лучше, чем у систем, основанных на высокоэффективной жидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии [16–18]. Хотя полезный диапазон каждой клеточной линии сравнительно невелик (20 нМ – 1 мкМ для клеток 293Luc, 1,6 нМ – 100 нМ для клеток 293Luc-stNOD2), параллельное тестирование образцов на двух клеточных линиях позволяет расширить его примерно до трех порядков. При использовании клеток 293Luc-stNOD2 возможно ошибочное занижение концентрации агониста, обусловленное колоколообразной зависимостью ответа от концентрации у клеток 293Luc-stNOD2, тогда как параллельное тестирование образцов на клетках 293Luc-stNOD2 и 293Luc позволит избежать этой ошибки, поскольку у клеток 293Luc отсутствует аутоингибирование сигнала вплоть до концентрации МДП 50 мкМ (данные не представлены).

## Выводы

1. В работе получены репортерные клеточные линии с естественной экспрессией, с временной гиперэк-

спрессией и со стабильной гиперэкспрессией рецептора NOD2, а также соответствующие контрольные линии.

2. Полученные клеточные линии позволяют оценивать биологическую активность агонистов рецептора NOD2, а также могут быть использованы для других исследований, связанных с активацией этого рецептора. Наилучшими характеристиками по правильности и повторяемости обладают клеточные линии с естественной экспрессией NOD2 (293Luc) и со стабильной гиперэкспрессией NOD2 (293Luc-stNOD2).

3. Нижний предел количественного определения мурамилдипептида у клеточной линии с 293Luc составляет 20 нМ, у клеточной линии 293Luc-stNOD2 – 1,6 нМ. Диапазон измеряемых концентраций МДП при параллельном использовании двух клеточных линий варьирует от 1,6 до 1 мкМ.

## Вклад авторов

Участие в получении репортерных клеточных линий, оценка их функциональных свойств, статистическая обработка данных, участие в написании статьи – Дагиль Ю.А.; общее руководство работой, получение репортерных клеточных линий, участие в статистической обработке результатов, написание статьи – Пашенков М.В.

## Литература

1. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G. et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (11): 8869–72.

2. Винницкий Л.И., Бунятян К.А., Пинегин Б.В., Миронова Е.В., Швец Л.И., Волков А.А. и др. Отечественный иммуномодулятор нового поколения Ликопид в комплексном лечении и профилактике инфекционных осложнений в хирургической клинике. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 1997; (11): 46–9.

3. Bahr G.M., Darcissac E., Bevec D., Dukor P., Chedid L. Immunopharmacological activities and clinical development of muramyl peptides with particular emphasis on murabutide. *Int. J. Immunopharmacol.* 1995; 17 (2): 117–31.

4. Azuma I. Review: inducer of cytokines in vivo: overview of field and romurtide experience. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992; 14 (3): 487–96.

5. Kager L., Potschger U., Bielack S. Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2010; 6: 279–86.

6. Kecek Plesec K., Urbancic D., Gobec M., Pekosak A., Tomasic T., Anderluh M. et al. Identification of indole scaffold-based dual inhibitors of NOD1 and NOD2. *Bioorg. Med. Chem.* 2016; 24 (21): 5221–234.

7. Wang S., Yang J., Li X., Liu Z., Wu Y., Si G. et al. Discovery of 1,4-benzodiazepine-2,5-dione (BZD) derivatives as dual nucleotide binding oligomerization domain containing 1/2 (NOD1/NOD2) antagonists sensitizing paclitaxel (PTX) to suppress Lewis lung carcinoma (LLC) growth in vivo. *J. Med. Chem.* 2017; 60 (12): 5162–92.

8. Rickard D.J., Sehon C.A., Kasparcova V., Kallal L.A., Zeng X., Montoute M.N. et al. Identification of benzimidazole diamides as selective inhibitors of the nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) signaling pathway. *PLoS One.* 2013; 8 (8): e69619.

9. Ogura Y., Inohara N., Benito A., Chen F.F., Yamaoka S., Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (7): 4812–8.

10. Inohara N., Koseki T., del Peso L., Hu Y., Yee C., Chen S. et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (21): 14 560–7.

11. Tarasevich A., Filatov A., Pichugin A., Mazurov D. Monoclonal antibody profiling of cell surface proteins associated with the viral biofilms on HTLV-1 transformed cells. *Acta Virol.* 2015; 59 (3): 247–56.

12. Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Mazurov D.V., Pashenkov M.V. The dual NOD1/NOD2 agonism of muropptides containing a meso-diaminopimelic acid residue. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0160784.

13. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013; 8 (11): 2281–308.

14. Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., Blanot D., Boneca I.G., Philpott D.J. et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (43): 41 702–8.

15. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* 2008; 29 (1): S49–52.

16. Курсаков С.В., Кузнецова Е.Г., Курьлева О.М., Саломатина Л.А., Гурьянова С.В., Борисова О. и др. Разработка и валидация методики определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Иммунология.* 2020; 41 (1): 74–82.

17. Fosset S., Fromentin G., Rampin O., Lang V., Mathieu F., Tome D. Pharmacokinetics and feeding responses to muramyl dipeptide in rats. *Physiol. Behav.* 2003; 79 (2): 173–82.

18. Fox A., Fox K. Rapid elimination of a synthetic adjuvant peptide from the circulation after systemic administration and absence of detectable natural muramyl peptides in normal serum at current analytical limits. *Infect. Immun.* 1991; 59 (3): 1202–5.

## References

1. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan

through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (11): 8869–72.

2. Vinnitskiy L.I., Bunyatyan K.A., Pinegin B.V., Mironova E.V., Shvets L.I., Volkov A.A., et al. Domestic immunomodulator of a new generation, Licopid, in the comprehensive therapy and prevention of infectious complications in surgery. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 1997; (11): 46–9. (in Russian)
3. Bahr G.M., Darcissac E., Bevec D., Dukor P., Chedid L. Immunopharmacological activities and clinical development of muramyl peptides with particular emphasis on murabutide. *Int. J. Immunopharmacol.* 1995; 17 (2): 117–31.
4. Azuma I. Review: inducer of cytokines in vivo: overview of field and romurtide experience. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992; 14 (3): 487–96.
5. Kager L., Potschger U., Bielack S. Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2010; 6: 279–86.
6. Kecek Plesec K., Urbancic D., Gobec M., Pekosak A., Tomasic T., Anderluh M., et al. Identification of indole scaffold-based dual inhibitors of NOD1 and NOD2. *Bioorg. Med. Chem.* 2016; 24 (21): 5221–234.
7. Wang S., Yang J., Li X., Liu Z., Wu Y., Si G., et al. Discovery of 1,4-benzodiazepine-2,5-dione (BZD) derivatives as dual nucleotide binding oligomerization domain containing 1/2 (NOD1/NOD2) antagonists sensitizing paclitaxel (PTX) to suppress Lewis lung carcinoma (LLC) growth in vivo. *J. Med. Chem.* 2017; 60 (12): 5162–92.
8. Rickard D.J., Sehon C.A., Kasparcova V., Kallal L.A., Zeng X., Montoute M.N., et al. Identification of benzimidazole diamides as selective inhibitors of the nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) signaling pathway. *PLoS One.* 2013; 8 (8): e69619.
9. Ogura Y., Inohara N., Benito A., Chen F.F., Yamaoka S., Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (7): 4812–8.
10. Inohara N., Koseki T., del Peso L., Hu Y., Yee C., Chen S., et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (21): 14 560–7.
11. Tarasevich A., Filatov A., Pichugin A., Mazurov D. Monoclonal antibody profiling of cell surface proteins associated with the viral biofilms on HTLV-1 transformed cells. *Acta Virol.* 2015; 59 (3): 247–56.
12. Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Mazurov D.V., Pashenkov M.V. The dual NOD1/NOD2 agonism of mu-ropeptides containing a meso-diaminopimelic acid residue. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0160784.
13. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013; 8 (11): 2281–308.
14. Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., Blanot D., Boneca I.G., Philpott D.J., et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (43): 41 702–8.
15. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* 2008; 29 (1): S49–52.
16. Kursakov S.V., Kuznetsova E.G., Kuryleva O.M., Salomatina L.A., Gur'yanova S.V., Borisova O.Yu., et al. Development and validation of method for glucosaminylmuramyl dipeptide determining in aqueous solutions by high-performance liquid chromatography. *Immunologiya.* 2020; 41 (1): 74–82. (in Russian)
17. Fosset S., Fromentin G., Rampin O., Lang V., Mathieu F., Tome D. Pharmacokinetics and feeding responses to muramyl dipeptide in rats. *Physiol. Behav.* 2003; 79 (2): 173–82.
18. Fox A., Fox K. Rapid elimination of a synthetic adjuvant peptide from the circulation after systemic administration and absence of detectable natural muramyl peptides in normal serum at current analytical limits. *Infect. Immun.* 1991; 59 (3): 1202–5.

## Сведения об авторах

**Дагиль Юлия Алексеевна** – к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: dagilya@petrovax.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9320-0789>

**Пашенков Михаил Владимирович** – д.м.н., и.о. заведующего лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: mvpashenkov@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

## Authors' information

**Yuliya A. Dagil** – PhD, Researcher of the Laboratory of Clinical Immunology, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: dagilya@petrovax.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9320-0789>

**Mikhail V. Pashenkov** – MD, Acting Head of the Laboratory of Clinical Immunology, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: mvpashenkov@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

© Коллектив авторов, 2020

Шмаров М.М.<sup>1,3</sup>, Седова Е.С.<sup>1</sup>, Никонова А.Э.<sup>1</sup>, Елаков А.Л.<sup>1</sup>,  
Щербинин Д.Н.<sup>1</sup>, Артемова Э.А.<sup>1</sup>, Лебедева Е.С.<sup>2</sup>, Чулкина М.М.<sup>2</sup>,  
Лосич М.А.<sup>1</sup>, Зайкова О.Н.<sup>1</sup>, Чернышова Е.В.<sup>1</sup>, Алексеева С.В.<sup>1</sup>,  
Тутыхина И.Л.<sup>1</sup>, Сергеев О.В.<sup>3</sup>, Верховская Л.В.<sup>1</sup>, Пичугин А.В.<sup>2</sup>,  
Метлин А.Е.<sup>4</sup>, Баринский И.Ф.<sup>1</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1</sup>, Логунов Д.Ю.<sup>1,3</sup>,  
Атауллаханов Р.И.<sup>2</sup>, Народицкий Б.С.<sup>1,3</sup>, Гинцбург А.Л.<sup>1,3</sup>

## Иммуногенные и защитные свойства рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующего ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма RV-97

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 123022, г. Москва, Российская Федерация

### Резюме

**Введение.** Бешенство – это острое инфекционное заболевание, общее для человека и животных. Для профилактики заболевания до контакта с возбудителем применяется предэкспозиционная профилактическая вакцинация (ПрЭП) групп риска. В России для этой цели применяются классические инактивированные культуральные вакцины. Данные вакцины обладают высокой эффективностью, однако могут вызывать сильные побочные реакции и требуют многократного введения. Поэтому актуальной является разработка новых безопасных антирабических вакцин, позволяющих добиться протективного эффекта при однократной вакцинации.

**Цель** исследования – создание репликативно-дефектного вирусного вектора на основе рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства, и изучение его протективных и иммуногенных свойств при иммунизации лабораторных мышей.

**Материал и методы.** Рекомбинантный аденовирус был получен с помощью набора AdEazy Adenoviral vector system (Stratagen, США). Для оценки защитных свойств и иммуногенности аденовируса Ad5-RV97 мыши линии BALB/c были иммунизированы однократно внутримышечно. Гуморальный иммунный ответ изучали с помощью реакции флуоресцентной вирус-нейтрализации, Т-клеточный ответ – с помощью метода ELISpot.

**Результаты.** Рекомбинантный аденовирус Ad5-RV97 показал 100 % защиту лабораторных мышей от заражения вирусом бешенства. Уже на 14-й день после иммунизации у животных зафиксированы высокие уровни вирус-нейтрализующих антител, продолжающиеся расти вплоть до 42-го дня после иммунизации. Был обнаружен значимый уровень спленцитов (как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>-клеток), продуцирующих ИФН-γ в ответ на стимуляцию антигеном.

**Заключение.** Полученные данные позволяют расценивать аденовирус Ad5-RV97 в качестве основы для создания кандидатной антирабической вакцины, которая может применяться для ПрЭП различных групп риска.

**Ключевые слова:** вирус бешенства; рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа; антирабическая вакцина; гуморальный иммунный ответ; клеточный иммунный ответ

Для корреспонденции  
Седова Елена Сергеевна –  
кандидат биологических наук,  
научный сотрудник  
лаборатории молекулярной  
биотехнологии  
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»  
Минздрава России,  
Москва, Российская Федерация  
E-mail: sedova-es@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

Статья поступила 30.06.2020. Принята к печати 16.07.2020.

**Для цитирования:** Шмаров М.М., Седова Е.С., Никонова А.Э., Елаков А.Л., Щербинин Д.Н., Артемова Э.А., Лебедева Е.С., Чулкина М.М., Лосич М.А., Зайкова О.Н., Чернышова Е.В., Алексеева С.В., Тутыхина И.Л., Сергеев О.В., Верховская Л.В., Пичугин А.В., Метлин А.Е., Баринский И.Ф., Гребенникова Т.В., Логунов Д.Ю., Атауллаханов Р.И., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Иммуногенные и защитные свойства рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующего ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма RV-97. *Иммунология*. 2020; 41 (4): 312–325. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-312-325>

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Shmarov M.M.<sup>1,3</sup>, Sedova E.S.<sup>1</sup>, Nikonova A.E.<sup>1</sup>, Elakov A.L.<sup>1</sup>, Shcherbinin D.N.<sup>1</sup>, Artemova E.A.<sup>1</sup>, Lebedeva E.S.<sup>2</sup>, Chulkina M.M.<sup>2</sup>, Losich M.A.<sup>1</sup>, Zaykova O.N.<sup>1</sup>, Chernishova E.V.<sup>1</sup>, Alekseeva S.V.<sup>1</sup>, Tutykhina I.L.<sup>1</sup>, Sergeev O.V.<sup>3</sup>, Verkhovskaya L.V.<sup>1</sup>, Pichugin A.V.<sup>2</sup>, Metlin A.E.<sup>4</sup>, Barinsky I.F.<sup>1</sup>, Grebennikova T.V.<sup>1</sup>, Logunov D.Yu.<sup>1,3</sup>, Ataulakhanov R.I.<sup>2</sup>, Naroditsky B.S.<sup>1,3</sup>, Gintsburg A.L.<sup>1,3</sup>

## Immunogenic and protective properties of the recombinant human adenovirus serotype 5 expressing the glycoprotein G gene of the rabies virus vaccine strain RV-97

<sup>1</sup> Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> National Research Center – Institute of immunology of Federal Medico-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup> The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality of Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 123022, Moscow, Russian Federation

### Abstract

**Introduction.** Rabies is an acute infectious disease common to both humans and animals. To prevent the disease before contact with the pathogen, pre-exposure prophylactic vaccination (PrEP) of risk groups is used. The classic inactivated culture anti-rabies vaccines are used for immunization of risk groups in Russia. These vaccines are highly effective, but can cause severe adverse reactions and requires a multiple administration. Therefore, it is relevant to develop new safe rabies vaccines to achieve a protective effect with a single administration.

**The aim** of our study was to create replication-defective recombinant human adenovirus serotype 5, that carries the gene for glycoprotein G rabies virus, and to study its protective and immunogenic properties in immunizing laboratory mice.

**Material and methods.** Recombinant adenovirus was obtained using the kit AdEazy Adenoviral vector system (Stratagen, USA). To evaluate the protective properties and immunogenicity of Ad5-RV97 BALB/c mice were immunized once intramuscularly. The humoral immune response was studied using the fluorescent virus neutralization reaction, the T-cell response using the ELISPOT method.

**Results.** Recombinant adenovirus Ad5-RV97 was 100 % protection against rabies viruses. Within 14 days after immunization, high level of virus-neutralizing antibodies was reported, which continue to grow up until day 42 after immunization. Significant level of splenocytes (both CD4<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup>-cells) producing IFN- $\gamma$  in response to antigen stimulation was detected.

**Conclusion.** The data obtained allow us to consider Ad5-RV97 as the basis for creating a candidate rabies vaccine, which can be used to treat various risk groups.

**Keywords:** rabies virus; recombinant human adenovirus serotype 5; rabies vaccine; humoral immune response; cellular immune response

Received 30.06.2020. Accepted 16.07.2020.

**For citation:** Shmarov M.M., Sedova E.S., Nikonova A.E., Elakov A.L., Shcherbinin D.N., Artemova E.A., Lebedeva E.S., Chulkina M.M., Losich M.A., Zaykova O.N., Chernishova E.V., Alekseeva S.V., Tutykhina I.L., Sergeev O.V., Verkhovskaya L.V., Pichugin A.V., Metlin A.E., Barinsky I.F., Grebennikova T.V., Logunov D.Yu., Ataulakhanov R.I., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Immunogenic and protective properties of the recombinant human adenovirus serotype 5 expressing the glycoprotein G gene of the rabies virus vaccine strain RV-97. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 312–25. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-312-325> (in Russian)

**Funding.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

### For correspondence

Elena S. Sedova –  
 PhD, Researcher of Laboratory  
 of Molecular Biotechnology  
 N.F. Gamaleya FRCM,  
 Ministry of Health  
 of the Russian Federation  
 E-mail: [sedova-es@yandex.ru](mailto:sedova-es@yandex.ru)  
<https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

## Введение

Бешенство – это острое инфекционное заболевание, общее для человека и животных, вызываемое РНК-содержащим вирусом рода *Lyssavirus*, семейства *Rhabdoviridae*. Заболевание проявляется нарушениями функций нервной системы, энцефаломиелиитами и характеризуется практически абсолютной летальностью. Заболевание регистрируется чаще среди диких и домашних плотоядных животных, которые являются основным его переносчиком. Путь передачи бешенства человеку связан с укусом или попаданием слюны больного животного на поврежденные кожные покровы или слизистые оболочки [1].

Для профилактики заболевания до контакта с возбудителем применяется предэкспозиционная профилактическая вакцинация (ПрЭП) групп риска (лица, подверженные профессиональному риску, и путешественники). На территории РФ используются классические инактивированные вакцины: концентрированная очищенная культуральная антирабическая вакцина (КОКАВ), культуральная антирабическая вакцина Рабипур®, культуральная антирабическая вакцина Рабивак-Внуково-32® и культуральная антирабическая вакцина производства ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН. Данные вакцины обладают высокой эффективностью, однако во многих случаях их применение связано с риском развития аллергических и побочных реакций. Кроме того, они имеют многократную схему введения, что часто приводит к неполному прохождению курса иммунизаций [2]. Еще одним существенным недостатком этих вакцин является необходимость работы с живыми штаммами вируса бешенства в процессе их производства. Это существенно усложняет производственный процесс и требует обеспечения высокого уровня биологической безопасности. Также производство инактивированных антирабических вакцин осуществляется с использованием первичных культур клеток животных, а такой способ характеризуется высокой трудоемкостью и низкой технологичностью [3].

В настоящее время разрабатываются новые подходы к созданию антирабических вакцин. К ним относится в том числе применение плазмидных и вирусных векторов, доставляющих в клетки организма гены целевых антигенов вируса [4, 5]. Основным целевым антигеном вируса бешенства является поверхностный гликопротеин G. Антитела, вырабатываемые к гликопротеину G, обладают нейтрализующей активностью и способны защитить организм от развития болезни.

Одним из наиболее популярных вирусных векторов, применяемых для создания рекомбинантных вакцин, является аденовирус человека 5-го серотипа. Рекомбинантный аденовирус 5-го серотипа (pAd5) обеспечивает высокий уровень экспрессии целевого трансгена в клетке-мишени, индуцирует высокие уровни как гуморального, так и клеточного иммунного ответа [6], он показал свою безопасность во множестве клинических

испытаний [7]. Получение pAd5 проводят в перемываемых культурах клеток, поэтому при производстве нет необходимости в работе с первичными клеточными культурами.

В настоящее время в Канаде и США для вакцинации диких животных успешно применяются вакцины на основе репликативно-компетентного pAd5, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства. Так, ветеринарная вакцина ONRAB® показала себя высокоэффективной при иммунизации множества видов диких плотоядных [8]. Таким образом, перспективным с точки зрения создания новых безопасных и эффективных антирабических вакцин является применение pAd5 в качестве средства доставки генов антигенов вируса бешенства в организм.

**Цель** нашей работы – создание репликативно-дефектного вирусного вектора на основе pAd5, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства, и изучение его защитных и иммуногенных свойств.

## Материал и методы

**Мыши.** В работе были использованы самки мышей линии BALB/c с массой тела 12–15 г (НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, Российская Федерация). Животных содержали в виварии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России согласно действующим правилам [9]. Эвтаназию животных проводили в соответствии с Европейской директивой 2010/63 с помощью углекислого газа [10].

**Вирусные штаммы.** Для оценки гуморального иммунного ответа, а также защитного действия рекомбинантного аденовируса использовали вирус бешенства CVS-11 (фиксированный лабораторный штамм), полученный из ФГБУ «ВГНКИ» Россельхознадзора, г. Москва.

**Клеточные культуры.** Для постановки реакции вирус-нейтрализации была использована культура клеток ВНК-21 С13 (клетки почки новорожденного сирийского золотого хомячка). Для получения и наращивания pAd5 использовали культуру клеток 293-НЕК (клетки эмбриональной почки человека). Клеточные культуры были получены из Коллекции клеточных культур лаборатории культур тканей подразделения Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва.

**Филогенетический анализ и методы построения третичной структуры.** Выравнивание и обработку нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакетов программ Geneious Prime, а филогенетический анализ – с использованием пакета программ MEGA X [11]. Для анализа использовали 1248 последовательностей гена гликопротеина G изолятов, выделенных в Российской Федерации, странах европейского региона и Северной Америке и доступных в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Эволюционная история была выведена с помощью метода присоединения соседей [12]. Показано оптимальное дерево с суммой длин ветвей = 11.56545795.

Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода максимального правдоподобия [13] и выражены в единицах числа базовых замен на участок. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). В конечном наборе данных было всего 1403 позиции.

**Получение рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа.** Последовательность гена гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма РВ-97 (GenBank № AY683208.1) была химически синтезирована (ЗАО «Евроген») и клонирована в плазмиду рAL-TA. Далее целевой ген переклонировали в плазмиду рShuttle-CMV из набора AdEazy Adenoviral vector system (Stratagen, США). Рекомбинантный аденовирус Ad5-RV97 получили в соответствии с инструкцией к набору. Также в работе был использован рAd5, не несущий трансгена, Ad5-null, полученный ранее с помощью того же набора. Титры рAd5 получали на культуре клеток 293-НЕК с помощью реакции бляшкообразования [14]. Изучение экспрессии рекомбинантным аденовирусом гена целевого антигена проводили с помощью иммуноблот-анализа [15].

**Иммунизация лабораторных животных.** Для оценки защитного действия аденовируса Ad5-RV97 животные двух групп по 10 лабораторных мышей в каждой были однократно внутримышечно иммунизированы аденовирусом в дозах  $1 \cdot 10^7$  БОЕ/мышь и  $1 \cdot 10^8$  БОЕ/мышь. Через 28 дней после иммунизации животных заражали вирусом бешенства CVS-11 в дозе 100 ЛД<sub>50</sub> и оценивали их состояние в течение 15 дней после заражения. Для оценки гуморального и клеточного ответа 21 мышь была иммунизирована аденовирусом Ad5-RV97 в дозе  $1 \cdot 10^7$  БОЕ/мышь. Через 14, 28 и 42 дня после иммунизации у шести мышей отбирали сыворотку крови для дальнейшего изучения гуморального иммунного ответа, а у трех мышей через 42 дня после иммунизации отбирали селезенку для дальнейшего изучения клеточного иммунного ответа. В качестве контрольных использовали животных, получавших фосфатный буфер.

**Определение уровня антител к гликопротеину G вируса бешенства с помощью реакции флуоресцентной вирус-нейтрализации.** Для определения гуморального иммунного ответа у иммунизированных мышей их сыворотку крови анализировали с помощью флуоресцентной вирус-нейтрализации (ФВН) [16, 17]. Реакцию проводили в культуре клеток ВНК-21 в 96-луночных плоскодонных планшетах. Клетки добавляли к предварительно проинкубированной вместе смеси исследуемых сывороток и вируса бешенства CVS-11. Через три дня окрашивали зафиксированную клеточную культуру с помощью флуоресцентного антирабического конъюгата (FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, Fujirebio Diagnostics Inc., США). Инфицированные клетки учитывали, осматривая всю поверхность каждой лунки. Результат оценивали качественным образом: отсутствие флуоресцирующих клеток – отрицательный результат, присутствие одной и более флуоресцирующих клеток –

положительный результат. Титры исследуемых сывороток выражали в МЕ/мл, сравнивая полученный для каждой сыворотки результат со стандартной сывороткой (Human Rabies Immunoglobulin BRP-SEE-LEAFLET, Sigma-Aldrich, США) с известным количеством МЕ/мл.

**Получение костномозговых дендритных клеток.** Дендритные клетки (ДК) были получены из костного мозга сингенных интактных мышей [18]. Жизнеспособность и концентрацию клеток определяли методом проточной цитометрии на проточном лазерном цитофлуориметре-сортировщике BD FACSAria II (BD Biosciences, США) с использованием калибровочных шариков CountBright™ (Thermo Fisher Scientific Inc., США, кат. № С36950) и 1 мкг/мл красителя DAPI (Serva, ФРГ).

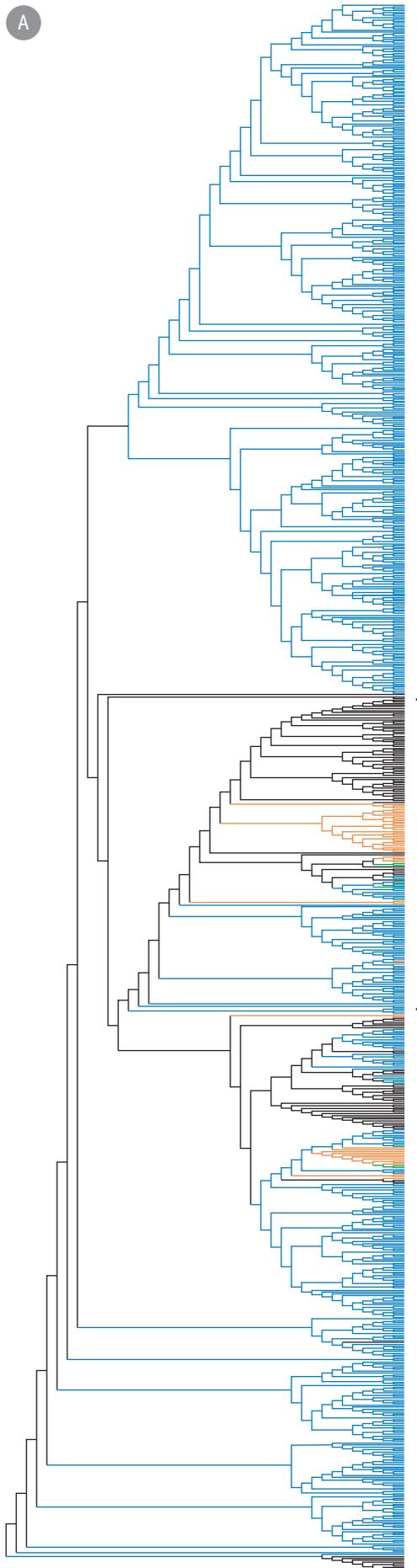
**Выделение спленоцитов и получение популяций CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов.** Через 42 дня после иммунизации у мышей отбирали селезенку, измельчали и спленоциты выделяли на фиколле плотностью 1,09 г/см<sup>3</sup> [14]. Концентрацию и жизнеспособность клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием калибровочных шариков CountBright™ (Thermo Fisher Scientific Inc., США, кат. № С36950) и 1 мкг/мл красителя DAPI (Serva, ФРГ).

Для выделения чистых популяций CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов половину суспензии спленоцитов от каждой мыши окрашивали анти-CD4<sup>+</sup>-APC-Cy7 клон GK 1.5 (Biolegend, США) и анти-CD8<sup>+</sup>-PE-CF594 клон 53-6.7 (BD Biosciences, США) с последующим добавлением раствора DAPI (Serva, ФРГ) в конечной концентрации 1 мкг/мл. Клетки анализировали и сортировали на цитофлуориметре-сортировщике BD FACSAria II (BD Biosciences, США). Чистота отсортированных популяций CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток составляла 95–97 %.

**Изучение Т-клеточного ответа на гликопротеин G вируса бешенства у иммунизированных животных.** Для оценки Т-клеточного иммунного ответа в лунки 96-луночного планшета для ELISpot (mouse IFN-γ ELISPOT Kit, кат. № 552569, BD Biosciences, США) вносили 150 мкл суспензии ДК (50000 ДК на лунку) в среде DMEM с добавлением 100 нг/мл липополисахарида [LPS Escherichia coli 055:B5(L-2880), Sigma-Aldrich, США]. В часть лунок добавляли Ad5-RV97 из расчета 100 БОЕ/клетка, в часть лунок добавляли Ad5-null из расчета 100 БОЕ/клетка, остальные лунки оставляли в качестве контроля. Планшет с ДК инкубировали 20 ч. На следующий день в вертикальные ряды добавляли по 50 мкл суспензии тестируемых клеток: спленоциты (100 тыс. на лунку), очищенные CD4<sup>+</sup>- (100 тыс. на лунку) и очищенные CD<sup>+</sup>-Т-клетки (50 тыс. на лунку) от каждой индивидуальной мыши.

Планшет, содержащий совместную культуру ДК и тестируемых клеток, инкубировали в течение 20 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Далее планшет обрабатывали по протоколу производителя раствором детектирующих антител к ИФН-γ (ELISPOT Mouse IFN-γ set BD Biosciences, США, кат. № 551083), как описано в [14].

После обработки каждую лунку индивидуально фотографировали с помощью бинокулярной лупы



МБС-10 ( $\times 4$ ) и цифровой камеры Levenhuk DCM800 с разрешением 1280 $\times$ 960 pxls. Количество точек (зон ИФН- $\gamma$ , образованных одиночными клетками в лунках) подсчитывали с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США). Результаты выражали в количестве точек в пересчете на 1 млн клеток [19].

**Статистическую обработку** выживаемости животных проводили – с помощью критерия Гехана–Бреслоу–Вилкоксона, значений титров антител с помощью двухстороннего  $t$ -критерия Стьюдента, а обработку результатов анализа Т-клеточного иммунного ответа – с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (to-way analysis of variance, ANOVA). Для статистической обработки была использована программа GraphPad Prism 5.0.

## Результаты

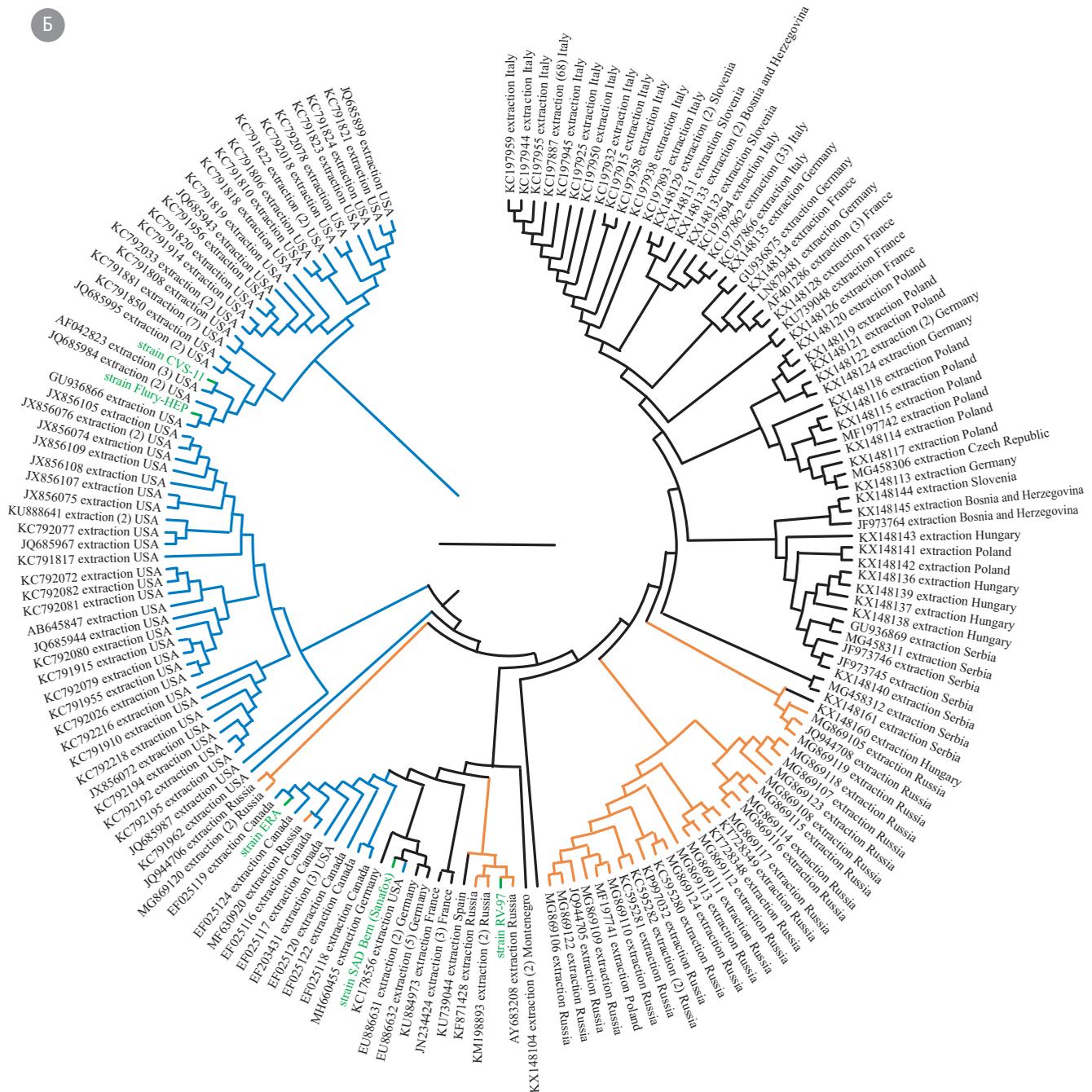
**Изучение филогенетического родства с полевыми изолятами гликопротеина G вакцинного штамма вируса бешенства RB-97.** Для получения эффективной антирабической вакцины на основе рАд5, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства, необходимо было подобрать источник гена гликопротеина G, наиболее подходящего для иммунизации лиц, проживающих на территории Российской Федерации. Анализ литературных данных показал, что наиболее популярным «донором» гена гликопротеина G вируса бешенства для получения рекомбинантных вирусных векторов является вакцинный штамм вируса бешенства ERA (Evelyn-Rokitnicki-Abelseth) [20, 21]. Он был получен из штамма SAD (Street Alabama Duffring), выделенного из слюнных желез бешеной собаки в штате Алабама, США. На основе гена гликопротеина G вируса бешенства штамма ERA были созданы ветеринарные вакцины ONRAB<sup>®</sup> (репликативно-компетентный рАд5, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства) [7] и RABORAL<sup>®</sup> (рекомбинантный вирус осповакцины, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства) [22].

Однако согласно литературным данным, вирусы бешенства не являются генетически однородными и разделяются на различные филогенетические группы, соотносящиеся с местом выделения [23]. Таким образом, можно предположить, что штамм ERA, полученный из изолята, выделенного на территории Северной Америки, по нуклеотидной последовательности будет достаточно далек от штаммов, циркулирующих на территории Российской Федерации. Более логичным видится использование в качестве «донора» гена гликопротеина G вакцинного штамма, хорошо показавшего себя при применении на территории Российской Федерации и являющегося европейским или азиатским по проис-

**Рис. 1.** (Начало) Филогенетическое дерево, построенное на основе алгоритма присоединения соседей с использованием нуклеотидных последовательностей внеклеточных доменов гликопротеина G вируса бешенства:

A – филогенетическое дерево

Б

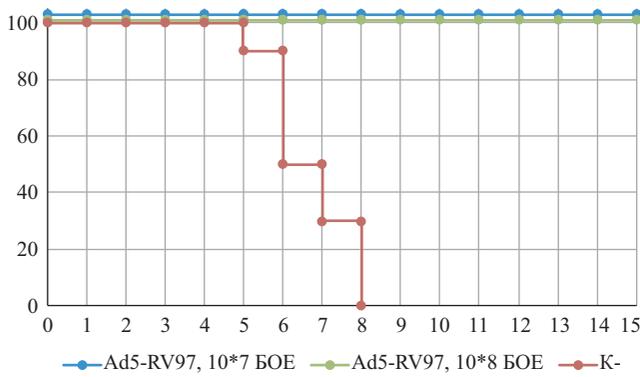


**Рис. 1.** (Окончание) Филогенетическое дерево, построенное на основе алгоритма присоединения соседей с использованием нуклеотидных последовательностей внеклеточных доменов гликопротеина G вируса бешенства:

Б – фрагмент филогенетического дерева, выделенный рамкой на рис. 1, А. Голубым цветом показаны штаммы североамериканского происхождения, черным цветом – европейского происхождения, оранжевым – российского происхождения, зеленым цветом – вакцинные штаммы вируса бешенства.

хождению. Наиболее подходящим на эту роль нам видится вакцинный штамм вируса бешенства РВ-97. Этот штамм хорошо показал себя при вакцинации животных (вакцины «СИНРАБ», ФГБУ «ВНИИЗЖ», ФКП «Щелковский биокомбинат», г. Щелково, «РАБИСТАВ» ФКП «Ставропольская биофабрика», г. Ставрополь) [24] на территории Российской Федерации, а кроме того, он является прямым потомком Пастеровского штамма, имеющего несомненное европейское происхождение [25].

Для подтверждения этой гипотезы нами было изучено родство вакцинных штаммов ERA и РВ-97 и их близость к изолятам, циркулирующим на территории Европы, Российской Федерации и Североамериканского региона. Для этого нами были отобраны все гены гликопротеина G вируса бешенства, доступные в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), выделенные на территории Европы, Российской Федерации или Северной Америки (всего 1248 последовательностей).



**Рис. 2.** Выживаемость животных, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-RV97, после заражения 100 ЛД<sub>50</sub> вируса бешенства CVS-11. Животные получали 1 · 10<sup>7</sup> БОЕ/мышь Ad5-RV97, 1 · 10<sup>8</sup> БОЕ/мышь Ad5-RV97 и фосфатный буфер (К-). Показана посуточная динамика % выживших животных

По оси абсцисс – продолжительность наблюдения после заражения, сут; по оси ординат – доля выживших животных, %. Показана достоверная разница между выживаемостью в опытной и контрольной группах ( $p < 0,005$ ).

Последовательности были выровнены и на них были отмечены основные функциональные домены. Так как лидерный пептид встречается только у незрелого протеина [26], первые 19 аминокислот лидерного пептида были исключены из анализа. Так же из анализа были исключены трансмембранный и цитоплазматический домены, достаточно вариабельные и при этом не содержащие известные антигенные сайты [27].

Таким образом, филогенетический анализ проводился на основании последовательностей, кодирующих поверхностную часть гликопротеина G с помощью пакета программ MEGA X [11] по алгоритму присоединения соседей [12]. Полученная филограмма представлена на рис. 1.

Как видно из рис. 1А, группа, содержащая вакцинные штаммы PB-97, ERA, SAD Bern и Flury-NEP, включает почти все штаммы европейского и российского происхождения и часть североамериканских штаммов. При этом вакцинный штамм PB-97 находится в центре российско-европейской части группы, тогда как вакцинные штаммы ERA, SAD Bern и Flury-NEP находятся на ее североамериканских ветках (см. рис. 1Б). Таким образом, по нуклеотидной последовательности внеклеточной части гликопротеина G штамм PB-97 более близок к последовательностям штаммов, циркулирующих на территории Российской Федерации, чем вакцинный штамм ERA.

Исходя из вышеизложенного ген гликопротеина G вакцинного штамма вируса бешенства PB-97 был выбран для получения целевого рАд5, нами был сконструирован аденовирус Ad5-RV97, экспрессирующий ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма PB-97.

**Защитное антирабическое действие рекомбинантного аденовируса, экспрессирующего ген глико-**

**протеина G вируса бешенства, при иммунизации лабораторных мышей.** Для оценки защитного действия аденовируса Ad5-RV97 лабораторные мыши были иммунизированы однократно внутримышечно Ad5-RV97 в дозах 1 · 10<sup>7</sup> БОЕ/мышь и 1 · 10<sup>8</sup> БОЕ/мышь. Через 28 дней после иммунизации животных заражали вирусом бешенства CVS-11 в дозе 100 ЛД<sub>50</sub> на животное. За животными наблюдали в течение 15 дней после заражения, результаты представлены на рис. 2.

На протяжении четырех дней после инфицирования ни одно животное не проявляло клинических симптомов заболевания. На пятый день у большинства контрольных животных наблюдались шаткость походки, сгорбленная спина и взъерошенная шерсть. На шестой день 50 % животных в контрольной группе пало, у остальных, помимо вышеперечисленных симптомов, наблюдались параличи конечностей. В течение восьми дней после инфицирования умерли все контрольные животные. Иммунизированные Ad5-RV97 животные не проявляли никаких признаков заболевания. К 15-му дню после заражения вирусом бешенства у животных, иммунизированных Ad5-RV97 в обеих дозах, выживаемость составила 100 %. Таким образом, был показан высокий уровень защитных свойств обеих доз рекомбинантного аденовируса Ad5-RV97. Для дальнейшего изучения механизма защитного действия была выбрана более низкая доза – 10<sup>7</sup> БОЕ/животное.

**Изучение гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим ген гликопротеина G вируса бешенства.** Сыворотки крови мышей, полученные через 14, 28 и 42 дня после иммунизации аденовирусом Ad5-RV97, были исследованы с помощью ФВН в культуре клеток ВНК-21. Результаты оценки уровня вируснейтрализующих антител в сыворотке крови иммунизированных животных представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, на 14-й день после иммунизации средний уровень антител у иммунизированных животных составил 10,2 МЕ/мл. На 28-й день наблюдалось достоверное увеличение уровня нейтрализующих антител по сравнению с 14-м днем ( $p < 0,05$ ) до 72 МЕ/мл. К 42-му дню продолжался достоверный прирост уровня антител по сравнению с 28-м днем ( $p < 0,05$ ) и средний уровень антител составил 92,3 МЕ/мл. При этом уровень антител в контрольной группе не превышал 0,01 МЕ/мл.

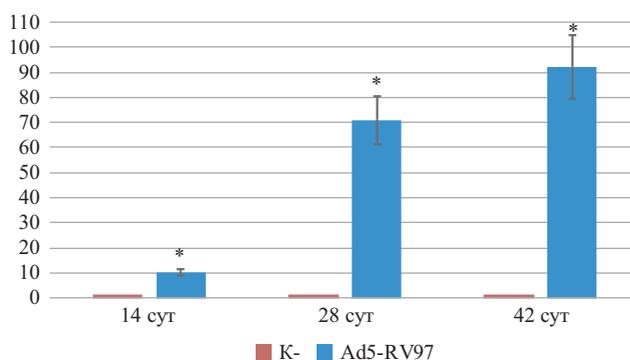
Таким образом, показано образование защитных уровней вируснейтрализующих антител после иммунизации животных аденовирусом Ad5-RV97 в дозе 10<sup>7</sup> БОЕ/животное уже к 14-му дню после иммунизации и значительное увеличение их уровня к 42-му дню после иммунизации.

**Изучение специфического Т-клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим ген гликопротеина G вируса бешенства.** Т-клеточный иммунный ответ оценивали с помощью метода ELISpot, основанного на детекции цитокинов, секретируемых

индивидуальными клетками [28]. В нашей работе ДК путем трансдукции аденовирусом Ad5-RV97 трансформировали в антиген-презентирующие клетки, экспрессирующие эпитопы целевого антигена в комплексе с молекулами МНС-I и МНС-II. Из селезенки иммунизированных Ad5-RV97 и контрольных мышей путем сортировки на проточном лазерном цитофлуориметре получали высокоочищенные (чистота 95–97 %) популяции CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток. При сокультивировании CD8<sup>+</sup>-Т-клеток с ДК, экспрессирующими эпитопы целевого антигена в комплексе с молекулами МНС-I, и CD4<sup>+</sup>-Т-клеток с ДК, экспрессирующими эпитопы целевого антигена в комплексе с молекулами МНС-II, Т-клетки начинали секретировать ИФН-γ. Далее с помощью набора ELISpot была детектирована секреция ИФН-γ индивидуальными клетками.

Результаты определения уровня Т-клеточного ответа у иммунизированных мышей на эпитопы гликопротеина G вируса бешенства представлены на рис. 4.

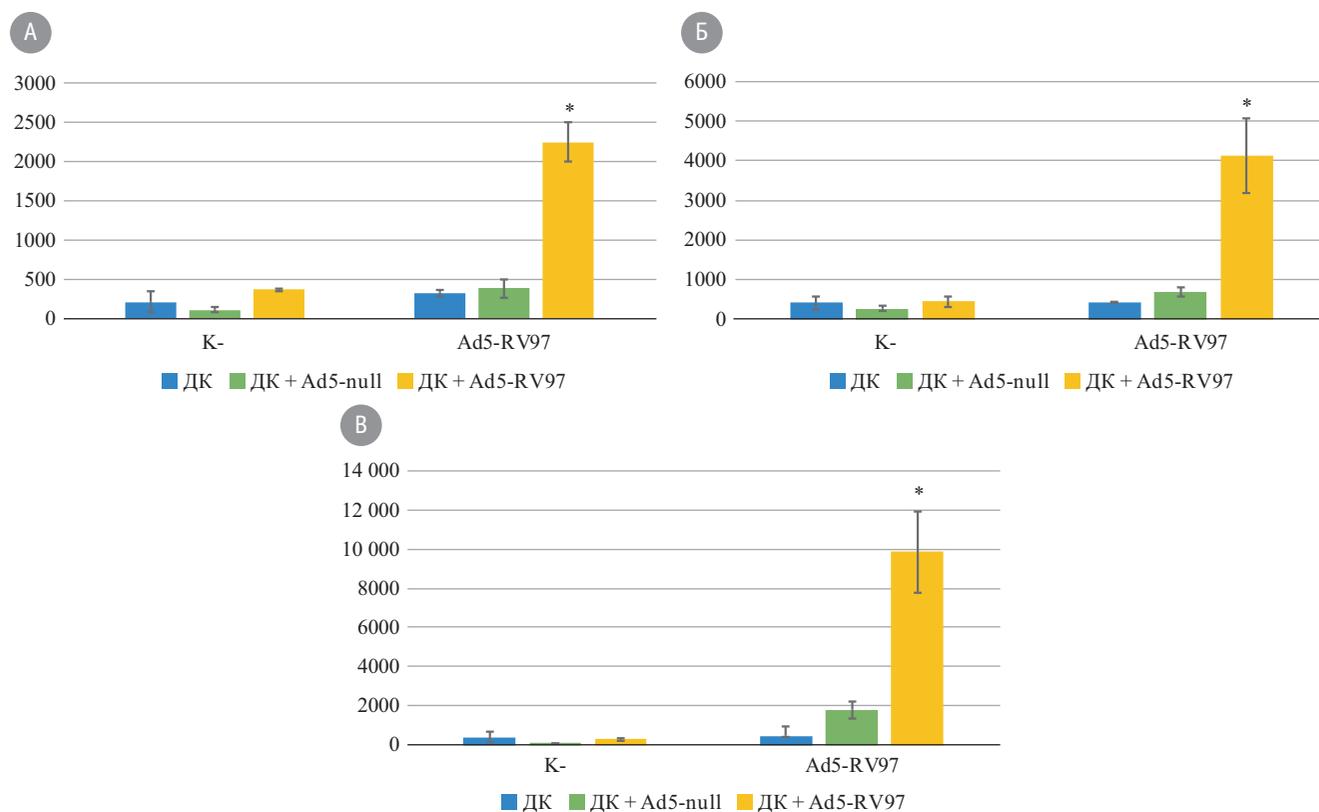
При реактивации спленоцитов иммунизированных животных ДК, презентующими эпитопы гликопротеина G вируса бешенства, наблюдался достоверный прирост количества ИФН-γ-секретирующих клеток. При реактивации спленоцитов иммунизированных животных ДК без антигенной нагрузки или ДК, обработанными Ad5-null, достоверного прироста количества



**Рис. 3.** Динамика изменения титров нейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотке крови мышей, иммунизированных Ad5-RV97 и контрольных животных (К-).

По оси абсцисс – изменения титров после иммунизации через 14, 28 и 42 сут; по оси ординат – средний уровень антител, выраженный в МЕ/мл; \* – достоверная разница между уровнем антител в опытной и контрольной группах,  $p < 0,05$ .

ИФН-γ-секретирующих клеток не наблюдалось. Также не наблюдалось достоверного прироста количества ИФН-γ-секретирующих клеток в спленоцитах мышей из контрольной группы как реактивированными ДК, обработанными Ad5-null и Ad5-RV97, так и ДК без антигенной нагрузки (см. рис. 4А). Наличие у иммунизи-



**Рис. 4.** Определение количества спленоцитов, CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток мышей, иммунизированных Ad5-RV97, отвечающих секрецией ИФН-γ на специфическую реактивацию дендритными клетками, «нагруженными» гликопротеином G вируса бешенства. По оси ординат – среднее количество ИФН-γ-секретирующих спленоцитов (А), очищенных CD4<sup>+</sup>-клеток (Б) и очищенных CD8<sup>+</sup>-клеток (В) (из расчета на 1 млн клеток селезенки) у интактных мышей (К-) и мышей, иммунизированных Ad5-RV97, в ответ на их рестимуляцию ДК, трансфицированными Ad5-null, Ad5-RV97, а также без трансфекции; \* – достоверная разница между количеством клеток в опытной и контрольной группах,  $p < 0,05$ .

ванных Ad-RV97 животных ИФН- $\gamma$ -продуцирующих CD4<sup>+</sup>-Т-клеток было нами показано через реактивацию отсортированных CD4<sup>+</sup>-Т-клеток ДК, трансдуцированными Ad5-RV97. Показан достоверный прирост уровня ИФН- $\gamma$ -секретирующих CD4<sup>+</sup>-Т-клеток после реактивации ДК, презентующими эпитопы гликопротеина G вируса бешенства (см. рис. 4Б). Также мы обнаружили значительное количество ИФН- $\gamma$ -продуцирующих CD8<sup>+</sup>-Т-клеток, способных узнавать эпитопы гликопротеина G вируса бешенства, презентуемые ДК (см. рис. 4В).

## Обсуждение

Современные инактивированные вакцины против бешенства считаются достаточно эффективными, но они не лишены ряда недостатков. К таким недостаткам относятся их реактогенность, многократная схема введения и необходимость работы при их производстве с живыми штаммами вируса бешенства. При этом свою эффективность на животных показали новые типы антирабических вакцин – вакцины на основе вирусных векторов, несущих ген основного антигена вируса бешенства – гликопротеина G [2]. Перспективным является создание антирабических вакцин на основе рекомбинантных вирусных векторов для ПрЭП групп риска путем однократного введения, что исключит возможность неполного прохождения курса вакцинации. Заметное количество вакцин на основе вирусных векторов против широкого ряда патогенов уже прошло клинические испытания безопасности, и одной из самых многочисленных групп вакцин здесь являются вакцины на основе rAd5. Показали свою безопасность вакцины на основе rAd5 против гриппа, малярии, лихорадки Эбола, туберкулеза, респираторно-синцитиального вируса и др. [29], это позволяет рассчитывать на низкую реактогенность и высокую безопасность кандидатных антирабических вакцин на основе rAd5.

Одной из основных задач при создании антирабической вакцины на основе вирусных векторов является правильный подбор целевого антигена. Как известно, основным антигеном вируса бешенства, вызывающим образование вирус-нейтрализующих антител, является поверхностный гликопротеин G. Считается, что наличие в крови вирус-нейтрализующих антител к гликопротеину G в количестве более 0,5 МЕ/мл обеспечивает полную защиту от заражения [30]. Нами была проведена аналитическая работа по подбору наиболее подходящего штамма вируса бешенства, который мог бы послужить «донором» гена гликопротеина G для создания рекомбинантной вакцины на основе rAd5. Литературные данные показывают, что наиболее часто в качестве таких «доноров» выступают вакцинные штаммы вируса бешенства, хорошо показавшие себя при проведении программ вакцинирования как населения, так и диких и домашних животных. Среди существующих в Российской Федерации вакцинных штаммов Москва 3253, Овечий-ВГНКИ, Щелково-51 [23], РБ-71, ВНИИЗЖ и РВ-97 [24] являются прямыми потомками Пастеровского штамма, выделенного на территории Европы. На

основе штамма РВ-97 были созданы живые оральные вакцины для иммунизации диких плотоядных – СИНРАБ<sup>®</sup>, ОРАЛРАБИВАК<sup>®</sup> и РАБИСТАВ<sup>®</sup>, которые показали свою эффективность при многократном использовании в различных регионах Российской Федерации начиная с 2003 г. [24]. Поэтому штамм РВ-97 был выбран наиболее подходящим «донором» гена гликопротеина G для конструирования rAd5, несущего ген гликопротеина G вируса бешенства.

Для оценки близости последовательности гликопротеина G штамма РВ-97 к последовательностям гликопротеинов из изолятов вирусов бешенства, выделенных на территории Российской Федерации, нами был проведен филогенетический анализ. На рис. 1 видно, что нуклеотидная последовательность внеклеточной части (несущей все известные антигенные сайты) гликопротеина G штамма РВ-97 находится в группе последовательностей из штаммов европейского и российского происхождения.

Нами был получен рекомбинантный аденовирус, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства штамма РВ-97 (Ad5-RV97), и для оценки его защитных свойств была проведена однократная внутримышечная иммунизация лабораторных мышей аденовирусом Ad5-RV97 в дозах 10<sup>7</sup> и 10<sup>8</sup> БОЕ/животное. Обе дозы показали свою протективность при заражении животных фиксированным штаммом вируса бешенства CVS-11. У животных не наблюдалось симптомов заболевания, и выживаемость через 15 дней после заражения составила 100 %. При этом в контрольной группе все животные пали уже на 8-й день после заражения (см. рис. 2). Для дальнейшего исследования иммуногенных свойств аденовируса Ad5-RV97 была выбрана меньшая доза – 10<sup>7</sup> БОЕ/животное. Стоит отметить, что фиксированный штамм, используемый для экспериментального заражения вирусом бешенства – CVS-11, находится на филогенетическом дереве среди североамериканских штаммов (см. рис. 1). Поэтому успешная защита от этого штамма говорит о широте действия полученного rAd5 и о его способности защищать от штаммов вируса бешенства, циркулирующих не только на территории Европы и Российской Федерации.

Согласно литературным данным, гуморальный иммунный ответ играет доминирующую роль в защитном иммунитете против вируса бешенства [32]. Для оценки гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных аденовирусом Ad5-RV97, был изучен уровень вирус-нейтрализующих антител. Содержание в сыворотках крови вирус-нейтрализующих антител в количестве более 0,5 МЕ/мл считается достаточным для защиты от заражения [30], при этом после лечебно-профилактических прививок титры вирус-нейтрализующих антител, как правило, не превышают 10 МЕ/мл [33]. В нашей работе было показано, что иммунизация Ad5-RV97 приводит к образованию антирабических антител в количестве, существенно превышающем 0,5 МЕ/мл уже с 14-го дня после иммунизации (см. рис. 3). На 14-й день после иммунизации средний титр антител составил 10,2 МЕ/мл, на 28-й день после иммунизации – 72 МЕ/мл, а к 48-му дню после имму-

низации достиг 92,3 МЕ/мл. При этом уровень антител в контрольной группе не превышал 0,01 МЕ/мл. Таким образом, можно с уверенностью сказать, что уже через две недели после иммунизации животные обладали защитным титром антирабических антител, а к 42-му дню после иммунизации этот титр существенно превышал обычные уровни антител, получаемые в результате ПрЭП.

При оценке эффективности антирабических вакцин традиционно используют такой показатель, как уровень вирус-нейтрализующих антител, в то время как влияние Т-клеточного иммунитета на эффективность вакцинации изучена гораздо менее широко. Однако существующие литературные данные указывают на важность Т-клеточного иммунитета в формировании защиты от вируса бешенства [34]. В нашей работе было оценено количество CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-клеток, способных секретировать ИФН- $\gamma$  в ответ на стимуляцию антиген-презентирующими ДК. ДК были трансформированы в антиген-презентирующие с помощью трансдукции аденовирусом Ad5-RV97. В результате ДК стали способны презентировать эпитопы гликопротеина G вируса бешенства как в комплексе с молекулами МНС-I, так и с молекулами МНС-II, что позволило стимулировать как CD4<sup>+</sup>-, так и CD8<sup>+</sup>-иммунные клетки, реагирующие на различные эпитопы вируса бешенства (см. рис. 4). Среднее количество спленоцитов, реагирующих продукцией ИФН- $\gamma$  в ответ на стимуляцию ДК, трансдуцированными Ad5-RV97, у иммунизированных животных составило  $2246 \pm 253$  на 1 млн клеток селезенки, тогда как у контрольных мышей –  $366 \pm 15$ . Среднее количество CD4<sup>+</sup>-клеток, реагирующих продукцией ИФН- $\gamma$  в ответ на стимуляцию ДК, трансдуцированными Ad5-RV97, у иммунизированных животных составило  $4126 \pm 951$  на 1 млн CD4<sup>+</sup>-клеток, тогда как у контрольных мышей –  $433 \pm 143$ . Среднее количество CD8<sup>+</sup>-клеток, реагирующих продукцией ИФН- $\gamma$  в ответ на стимуляцию ДК, трансдуцированными Ad5-RV97, у иммунизированных животных составило  $9846 \pm 2070$  на 1 млн CD4<sup>+</sup>-клеток, тогда как у контрольных мышей  $280 \pm 81$ . Таким образом, нами был продемонстрирован значимый как CD4<sup>+</sup>-, так и CD8<sup>+</sup>-клеточный иммунный ответ на введение мышам рекомбинантного аденовируса Ad5-RV97.

## ■ Литература

- Hatz C.F., Kuenzli E., Funk M. Rabies: relevance, prevention, and management in travel medicine. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2012; 26 (3): 739–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.05.001>.
- Седова Е.С., Шмаров М.М. Новые антирабические рекомбинантные вакцины. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016; 16 (4): 219–28.
- Грачев В.П., Хапчаев Ю.Х. Применение перевиваемых линий клеток человека и животных для изготовления вирусных вакцин. *ЖМЭИ.* 2008; 1: 82–90.
- Liu C., Li J., Yao Q., Gao Z., Cheng Y., Zhou M. et al. AAV-expressed G protein induces robust humoral and cellular immune response and provides durable protection from rabies virus challenges in mice. *Vet. Microbiol.* 2020; 242: 108578. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108578>
- Wang X., Fang Z., Xiong J., Yang K., Chi Y., Tang X. et al. A chimpanzee adenoviral vector-based rabies vaccine protects beagle

## Заключение

Сконструированный нами рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма РВ-97, показал при иммунизации лабораторных мышей высокий уровень защитных свойств против вируса бешенства, а также значимые уровни гуморального и клеточного антирабического иммунного ответа. Полученные данные позволяют расценивать аденовирус Ad5-RV97 в качестве основы для создания кандидатной антирабической вакцины, которая может применяться для ПрЭП различных групп риска. В дальнейшем планируется изучение длительности полученного при иммунизации Ad5-RV97 иммунного ответа, а также возможность влияния на уровень антирабического иммунного ответа предшествующих антител к аденовирусу человека 5-го серотипа.

## Вклад авторов

Идея, концепция и дизайн исследования – Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л., Метлин А.Е.; утверждение окончательной версии статьи для публикации – Шмаров М.М.; интерпретация результатов исследования, доработка текста – Алексеева С.В., Тутькина И.Л.; написание текста – Седова Е.С., Никонова А.Э.; консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ – Метлин А.Е., Логунов Д.Ю., Атауллаханов Р.И., Народицкий Б.С., Щербинин Д.Н.; сбор и систематизация данных – Никонова А.Э., Верховская Л.В.; проведение работ по получению рекомбинантного аденовируса – Седова Е.С., Тутькина И.Л., Верховская Л.В.; проведение биоинформатических исследований – Никонова А.Э., Щербинин Д.Н.; статистическая обработка данных – Никонова А.Э.; дизайн исследования по проведению работ с вирусом бешенства – Гребенникова Т.В.; проведение работ с вирусом бешенства – Елаков А.Л., Лосич М.А., Зайкова О.Н., Чернышова Е.В., Сергеев О.В., Баринский И.Ф.; проведение иммунизации животных, отбора образцов крови – Артемова Э.А.; дизайн исследования по изучению Т-клеточного ответа у животных – Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В.; изучение Т-клеточного ответа у животных – Лебедева Е.С., Чулкина М.М.

dogs from lethal rabies virus challenge. *Virology.* 2019; 536: 32–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.07.022>

- Ковыршина А.В., Должикова И.В., Гроусова Д.М., Балясин М.В., Ботиков А.Г., Панина Л.В. и др. Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ. *Иммунология.* 2020; 41 (2): 135–43. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143>
- Zhang C., Zhou D. Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12 (8): 2064–74. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1165908>
- Sobey K.G., Jamieson S.E., Walpole A.A., Rosatte R.C., Donovan D., Fehlner-Gardiner C. et al. ONRAB® oral rabies vaccine is shed from, but does not persist in, captive mammals. *Vaccine.* 2019; 37 (31): 4310–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.046>

9. ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (Переиздание).
10. Рыбакова А.В., Макарова М.Н. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской Директивой 2010/63. *Международный вестник ветеринарии*. 2015; (2): 96–107.
11. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35: 1547–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
12. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 11 030–5. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
13. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4: 406–25.
14. Tutykhina I., Esmagambetov I., Bagaev A., Pichugin A., Lysenko A., Shcherbinin D. et al. Vaccination potential of B and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts. *PLoS One*. 2018; 13 (1): e0191574 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
15. Есмагамбетов И.Б., Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Гарас М.Н., Шмаров М.М. и др. Конструирование рекомбинантного аденовируса человека, экспрессирующего гены консервативных антигенов вируса гриппа А ионного канала М2 и нуклеопротеина. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014; 2: 22–8. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416814020050>
16. Cliquet F., Aubert M., Sagne L. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods*. 1998; 212 (1): 79–87.
17. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6th ed. 2008. URL: <https://www.oie.int/doc/ged/D7710.PDF>
18. Madaan A., Verma R., Singh A.T., Jain S.K., Jaggi M. A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *J. Biol. Methods*. 2014; 1: e1. DOI: <https://doi.org/10.14440/jbm.2014.12>
19. Pichugin A., Bagaev A., Ataulkhanov R. High-fidelity detection of IFN- $\gamma$  secreting CD4 and CD8 cells in response to soluble or Ad5 transduced influenza antigens using ELISPOT and cell sorting. *PLoS ONE*. 13 (1): e0191574. DOI: <https://doi.org/10.17504/protocols.io.jn4cmgw>
20. Wang C., Dulal P., Zhou X., Xiang Z., Goharriz H., Banyard A. et al. A simian-adenovirus-vectored rabies vaccine suitable for thermostabilisation and clinical development for low-cost single-dose pre-exposure prophylaxis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12 (10): e0006870. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006870>
21. Zhou D., Cun A., Li Y., Xiang Z., Ertl H.C. A chimpanzee-origin adenovirus vector expressing the rabies virus glycoprotein as an oral vaccine against inhalation infection with rabies virus. *Mol. Ther.* 2006; 14 (5): 662–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yimthe.2006.03.027>
22. Maki J., Guiot A.L., Aubert M., Brochier B., Cliquet F., Hanlon C.A. Oral vaccination of wildlife using a vaccinia-rabies-glycoprotein recombinant virus vaccine (RABORAL V-RG®): a global review. *Vet. Res.* 2017; 48 (1): 57. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0459-9>
23. Deviatkin A.A., Lukashev A.N., Poleshchuk E.M., Dedkov V.G., Tkachev S.E., Sidorov G.N. et al. The phylogenetics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS One*. 2017; 12 (2): e0171855. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
24. Borisov A.V., Savvin A.V., Mikhailishin V.V. Gruzdev K.N., Domskey I.A. Determination of efficacy of rabies vaccine in the Saratov Region. *Dev. Biol.* 2006; 125: 217–20.
25. Metlin A., Paulin L., Suomalainen S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhailishin V., Huovilainen A. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132 (1–2): 242–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.016>
26. Luo T.R., Minamoto N., Hishida M., Yamamoto K., Fujise T., Hiraga S. et al. Antigenic and functional analyses of glycoprotein of rabies virus using monoclonal antibodies. *Microbiol. Immunol.* 1998; 42 (3): 187–93.
27. Fallahi F., Wandeler A.I., Nadin-Davis S.A. Characterization of epitopes on the rabies virus glycoprotein by selection and analysis of epitope mutants. *Virus Res.* 2016; 220: 161–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.019>
28. McElhane J.E., Xie D., Hager W.D., Barry M.B., Wang Y., Kleppinger A. et al. T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly. *J. Immunol.* 2006; 176: 6333–9.
29. Черенова Л.В., Каштиго Т.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М. Разработка вакцин на основе аденовирусных векторов: обзор зарубежных клинических исследований (часть 2). *Медицинская иммунология*. 2017; 19 (4): 329–58.
30. WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series 1012. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf?ua=1>
31. Пухова Н.М., Самуйленко А.Я., Еремец В.И., Еремец Н.К., Иванов И.В., Салов Д.А. и др. Основные направления разработки и внедрения антирабических вакцин из шт. Щелково-51. *Ветеринарная медицина*. 2011; 95: 175–7.
32. Yang F., Lin S., Ye F., Yang J., Qi J., Chen Z. et al. Structural analysis of rabies virus glycoprotein reveals pH-dependent conformational changes and interactions with a neutralizing antibody. *Cell Host Microbe*. 2020; 27 (3): 441–53.e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.12.012>
33. Udow S.J., Marrie R.A., Jackson A.C. Clinical features of dog- and bat-acquired rabies in humans. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57: 689–96. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cit372>
34. Overduin L.A., van Dongen J.J.M., Visser L.G. The cellular immune response to rabies vaccination: a systematic review. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7 (3): E110. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines7030110>

## ■ References

1. Hatz C.F., Kuenzli E., Funk M. Rabies: relevance, prevention, and management in travel medicine. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2012; 26 (3): 739–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.05.001>
2. Sedova E.S., Shmarov M.M. New recombinant rabies vaccines. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2016; 16 (4): 219–28. (in Russian)
3. Grachev V.P., Khapchaev Yu.Kh. Use of continuous human and animal cell lines for the production of viral vaccines. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2008; 1: 82–90. (in Russian)
4. Liu C., Li J., Yao Q., Gao Z., Cheng Y., Zhou M., et al. AAV-expressed G protein induces robust humoral and cellular immune response and provides durable protection from rabies virus challenges in mice. *Vet. Microbiol.* 2020; 242: 108578. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108578>
5. Wang X., Fang Z., Xiong J., Yang K., Chi Y., Tang X., et al. A chimpanzee adenoviral vector-based rabies vaccine protects beagle dogs from lethal rabies virus challenge. *Virology*. 2019; 536: 32–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.07.022>
6. Kovyrshina A.V., Dolzhikova I.V., Grousova D.M. Balyasin M.V., Botikov A.G., Panina L.V., et al. A heterologous virus-vectored vaccine for prevention of Middle East respiratory syndrome induces long protective immune response against MERS-CoV. *Immunologiya*. 2020; 41 (2): 135–43. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143> (in Russian)
7. Zhang C., Zhou D. Adenoviral vector-based strategies against infectious disease and cancer. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12 (8): 2064–74. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1165908>
8. Sobey K.G., Jamieson S.E., Walpole A.A., Rosatte R.C., Donovan D., Fehlner-Gardiner C., et al. ONRAB® oral rabies vaccine is shed from, but does not persist in, captive mammals. *Vaccine*. 2019; 37 (31): 4310–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.046>
9. GOST 33216-2014. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits (reprint). (in Russian)
10. Rybakova A.V., Makarova M.N. Methods of euthanasia of laboratory animals, in accordance with European Directive 2010/63. *Mezhdunarodniy vestnik veterinarii*. 2015; (2): 96–107 (in Russian)
11. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35: 1547–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

12. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 11 030–5. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
13. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4: 406–25.
14. Tutukhina I., Esmagambetov I., Bagaev A., Pichugin A., Lysenko A., Shcherbinin D., et al. Vaccination potential of FB and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts. *PLoS One*. 2018; 13 (1): e0191574 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
15. Esmagambetov I.B., Sedova E.S., Shcherbinin D.N., Lysenko A.A., Garas M.N., Shmarov M.M., et al. Construction of recombinant adenoviral vector expressing genes of the conservative proteins M2 «ion channel» and nucleoprotein of influenza A virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2014; 29: 69–76. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416814020050> (in Russian)
16. Cliquet F., Aubert M., Sagne L. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods*. 1998; 212 (1): 79–87.
17. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6th ed. 2008. URL: <https://www.oie.int/doc/ged/D7710.PDF>
18. Madaan A., Verma R., Singh A.T., Jain S.K., Jaggi M. A step-wise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *J. Biol. Methods*. 2014; 1: e1. DOI: <https://doi.org/10.14440/jbm.2014.12>
19. Pichugin A., Bagaev A., Ataulakhanov R. High-fidelity detection of IFN- $\gamma$  secreting CD4 and CD8 cells in response to soluble or Ad5 transduced influenza antigens using ELISPOT and cell sorting. *PLoS ONE*. 13 (1): e0191574. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
20. Wang C., Dulal P., Zhou X., Xiang Z., Goharriz H., Banyard A., et al. A simian-adenovirus-vectored rabies vaccine suitable for thermostabilisation and clinical development for low-cost single-dose pre-exposure prophylaxis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12 (10): e0006870. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006870>
21. Zhou D., Cun A., Li Y., Xiang Z., Ertl H.C. A chimpanzee-origin adenovirus vector expressing the rabies virus glycoprotein as an oral vaccine against inhalation infection with rabies virus. *Mol. Ther.* 2006; 14 (5): 662–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.027>
22. Maki J., Guiot A.L., Aubert M., Brochier B., Cliquet F., Hanlon C.A. Oral vaccination of wildlife using a vaccinia-rabies-glycoprotein recombinant virus vaccine (RABORAL V-RG<sup>®</sup>): a global review. *Vet. Res.* 2017; 48 (1): 57. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0459-9>
23. Deviatkin A.A., Lukashev A.N., Poleshchuk E.M., Dedkov V.G., Tkachev S.E., Sidorov G.N., et al. The phylogenetics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS One*. 2017; 12 (2): e0171855. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
24. Borisov A.V., Savvin A.V., Mikhailishin V.V., Gruzdev K.N., Domskey I.A. Determination of efficacy of rabies vaccine in the Saratov Region. *Dev. Biol.* 2006; 125: 217–20.
25. Metlin A., Paulin L., Suomalainen S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhailishin V., Huovilainen A. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132 (1–2): 242–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.016>
26. Luo T.R., Minamoto N., Hishida M., Yamamoto K., Fujise T., Hiraga S., et al. Antigenic and functional analyses of glycoprotein of rabies virus using monoclonal antibodies. *Microbiol. Immunol.* 1998; 42 (3): 187–93.
27. Fallahi F., Wandeler A.I., Nadin-Davis S.A. Characterization of epitopes on the rabies virus glycoprotein by selection and analysis of escape mutants. *Virus Res.* 2016; 220: 161–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.019>
28. McElhaney J.E., Xie D., Hager W.D., Barry M.B., Wang Y., Kleppinger A., et al. T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly. *J. Immunol.* 2006; 176: 6333–9.
29. Cherenova L.V., Kashtigo T.V., Saadian Kh.S., Shmarov M.M. Development of vaccines based on adenoviral vectors: a review of foreign clinical studies (part 2). *Meditinskaya immunologiya*. 2017; 19 (4): 329–58. (in Russian)
30. WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series 1012. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272364/9789241210218-eng.pdf?ua=1>
31. Pukhova N.M., Samuylenko A.Ya., Eremets V.I., Eremets N.K., Ivanov I.V., Salov D.A., et al. The main directions of development and implementation of rabies vaccines from st. Schelkovo-51. *Veterinarna meditsina*. 2011; 95: 175–7 (in Russian).
32. Yang F., Lin S., Ye F., Yang J., Qi J., Chen Z., et al. Structural analysis of rabies virus glycoprotein reveals pH-dependent conformational changes and interactions with a neutralizing antibody. *Cell Host Microbe*. 2020; 27 (3): 441–53.e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.12.012>
33. Udow S.J., Marrie R.A., Jackson A.C. Clinical features of dog- and bat-acquired rabies in humans. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57: 689–96. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cit372>
34. Overduin L.A., van Dongen J.J.M., Visser L.G. The cellular immune response to rabies vaccination: a systematic review. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7 (3): E110. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines7030110>

## Сведения об авторах

**Шмаров Максим Михайлович** – д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, доцент кафедры инфектологии и вирусологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [mmshmarov@gmail.com](mailto:mmshmarov@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

**Седова Елена Сергеевна** – к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [sedova-es@yandex.ru](mailto:sedova-es@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

**Никонова Алена Эдуардовна** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [merrickful@gmail.com](mailto:merrickful@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-7606-3310>

**Елаков Александр Леонидович** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [alelavov@mail.ru](mailto:alelavov@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0001-5798-6518>

## Authors' information

**Maksim M. Shmarov** – Dr.Sci. (Biol.), Head of Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Associate Prof. of the Department of Infectology and Virology of the I.M. Sechenov FMSMU (Sechenov University) of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [mmshmarov@gmail.com](mailto:mmshmarov@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

**Elena S. Sedova** – PhD, Researcher of Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [sedova-es@yandex.ru](mailto:sedova-es@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

**Alena E. Nikonova** – Junior Researcher of Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [merrickful@gmail.com](mailto:merrickful@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-7606-3310>

**Alexander L. Elakov** – PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Diagnostics of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [alelavov@mail.ru](mailto:alelavov@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0001-5798-6518>

**Шербинин Дмитрий Николаевич** – к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: dim284@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

**Артемова Элина Алексеевна** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: elina.sugar@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7081-0311>

**Лебедева Екатерина Семеновна** – младший научный сотрудник лаборатории активации иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: EkaterinaLebedeva2612@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0384-9299>

**Чулкина Марина Михайловна** – к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории активации иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: chulkina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2840-937X>

**Лосич Милана Анатольевна** – к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: mkohnovich@rambler.ru, <http://orcid.org/0000-0002-5618-1918>

**Зайкова Ольга Николаевна** – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: zaykova\_o\_n@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

**Чернышова Елена Владимировна** – к.в.н., научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: ELE-Ai-Petri@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>

**Алексеева Светлана Викторовна** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: sv.alekseeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3313-1894>

**Тутыхина Ирина Леонидовна** – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: their@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7667-5432>

**Сергеев Олег Витальевич** – д.б.н., проф., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: osergeyev123@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-3407-2224>

**Верховская Людмила Викторовна** – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: verkhov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

**Пичугин Алексей Васильевич** – к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории активации иммунитета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: pichalvas@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5356-3331>

**Метлин Артем Евгеньевич** – д.в.н., заместитель директора по научной работе ФГБУ «ВГНКИ», Москва, Российская Федерация; <https://orcid.org/0000-0002-4283-0171>

**Dmitriy N. Shcherbinin** – PhD, Researcher of Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: dim284@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

**Elina A. Artemova** – Junior Researcher of Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: elina.sugar@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7081-0311>

**Ekaterina S. Lebedeva** – Junior researcher of Laboratory of Immunity Activation, NRC – Institute of immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: EkaterinaLebedeva2612@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0384-9299>

**Marina M. Chulkina** – PhD, Junior Researcher of Laboratory of Immunity Activation, NRC – Institute of immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: chulkina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2840-937X>

**Milana A. Losich** – PhD, Researcher of the Laboratory of Molecular Diagnostics of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: mkohnovich@rambler.ru, <http://orcid.org/0000-0002-5618-1918>

**Olga N. Zaykova** – Researcher of the Laboratory of Molecular Diagnostics of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: zaykova\_o\_n@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

**Elena V. Chernishova** – PhD, Researcher of the Laboratory of Immunobiotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: ELE-Ai-Petri@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>

**Svetlana V. Alekseeva** – PhD, Senior researcher of the Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: sv.alekseeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3313-1894>

**Irina L. Tutykhina** – PhD, Leader researcher of the Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: their@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7667-5432>

**Oleg V. Sergeev** – Dr. Sci., Prof., Senior lecturer of the Department of Microbiology of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the MOH of Russia (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; e-mail: osergeyev123@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-3407-2224>

**Lyudmila V. Verkhovskaya** – PhD, Leader Researcher of the Laboratory of Molecular Biotechnology of the N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: verkhov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

**Aleksey V. Pichugin** – PhD, Leader Researcher of Laboratory of Immunity Activation, NRC – Institute of immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: pichalvas@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-5356-3331>

**Artem E. Metlin** – Dr.Sci., Deputy Director for Science of the VGNKI, Moscow, Russian Federation; <https://orcid.org/0000-0002-4283-0171>

**Баринский Игорь Феликсович** – д.м.н., проф., заведующий лабораторией сравнительной вирусологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; <https://orcid.org/0000-0002-9909-3598>

**Гребенникова Татьяна Владимировна** – д.б.н., проф., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [t\\_grebennikova@mail.ru](mailto:t_grebennikova@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

**Логунов Денис Юрьевич** – д.б.н., член-корр. РАН, заместитель директора по научной работе, зав. лабораторией клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, проф. кафедры инфектологии и вирусологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [logunov@gamaleya.org](mailto:logunov@gamaleya.org), <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

**Атауллаханов Равшан Иноятович** – д.м.н., проф., руководитель отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [ravshan.ataullakhanov@gmail.com](mailto:ravshan.ataullakhanov@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

**Народицкий Борис Савельевич** – д.б.н., проф., заместитель директора по научной работе подразделения Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, проф. кафедры инфектологии и вирусологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [bsnar1941@yahoo.com](mailto:bsnar1941@yahoo.com), <https://orcid.org/0000-0001-5522-8238>

**Гинцбург Александр Леонидович** – академик РАН, д.б.н., проф., директор ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, зав. кафедрой инфектологии и вирусологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России, Москва, Российская Федерация; <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

**Igor F. Barinsky** – MD, Prof., Head of the Laboratory for Comparative Virology of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; <https://orcid.org/0000-0002-9909-3598>

**Tatiana V. Grebennikova** – Dr.Sci., Prof., Corr. member of RAS, Head of Laboratory of Molecular diagnostics of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [t\\_grebennikova@mail.ru](mailto:t_grebennikova@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

**Denis Yu. Logunov** – Dr.Sci. (Biol.), Corr. member of RAS, Deputy Director for Research, Head of Laboratory of Cell Microbiology of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Prof. of the Department of Infectology and Virology of the I.M. Sechenov FMSMU (Sechenov University) of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [logunov@gamaleya.org](mailto:logunov@gamaleya.org), <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

**Ravshan I. Ataulakhanov** – MD, Prof., Head of Laboratory of Immunity Activation, NRC – Institute of immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [ravshan.ataullakhanov@gmail.com](mailto:ravshan.ataullakhanov@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

**Boris S. Naroditsky** – Dr.Sci. (Biol.), Prof., Deputy Director for Science of the Department of the D.I. Ivanovskii Institute of Virology of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Prof. of the Department of Infectology and Virology of the I.M. Sechenov FMSMU (Sechenov University) of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [bsnar1941@yahoo.com](mailto:bsnar1941@yahoo.com), <https://orcid.org/0000-0001-5522-8238>

**Alexander L. Gintsburg** – Acad. of RAS, Dr.Sci. (Biol.), Prof., Director of the N.F. Gamaleya FRCM of the MOH of Russia, Head of the Department of Infectology and Virology of the I.M. Sechenov FMSMU (Sechenov University) of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

© Коллектив авторов, 2020

Заботина Т.Н., Черткова А.И., Кадагидзе З.Г., Борунова А.А., Шоуа Э.К.,  
Гордеева О.О., Мещеряков А.А.

## Популяция CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови и ее значение для непосредственных и отдаленных результатов лечения больных трижды негативным раком молочной железы

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478, г. Москва, Российская Федерация

### Резюме

**Введение.** Трижды негативный рак молочной железы (ТН РМЖ) характеризуется агрессивным течением и высокой вероятностью рецидивирования. Важную роль в регуляции роста злокачественных новообразований, а также в эффективности различных видов противоопухолевой терапии играет иммунная система. Определение взаимосвязи CD8<sup>+</sup>-популяций лимфоцитов периферической крови (ПК) с эффективностью лечения больных ТН РМЖ может помочь в установлении иммунологических предиктивных и прогностических факторов и в повышении эффективности лечения пациенток.

**Цель** настоящего исследования – определение значимости исходного количества клеток CD8<sup>+</sup>-популяций лимфоцитов периферической крови (CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) для непосредственных (степень лечебного патоморфоза опухоли) и отдаленных (прогрессирование заболевания и выживаемость) результатов лечения больных трижды негативным раком молочной железы.

**Материал и методы.** У больных со II–III стадиями ТН РМЖ ( $n = 72$ ; медиана возраста 50 лет) до начала неoadъювантной химиотерапии (цисплатин + паклитаксел) определяли процентное содержание CD8<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов ПК с помощью многопараметрового цитометрического анализа. Исследовалась взаимосвязь исходного количества клеток данных популяций со степенью лечебного патоморфоза опухоли (ЛПО), прогрессированием заболевания и выживаемостью пациенток. Период наблюдения составил 60 мес.

**Результаты.** Процентное содержание CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-лимфоцитов и величина соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> до лечения были статистически значимо выше у больных с высокой степенью (IV) ЛПО, у пациенток без прогрессирования заболевания (ПЗ) и у выживших больных, по сравнению с пациентками с ЛПО I–III степени, больными с ПЗ и умершими пациентками. Повышение исходного количества CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-лимфоцитов ПК и величины соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> ассоциировалось с увеличением безрецидивной и общей выживаемости пациенток по сравнению с больными, у которых эти показатели были снижены. У пациенток, умерших в течение периода наблюдения, до начала химиотерапии было повышено количество CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. Повышение числа этих клеток сочеталось также с уменьшением ОБ больных.

**Заключение.** Популяция CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови и величина соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> могут быть возможными предиктивными факторами у пациенток со II–III стадиями ТН РМЖ, получавших неoadъювантную химиотерапию цисплатином и паклитакселом.

**Ключевые слова:** трижды негативный рак молочной железы; популяции CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов; неoadъювантная химиотерапия; степень лечебного патоморфоза опухоли; безрецидивная выживаемость; общая выживаемость

Статья поступила 06.06.2020. Принята в печать 16.07.2020.

Для корреспонденции  
Заботина Татьяна Николаевна –  
доктор биологических наук,  
заведующая отделом  
клинико-лабораторной диагностики  
ФГБУ «НМИЦ онкологии  
им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России, Москва,  
Российская Федерация  
E-mail: tatzabotina@yandex.ru  
<http://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

**Для цитирования:** Заботина Т.Н., Черткова А.И., Кадагидзе З.Г., Борунова А.А., Шоуа Э.К., Гордеева О.О., Мешчеряков А.А. Популяция CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови и ее значение для непосредственных и отдаленных результатов лечения больных трижды негативным раком молочной железы. Иммунология. 2020; 41 (4): 326–336. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-326-336>

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Zabotina T.N., Chertkova A.I., Kadagidze Z.G., Borunova A.A., Shoua E.K.,  
Gordeeva O.O., Meshcheryakov A.A.

## Peripheral blood CD8<sup>+</sup>-lymphocytes populations and its value for direct and outlying treatment results in triple negative breast cancer patients

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Health of the Russian Federation, 115478,  
Moscow, Russian Federation

### Abstract

**Introduction.** Triple negative breast cancer (TN BC) is characterized by an aggressive course and a high likelihood of the disease recurrence. An important role in the regulation of the growth of malignant neoplasms, as well as in the effectiveness of various types of antitumor therapy, is played by the immune system. Establishing the relationship of some CD8-positive lymphocyte populations with the effectiveness of treating patients with breast cancer may help establish reliable immunological predictive and prognostic factors and increase the effectiveness of treatment for patients.

**The aim** of the study was to determine the value of the original number of CD8<sup>+</sup> peripheral blood lymphocytes (CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) cells for immediate (degree of therapeutic tumor pathomorphosis) and distant (progression of disease and survival) of treatment results of patients with three-year negative breast cancer.

**Material and methods.** In patients with II–III stages of TN BC ( $n = 72$ , age median 50 years) before the start of neoadjuvant chemotherapy (NACT) (cisplatin + paclitaxel), the percentage of peripheral blood CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-lymphocytes was determined using a multi-parameter cytometric analysis. The relationship of the initial number of these cell populations with the degree of therapeutic pathomorphosis (TP), disease progression, and patient survival was studied. The observation period was 60 months.

**Results.** In patients with TP grade IV, in patients without disease progression and surviving patients, the percentage of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-lymphocytes and the ratio of CD8<sup>+</sup>CD28/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> were statistically significantly higher before treatment than in patients with TP grade I–III, recurrent patients and deceased patients. An increase of the initial number of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-lymphocytes and the CD8<sup>+</sup>CD28/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> ratio was associated with an increase in relapse-free (RFS) and overall survival (OS) of patients compared with patients in whom these showings were reduced. In patients who died during the observation period, the number of CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-lymphocytes was increased prior to chemotherapy. An increase in the number of these cells was also associated with a decrease in OS.

**Conclusion.** Populations of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> peripheral blood lymphocytes and the ratio of CD8<sup>+</sup>CD28/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> cells could be possible predictive factors for patients with II–III stages of TNBC receiving NACT (cisplatin and paclitaxel).

**Keywords:** TN breast cancer; CD8<sup>+</sup>-lymphocyte populations; neoadjuvant chemotherapy; degree of therapeutic pathomorphosis; relapse-free survival; overall survival

Received 06.06.2020. Accepted 16.07.2020.

**For citation:** Zabotina T.N., Chertkova A.I., Kadagidze Z.G., Borunova A.A., Shoua E.K., Gordeeva O.O., Meshcheryakov A.A. Peripheral blood CD8<sup>+</sup>-lymphocytes populations and its value for direct and outlying treatment results in triple negative breast cancer patients. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 326–36. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-326-336> (in Russian)

**Funding.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

### For correspondence

Tatyana N. Zabotina – Dr.Sci.,  
Head of the Department  
of Clinical and Laboratory  
Diagnostics,  
«N.N. Blokhin NMRCO»,  
Ministry of Health  
of the Russian Federation,  
Moscow,  
Russian Federation

E-mail: [tatzabotina@yandex.ru](mailto:tatzabotina@yandex.ru)

<http://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

## Введение

Тройной негативный рак молочной железы (ТН РМЖ) составляет около 15–20 % случаев рака молочной железы (РМЖ) во всем мире, является гетерогенным заболеванием и отличается от других вариантов РМЖ отсутствием на опухолевых клетках экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестерона и гиперэкспрессии ERBB2 (HER2<sup>+</sup>) [1]. Основным системным лечением этой формы РМЖ является химиотерапия [2]. ТН РМЖ характеризуется высокой вероятностью развития рецидива, плохим прогнозом, отсутствием молекулярных мишеней для таргетной терапии и нестабильным ответом на химиотерапию [3, 4]. Несмотря на интенсивные исследования, надежные предиктивные и прогностические биомаркеры при ТН РМЖ в настоящее время не установлены [5]. Важную роль в регуляции роста злокачественных новообразований, а также в эффективности различных видов противоопухолевой терапии, включая химиотерапию, играет иммунная система [6–10]. Предполагается, что детальное изучение взаимодействия иммунной системы с опухолью при РМЖ обеспечит выявление иммунологических маркеров, которые могут быть использованы в клинике [11]. В настоящее время в качестве одного из таких маркеров рассматриваются лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (ЛИО). Показано, что повышение числа ЛИО ассоциируется с уменьшением рисков развития рецидива и смертельного исхода у больных ТН РМЖ, а также с повышением частоты полного ответа на химиотерапию [12]. При этом CD8<sup>+</sup>-Т-клетки были определены как основная эффекторная популяция ЛИО [13, 14]. Однако расхождения между результатами различных исследований в значении ЛИО при РМЖ, в том числе при ТН РМЖ, все еще считаются слишком большими, что мешает использовать этот маркер в повседневной клинической практике [13, 15]. Следует учесть, что растущая опухоль индуцирует развитие не только локального, но и системного иммунитета. Индуцированные опухолью отдаленные изменения в лимфоузлах и периферической крови указывают на то, что рак является системным заболеванием, а эффективное функционирование системного иммунитета, как и локального, может ассоциироваться с благоприятным клиническим исходом и положительным ответом на иммунотерапию [16–18]. В ряде исследований было показано, что раз-

личные популяции циркулирующих лимфоцитов наряду с ЛИО могут рассматриваться как прогностические и предиктивные факторы при РМЖ [19–22]. Несомненно, установление специфических маркеров, которые могут использоваться для прогнозирования ответа на химиотерапию или служить мишенями специализированных методов лечения ТН РМЖ, включая иммунотерапию, имеет решающее значение. **Целью** настоящего исследования стало определение значения исходного количества клеток CD8<sup>+</sup>-популяций лимфоцитов периферической крови (CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) для непосредственных (степень лечебного патоморфоза опухоли) и отдаленных (прогрессирование заболевания и выживаемость) результатов лечения больных ТН РМЖ.

## Материал и методы

**Исследуемые пациенты.** В исследование были включены пациентки со II–III стадиями ТН РМЖ ( $n=72$ ), находившиеся на лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Участие в исследовании было добровольным, набор пациенток проводился в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА, 2000 г. Все пациентки дали информированное согласие на проведение иммунологического обследования. Медиана возраста составила 50 лет (от 26 до 76 лет). Лечение включало 4–6 курсов химиотерапии (паклитаксел 80 мг/м<sup>2</sup> 1, 8, 15-й дни + цисплатин 75 мг/м<sup>2</sup>, 1 день, цикл 28 дней) с последующим хирургическим вмешательством. Период наблюдения составил 60 мес.

**Исследование степени лечебного патоморфоза опухоли.** Сведения о степени лечебного патоморфоза опухоли (ЛПО) были получены для 61 пациентки. Оценка степени вмешательства по Лавниковой: I степень – более 50 % опухолевой паренхимы сохранено; II степень – сохранено 20–50 % опухолевой паренхимы, III степень – до 20 % паренхимы опухоли сохранилось в виде отдельных очагов; IV степень – полное отсутствие опухолевой паренхимы. Больных включали в исследование строго на одном и том же этапе заболевания – непосредственно перед началом химиотерапии (х/т).

**Исследование иммунофенотипа лимфоцитов.** У всех пациенток определяли процентное содержание CD8<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>- и CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-лимфоцитов периферической крови

**Таблица 1.** Взаимосвязь количества клеток CD8<sup>+</sup>-популяций лимфоцитов периферической крови со степенью лечебного патоморфоза опухоли

Показатель Me (квартили)	Степень лечебного патоморфоза опухоли		p
	IV (n = 38)	I–III (n = 23)	
CD8 <sup>+</sup>	29,3 (23,5 и 33,4)	27,2(20,1 и 30,6)	0,250
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	22,7 (17,0 и 29,8)	17,8(13,7 и 25,1)	0,152
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	10,9 (6,8; 16,6)	6,8(5,9; 11,2)	0,021
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	14,2 (10,2 и 17,7)	15,6(12,6 и 20,2)	0,318
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,72 (0,43; 1,3)	0,41(0,28; 0,85)	0,025
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	5,6 (3,3 и 7,4)	5,0(4,0 и 8,1)	0,685

**Таблица 2.** Взаимосвязь исходного количества клеток CD8<sup>+</sup>-популяций лимфоцитов периферической крови с прогрессированием заболевания больных трижды негативным раком молочной железы

Показатель <i>Me</i> (квартили)	Больные без прогрессирования заболевания ( <i>n</i> = 48)	Больные с прогрессированием заболевания, степень ( <i>n</i> = 24)	<i>p</i>
		I–III	
CD8 <sup>+</sup> (%)	29,0 (23,6 и 33,7)	24,1 (19,9 и 35,4)	0,282
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	22,1 (16,2 и 29,8)	18,1 (12,0 и 27,2)	0,232
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (%)	10,4 (6,4 и 14,4)	7,1 (5,9 и 10,2)	0,036
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (%)	15,0 (11,2 и 21,0)	15,6 (10,7 и 24,5)	0,444
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,63 (0,43 и 1,3)	0,38 (0,2 и 0,71)	0,036
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	5,2 (3,2 и 7,9)	6,9 (4,2 и 8,7)	0,339

(ПК) с помощью многопараметрового цитометрического анализа на пятипараметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Лимфоциты выделялись по параметрам светорассеяния и экспрессии маркера CD45. Двух- и трехцветное окрашивание лимфоцитов проводили с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, PE, PC5 (Bekman Coulter США; «Сорбент», Россия).

**Статистический анализ данных.** Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета статистических программ «Статистика 7» и «SPSS 22». Характер распределения показателей определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Результаты представлены в виде *Me* (Медианы) и квартилей (25 и 75 %). Различия между показателями определяли с помощью двустороннего *U*-критерия Манна–Уитни. Корреляционную взаимосвязь между показателями устанавливали с помощью непараметрического корреляционного анализа Спирмена: коэффициент корреляции «*ρ*» и 95 % доверительный интервал *ρ* (95 % ДИ). Для анализа различия в частоте рецидива заболевания между группами с повышенным и сниженным уровнем показателя использовали двусторонний точный критерий Фишера (Fisher exact *p*, two-tailed). Кривые выживания (БРВ и ОВ) рассчитывались по методу Каплана–Мейера и сравнивались по логранговому критерию (Log-rank test) – наиболее эффективен для распознавания поздних различий в вероятностях выживания, и критерию Вилкоксона (Breslow Generalized Wilcoxon) – наиболее эффективен для распознавания ранних различий в вероятностях выживания. Цензурированные (censored) данные включали данные пациенток, которые

были живы на момент окончания исследования или не имели рецидива. Нецензурированные (complete) данные включали данные умерших пациенток и пациенток с рецидивом заболевания. Уровень статистической значимости был принят равным 0,05.

## Результаты

### Определение взаимосвязи исходного количества клеток CD8<sup>+</sup>-популяций лимфоцитов периферической крови с непосредственными результатами лечения: степенью лечебного патоморфоза опухоли

Данные о степени ЛПО были доступны для 61 пациентки. Определение степени ЛПО показало, что у 38 из 61 пациентки ЛПО был высокой – IV степени, у 23 – I–III степени. Сравнение исходного количества клеток исследуемых популяций у больных с различной степенью ЛПО показало, что у больных с ЛПО IV степени процент CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-лимфоцитов и величина соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> были статистически значимо выше, чем у пациенток с ЛПО I–III степени. Различий в зависимости от степени ЛПО в исходном количестве клеток остальных популяций не наблюдалось (табл. 1).

### Определение взаимосвязи исходного количества клеток CD8<sup>+</sup>-популяций лимфоцитов с отдаленными результатами лечения: прогрессированием заболевания и выживаемостью пациенток с трижды негативным раком молочной железы

За пятилетний период наблюдения данные о прогрессировании заболевания (ПЗ) были получены для

**Таблица 3.** Взаимосвязь исходного количества клеток CD8<sup>+</sup>-популяций лимфоцитов периферической крови с выживаемостью больных трижды негативным раком молочной железы

Показатель <i>Me</i> (квартили)	Выживаемость		<i>p</i>
	живы ( <i>n</i> = 57)	умерли ( <i>n</i> = 14)	
CD8 <sup>+</sup> (%)	29,1 (23,5 и 34,0)	22,1 (19,8 и 32,4)	0,144
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	22,8 (17,0 и 29,8)	18,1 (9,8 и 25,1)	0,111
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (%)	9,9 (6,4 и 14,2)	6,6 (5,5 и 7,6)	0,041
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (%)	15,6 (11,8 и 21,6)	15,1 (10,7 и 23,3)	0,971
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,61 (0,32 и 1,12)	0,23 (0,20 и 0,68)	0,036
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	5,0 (3,3 и 7,4)	7,5 (4,5 и 9,0)	0,014

**Таблица 4.** Значения медиан численного состава популяций CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, использованные для определения повышенного или сниженного уровня показателя у конкретного больного

Субпопуляция	Me, %
CD8 <sup>+</sup>	29,0
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	22,0
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	9,0
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	15,6
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,6
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	5,7
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (НК-клетки)	12,0

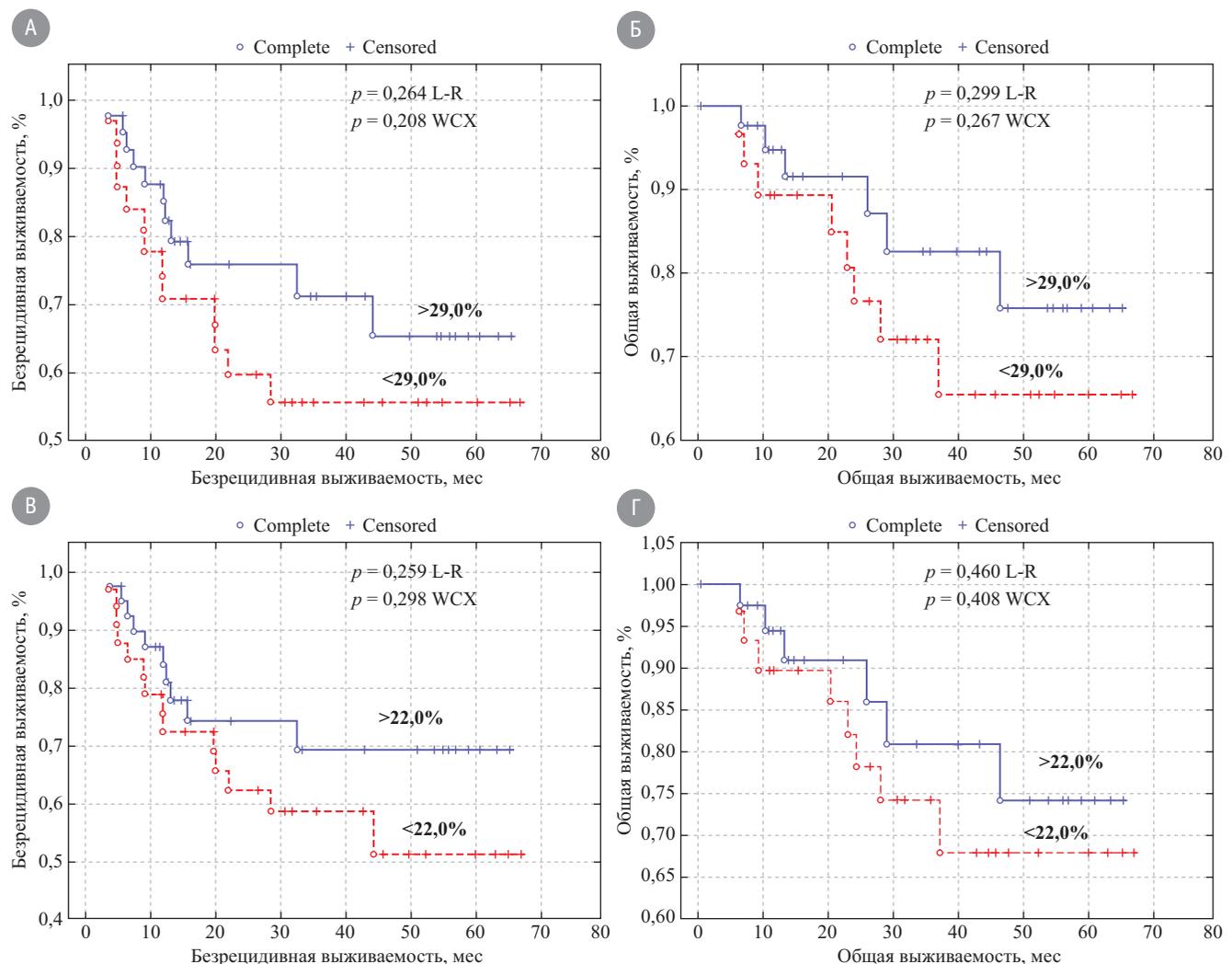
72 пациенток (ПЗ наблюдалось у 24/72 – 33,3 %), данные о смерти от ТН РМЖ – для 71 пациентки (умерли 14/71 – 19,7 %). Полученные результаты показали, что до начала химиотерапии у больных без прогрессирования заболевания и у выживших больных процентное

содержание CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-Т-клеток и величина соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> были статистически значимо выше, чем у больных с ПЗ и умерших пациенток. В то же время у умерших пациенток было повышено исходное количество CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов (табл. 2 и 3).

#### Определение взаимосвязи исходного количества клеток CD8<sup>+</sup>-популяций с пятилетней безрецидивной и общей выживаемостью пациенток с трижды негативным раком молочной железы

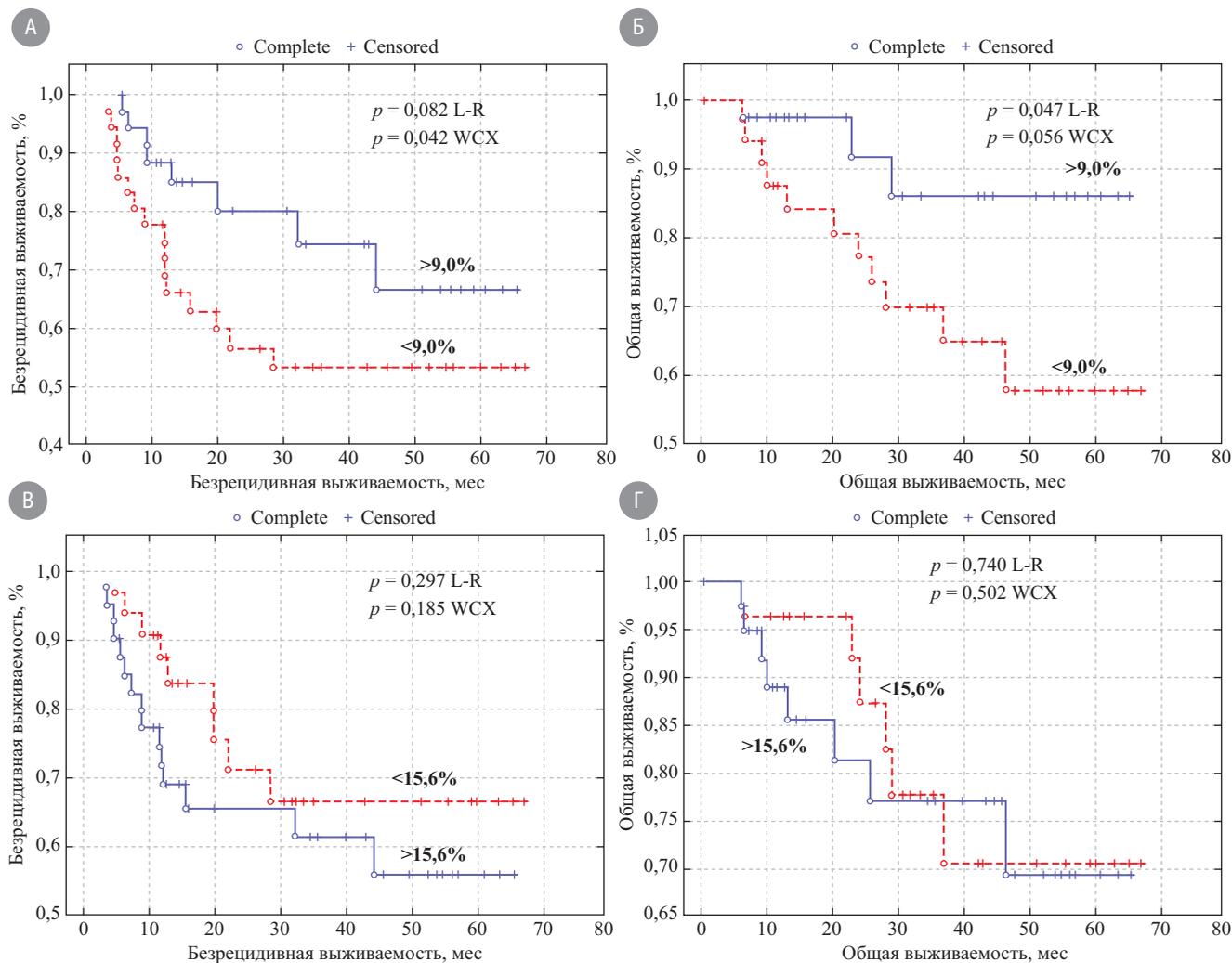
Исходный уровень иммунологического показателя у конкретного больного определялся как «повышенный» или «сниженный» по отношению к значению медианы (на рисунках обозначена как Me) этого показателя для каждой изученной популяции (табл. 4).

Полученные результаты показали, что статистически значимых различий в безрецидивной (БРВ) и общей выживаемости (ОВ) между группами пациенток с повышенным или сниженным исходным количеством клеток всей популяции CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов (рис. 1А, Б), а также



**Рис. 1.** Взаимосвязь пятилетней безрецидивной (А, В) и общей (Б, Г) выживаемости больных трижды негативным раком молочной железы с исходным количеством CD8<sup>+</sup>- (А, Б) и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов (В, Г) до начала химиотерапии

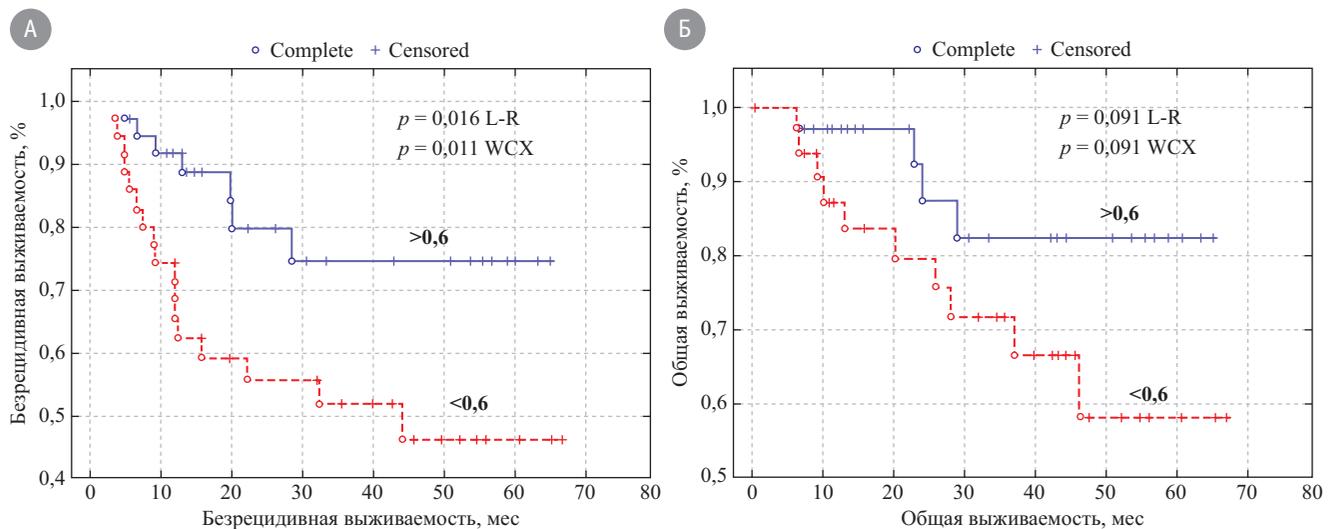
Здесь и на рис. 2, 4: синяя линия – процент лимфоцитов > Me; красная линия – процент лимфоцитов < Me; L-R – логранговый критерий; WCX – критерий Вилкоксона. Медианы БРВ и ОВ в обеих группах не достигнуты.



**Рис. 2.** Взаимосвязь пятилетней безрецидивной (А, В) и общей (Б, Г) выживаемости больных трижды негативным раком молочной железы с исходным количеством CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (А, Б) и CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (В, Г) лимфоцитов до начала химиотерапии

CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Т-клеток (рис. 1В, Г) не наблюдалось. Однако у больных, у которых процент CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов был повышен, отмечалась тенденция к более благоприятному течению заболевания, чем у пациенток со сниженным показателем. Так, в соответствии с кривыми БРВ, через 30 месяцев 75 % пациенток с повышенным показателем не имели рецидива, в то время как у больных с пониженными значениями уровня CD8<sup>+</sup>-клеток рецидив не развился только у 55 % больных. Частота развития рецидивов заболевания у пациенток с повышенной величиной этого показателя составляла 26,8 % (11/41), а с пониженным – 41,9 % (13/31),  $p = 0,212$ . Различия в БРВ и ОВ между группами пациенток с повышенным или сниженным количеством CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Т-клеток также были статистически незначимыми (рис. 1В, Г). Максимальное различие в количестве больных с рецидивом в зависимости от уровня CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Т-клеток наблюдались ближе к концу наблюдения (примерно после 42–43 мес): при количестве этих клеток  $> Me$  ПЗ наблюдалось у 25,6 % больных, а при показателе  $< Me$  – у 42,4 % больных (рис. 1В, Г).

Характер кривых БРВ и ОВ в зависимости от исходного процента CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-лимфоцитов представлен на рисунке 2 (рис. 2В, Г). Процент больных без ПЗ или живых пациенток практически не зависел от исходного уровня данного показателя. Статистически значимое увеличение частоты БРВ (по критерию Вилкоксона, выявляющему ранние различия в вероятностях выживания) и ОВ (по логранговому критерию, определяющему поздние различия в вероятностях выживания) было обнаружено у пациенток с повышенным до лечения процентом CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов ( $> 9,0\%$ ) по сравнению с больными со сниженным показателем ( $< 9,0\%$ ) (рис. 2А, Б). Максимальные различия в проценте больных без прогрессирования заболевания наблюдались на 28–30-е месяцы наблюдения: 80 и 53 % соответственно, а максимальные различия в частоте живых пациенток на более поздние сроки – после 46 мес наблюдения: 86 и 58 %, соответственно (рис. 2А, Б). Частота развития рецидивов заболевания у пациенток с повышенной величиной этого показателя составляла 22,2 % (8/36), а с пониженным – 44,4 % (16/36);  $p = 0,079$ .



**Рис. 3.** Взаимосвязь пятилетней безрецидивной (А) и общей (Б) выживаемости больных трижды негативным раком молочной железы с величиной соотношения  $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$  до начала химиотерапии

Синяя линия – величина соотношения  $> Me$ ; красная линия – величина соотношения  $< Me$ ; L-R – логранговский критерий; WCX – критерий Вилкоксона. Медиана БРВ в группе со сниженным показателем 44,3 %. В группе с повышенным показателем не достигнута. Медианы ОВ в обеих группах не достигнуты.

Значительное увеличение частоты БРВ ассоциировалось также с повышенной величиной соотношения  $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$  (рис. 3А, Б). Частота развития рецидивов заболевания у пациенток с повышенной величиной этого показателя ( $> 0,6$ ) составляла 18,9 % (7/37), а с пониженным – 48,6 % (17/35);  $p = 0,012$ . Статистически значимых различий в ОВ в течение пяти лет между пациентками с повышенной и сниженной величиной данного показателя не наблюдалось.

Отмечалась тенденция к уменьшению частоты развития рецидивов заболевания и увеличению частоты выживаемости больных со сниженным исходным количеством  $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов (рис. 4А, Б). Частота развития рецидивов заболевания у пациенток с повышенной величиной этого показателя составляла 38,5 % (15/39), а с пониженным – 27,3 % (9/33);  $p = 0,452$ . Была обнаружена высокая положительная корреляция количества  $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов с количеством  $CD3^+CD16^+CD56^+$ -НК-клеток:  $\rho$  (95 % ДИ) = 0,715 (0,581–0,811),  $p = 0,000$ . В связи с этим определялось влияние исходного количества НК-клеток на БРВ и ОВ больных ТН РМЖ: отмечалась тенденция к неблагоприятному значению повышения исходного процента НК-клеток как для БРВ, так и для ОВ пациенток, хотя различия между сравниваемыми группами не были статистически значимы (рис. 4В, Г). Частота развития рецидивов заболевания у пациенток с повышенной величиной этого показателя составляла 40,0 % (16/40), а с пониженным – 25 % (8/32);  $p = 0,215$ .

Корреляционная зависимость между количеством  $CD8^+CD28^+$ -лимфоцитов и стадией заболевания [ $\rho = -0,183$  (95 % ДИ – 0,397–0,049);  $p = 0,113$ ] была статистически незначимой. В то же время отмечалась слабая

отрицательная статистически значимая корреляция количества  $CD8^+CD28^+$ -Т-клеток с возрастом [ $\rho = -0,320$  (95 % ДИ – 0,097 и – 0,513),  $p = 0,005$ ].

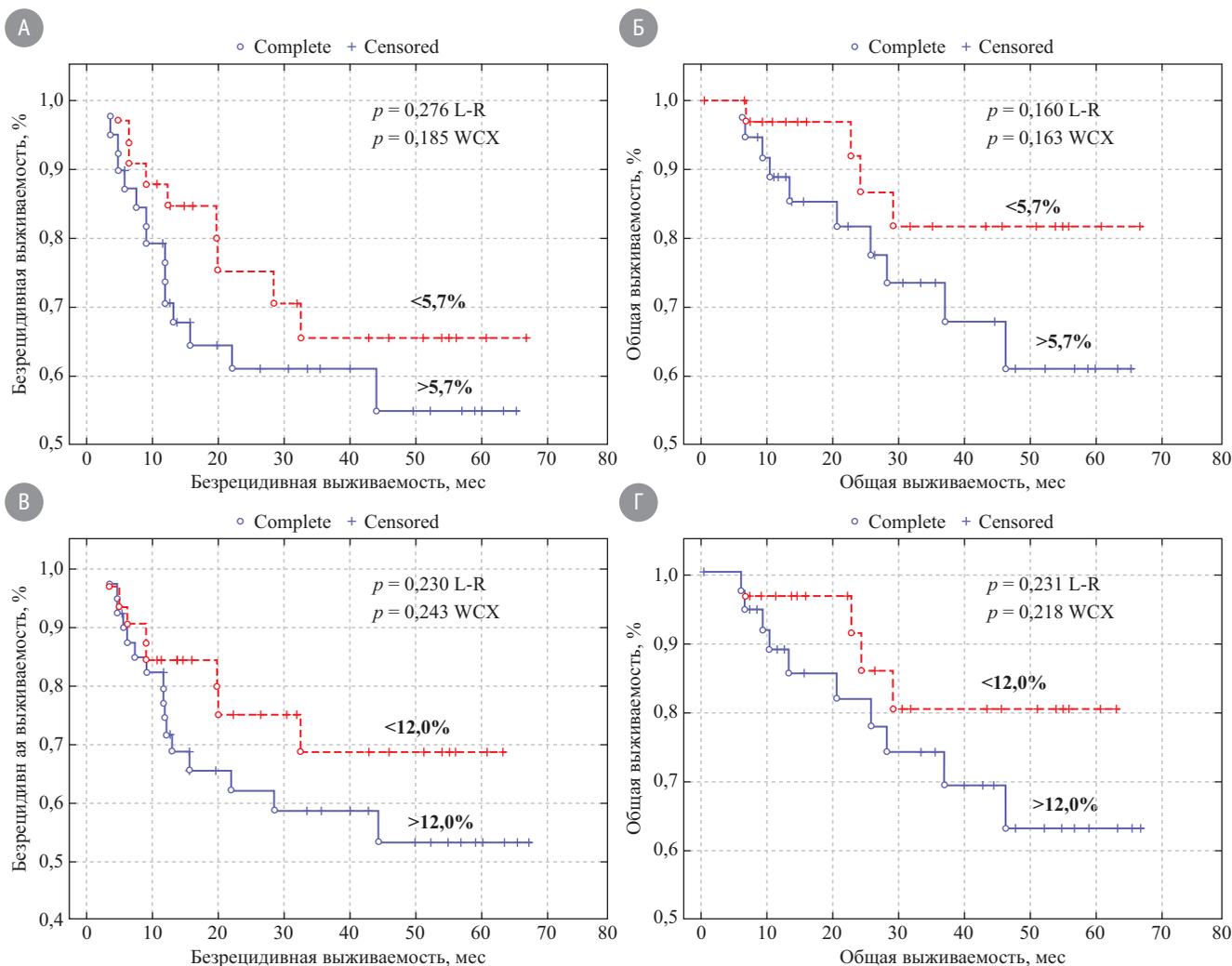
## Обсуждение

ТН РМЖ является иммуногенной опухолью и индуцирует развитие как локального, так и системного врожденного и адаптивного иммунитета [23]. Основными клетками-эффекторами адаптивного противоопухолевого иммунного ответа являются цитотоксические  $CD8^+$ -Т-лимфоциты (ЦТЛ) [24, 25]. Проведенный К. Wang и соавт. [26] метаанализ 23 исследований локального иммунного ответа у больных РМЖ, получавших химиотерапию, подтвердил, что наиболее значимым предиктором благоприятного клинического исхода был уровень  $CD8^+$ -лимфоцитов в составе ЛИО, в особенности у пациенток с ТН РМЖ [26]. В настоящей работе у больных ТН РМЖ определялась значимость для клинической эффективности химиотерапии (цисплатин + паклитаксел)  $CD8^+$ -популяций лимфоцитов-эффекторов системного иммунного ответа. Исследовалась взаимосвязь исходного уровня циркулирующих  $CD8^+$ -клеток и их популяций ( $CD3^+CD8^+$ ,  $CD8^+CD28^+$ ,  $CD8^+CD28^-$ ,  $CD3^+CD8^+$ ) со степенью лечебного патоморфоза опухоли, прогрессированием заболевания и выживаемостью пациенток. Полученные результаты показали, что у пациенток с высокой степенью ЛПО, у больных без рецидива заболевания и у выживших больных количество  $CD8^+CD28^+$ -Т-лимфоцитов и величина соотношения  $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$ -клеток были выше, чем у пациенток с низкой степенью ЛПО, с прогрессированием заболевания и у умерших больных. Позитивное значение этих иммунологических показателей подтвердило также их значение для БРВ и ОВ пациенток: повышен-

ное исходное количество CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов ассоциировалось с увеличением как БРВ, так и ОВ. Увеличение БРВ наблюдалось также при повышении величины соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-клеток. Исходное количество CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Т-клеток не имело статистически значимого влияния на частоту БРВ и ОВ обследованных больных, что, скорее всего, связано с гетерогенностью этих популяций.

Результаты проведенного исследования позволяют предположить, что повышенное исходное количество CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов и повышенная величина соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-клеток являются положительными предиктивными факторами у больных ТН РМЖ, леченных цисплатином и паклитакселом. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-Т-лимфоциты включают в свой состав наивные клетки, клетки памяти и цитотоксические клетки-эффекторы [27, 28]. G. Song и соавт. [29] показали, что увеличение числа CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов коррелировало с увеличением выживаемости без прогрессирования (БРВ) больных метастатическим РМЖ, получавших химиотерапию. Хорошо известно, что ре-

цептор CD28 является незаменимой костимуляторной молекулой Т-клеток, играющей ключевую роль в полноценной активации CD8<sup>+</sup>-ЦТЛ [30]. Современные исследования показывают, что потеря экспрессии маркера CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-Т-лимфоцитами может ассоциироваться с приобретением ими иммуносупрессивных свойств. Все большее число данных свидетельствуют о том, что CD8<sup>+</sup>-Т-клетки, не экспрессирующие рецептор CD28 (CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>), являются уникальной субпопуляцией регуляторных Т-клеток, которые оказывают прямое супрессивное воздействие на Т-клетки-эффекторы, и их супрессорная активность показана при различных вариантах рака [24, 31]. По данным G. Song и соавт., высокий уровень циркулирующих CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-Т-лимфоцитов ассоциировался с плохим прогнозом заболевания у больных метастатическим РМЖ, получавших химиотерапию [29] или адоптивную Т-клеточную терапию после адьювантной химиотерапии [32]. Однако эти клетки функционально неоднородны и могут проявлять не только регуляторную, но и цитотоксическую активность в зависимости от патологического состояния



**Рис. 4.** Взаимосвязь пятилетней безрецидивной (А, В) и общей (Б, Г) выживаемости больных трижды негативным раком молочной железы с количеством CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (А, Б) и CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (HK) (В, Г) лимфоцитов до начала химиотерапии

и нозологического варианта опухоли. Например, у больных меланомой CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-Т-клетки экспрессируют перфорин и вносят вклад в противоопухолевый иммунный ответ [24]. В настоящем исследовании исходное количество клеток данной популяции не имело значимого влияния на БРВ и ОВ пациенток, однако повышение величины соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> в пользу CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих маркер CD28, имело позитивное значение для результатов лечения. Помимо Т-клеток с различной функциональной активностью, популяция CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов включает в свой состав и НК-клетки, экспрессирующие этот маркер. Результаты показали, что количество CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов ПК было выше у умерших пациенток, по сравнению с живыми: 7,5 % (4,5 % и 9,0 %) и 5,0 % (3,3 % и 7,4 %) соответственно. Отрицательное значение повышенного процента этих клеток до лечения было выявлено также при изучении кривых выживания, хотя различия между группами больных с повышенными и пониженными показателями не были статистически значимы. Частота развития рецидивов была выше в группе с повышенным числом этих клеток. Обнаруженная в работе высокая положительная корреляция между CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-клетками и CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-НК-клетками послужила основанием для определения влияния исходного числа НК-клеток на БРВ и ОВ пациенток. Сравнение кривых безрецидивного и общего выживания, как и в случае CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, показало, что повышение процента НК-клеток до лечения имеет в основном неблагоприятное, хотя и статистически незначимое влияние на выживаемость больных ТН РМЖ. Частота развития рецидивов была в 1,6 раза меньше у больных со сниженным показателем, чем у больных с повышенным процентов НК-клеток. Можно

предположить, что обнаруженная в данном исследовании тенденция к отрицательному влиянию НК-клеток на результаты лечения больных ТН РМЖ во многом связана с наличием CD8<sup>+</sup>-популяции в их составе. Показано также, что НК-клетки могут оказывать не только положительное, но и отрицательное влияние на активность Т-клеток [33].

Обнаруженная в работе слабая отрицательная статистически значимая корреляция количества CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-Т-клеток с возрастом [ $\rho = -0,320$  (95 % ДИ  $-0,097$  и  $-0,513$ ),  $p = 0,005$ ] указывает на необходимость проведения подробного исследования взаимосвязи возраста с показателями иммунитета у больных ТН РМЖ с включением в него более значительного числа популяций лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунитета.

### Заключение

Полученные результаты позволяют предположить, что популяция CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>-лимфоцитов ПК и величина соотношения CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> могут являться возможными иммунологическими предиктивными факторами у пациенток со II–III стадиями ТН РМЖ, получавших неoadъювантную химиотерапию цисплатином и паклитакселом.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Заботина Т.Н.; сбор и обработка материала – Гордеева О.О., Шоуа Э.К.; статистическая обработка – Черткова А.И., Борунова А.А.; написание текста – Черткова А.И., Заботина Т.Н.; редактирование – Кадагидзе З.Г.; утверждение окончательного варианта статьи – Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г., Мещеряков А.А.

### Литература

1. Reis-Filho J.S., Tutt A.N.J. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008; 52: 108–18.
2. Kumar P., Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2016; 293 (2): 247–69.
3. Bianchini G., Balko J.M., Mayer I.A., Sanders M.E., Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016; 13 (11): 674–90.
4. Rivenbark A.G., O'Connor S.M., Coleman W.B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am. J. Pathol.* 2013; 183 (4): 1113–24.
5. Ali A.M., Ansari J.A.K., El-Aziz N.M.A., Abozeed W.N., Warith A.M.A., Alsaleh K. Triple negative breast cancer: a tale of two decades anticancer agents. *Med. Chem.* 2017; 17 (4): 491–9.
6. Voena C., Chiarle R. Advances in cancer immunology and cancer immunotherapy. *Discov. Med.* 2016; 21 (114): 125–33.
7. Wu J., Waxman D.J. Immunogenic chemotherapy: dose and schedule dependence and combination with immunotherapy. *Cancer Lett.* 2018; 419: 210–21.
8. Emens L.A., Middleton G. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol. Res.* 2015; 3 (5): 436–43.
9. Ye J.C., Formenti S.C. Integration of radiation and immunotherapy in breast cancer - treatment implications. *Breast.* 2018; 38: 66–74.
10. Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011; 8 (3): 151–60.
11. Behren A., Thompson E.W., Anderson R.L., Ferraro P.T. Editorial: cancer plasticity and the microenvironment: implications for immunity and therapy response. *Front. Oncol.* 2019; 9: 276.
12. Denkert C., von Minckwitz G., Darb-Esfahani S., Lederer B., Heppner B.I., Weber K.E. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018; 19 (1): 40–50.
13. Stovgaard E.S., Nielsen D., Hogdall E., Balslev E. Triple negative breast cancer – prognostic role of immune-related factors: a systematic review. *Acta Oncol.* 2018; 57 (1): 74–82.
14. Vihervuori H., Autere T.A., Repo H., Kurki S., Kallio L., Lintunen M.M. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8<sup>+</sup> T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2019; 145 (12): 3105–14.
15. Baxevanis C.N., Sofopoulos M., Fortis S.P., Perez S.A. The role of immune infiltrates as prognostic biomarkers in patients with breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2019; 68: 1671–80.
16. McAllister S.S., Weinberg R.A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat. Cell. Biol.* 2014; 16 (8): 717–27.
17. Spitzer M.H., Carmi Y., Reticker-Flynn N.E., Kwek S.S., Madhiredy D., Martins M.M. et al. Systemic immunity is required for effective cancer immunotherapy. *Cell.* 2017; 168 (3): 487–502.
18. Wang L., Simons D.L., Lu X., Tu T.Y., Avalos C., Chang A.Y. et al. Breast cancer induces systemic immune changes on cytokine signaling in peripheral blood monocytes and lymphocytes. *EBioMedicine.* 2020; 52: 102631.

19. He Q., Li G., Ji X., Ma L., Wang X., Li Y. et al. Impact of the immune cell population in peripheral blood on response and survival in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. *Tumour Biol.* 2017; 39 (5): 1–8.

20. Lin K.R., Pang D.M., Jin Y.B., Hu Q., Pan Y.M., Cui J.H. et al. Circulating CD8<sup>+</sup> T-cell repertoires reveal the biological characteristics of tumors and clinical responses to chemotherapy in breast cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 2018; 67 (11): 1743–52.

21. Zenan H., Zixiong L., Zhicheng Y., Mei H., Xiongbin Y., Tiantian W. et al. Clinical prognostic evaluation of immunocytes in different molecular subtypes of breast cancer. *J. Cell. Physiol.* 2019; 234 (11): 20 584–602.

22. Péguillet L., Milder M., Louis D., Vincent-Salomon A., Dorval T., Piperno-Neumann S. et al. High numbers of differentiated effector CD4 T cells are found in patients with cancer and correlate with clinical response after neoadjuvant therapy of breast cancer. *Cancer Res.* 2014; 74 (8): 2204–16.

23. Disis M.L., Stanton S.E. Immunotherapy in breast cancer: an introduction. *Breast.* 2018; 37: 196–9.

24. Huff W.X., Kwon J.H., Henriquez M., Fetcko K., Dey M. The evolving role of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> immunosenescent T cells in cancer immunology. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (11): E2810.

25. Табаков Д.В., Заботина Т.Н., Захарова Е.Н., Борунова А.А., Короткова О.В., Черткова А.И. др. Субпопуляционный баланс эффекторных клеток периферической крови онкологических больных. *Иммунология.* 2019; 40 (3): 20–27. DOI: <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-13002>

26. Wang K., Xu J., Zhang T., Xue D. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2016; 7 (28): 44288–98.

27. He J. Folate-modified chitosan nanoparticles containing the ip-10 gene enhance melanoma-specific cytotoxic CD8(+)/CD28(+) T lymphocyte responses. *Theranostics.* 2016; 6 (5): 752–61.

28. Fiorentini S., Licenziati S., Alessandri G., Castelli F., Caligaris S., Bonafede M. et al. CD11b expression identifies CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T lymphocytes with phenotype and function of both naive/memory and effector cells. *J. Immunol.* 2001; 166 (2): 900–7.

29. Song G., Wang X., Jia J., Yuan Y., Wan F., Zhou X. et al. Elevated level of peripheral CD8(+)/CD28(-) T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2013; 62 (6): 1123–30.

30. Wang S., Chen L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell. Mol. Immunol.* 2004; 1 (1): 37–42.

31. Chen X., Liu Q., Xiang A.P. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells: Not only age-related cells but a subset of regulatory T cells. *Cell. Mol. Immunol.* 2018; 15: 734–6.

32. Song Q., Ren J., Zhou X., Wang X., Song G., Hobeika A. et al. Circulating CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> suppressor T cells tied to poorer prognosis among metastatic breast cancer patients receiving adoptive T-cell therapy: a cohort study. *Cytotherapy.* 2018; 20 (1): 126–33.

33. Crouse J., Xu H.C., Lang P.A., Oxenius A. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. *Trends Immunol.* 2015; 36 (1): 49–58.

## ■ References

1. Reis-Filho J.S., Tutt A.N.J. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology.* 2008; 52: 108–18.

2. Kumar P., Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2016; 293 (2): 247–69.

3. Bianchini G., Balko J.M., Mayer I.A., Sanders M.E., Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016; 13 (11): 674–90.

4. Rivenbark A.G., O'Connor S.M., Coleman W.B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am. J. Pathol.* 2013; 183 (4): 1113–24.

5. Ali A.M., Ansari J.A.K., El-Aziz N.M.A., Abozeed W.N., Warith A.M.A., Alsaleh K. Triple negative breast cancer: a tale of two decades anticancer agents. *Med. Chem.* 2017; 17 (4): 491–9.

6. Voena C., Chiarle R. Advances in cancer immunology and cancer immunotherapy. *Discov. Med.* 2016; 21 (114): 125–33.

7. Wu J., Waxman D.J. Immunogenic chemotherapy: dose and schedule dependence and combination with immunotherapy. *Cancer Lett.* 2018; 419: 210–21.

8. Emens L.A., Middleton G. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol. Res.* 2015; 3 (5): 436–43.

9. Ye J.C., Formenti S.C. Integration of radiation and immunotherapy in breast cancer - treatment implications. *Breast.* 2018; 38: 66–74.

10. Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011; 8 (3): 151–60.

11. Behren A., Thompson E.W., Anderson R.L., Ferraro P.T. Editorial: cancer plasticity and the microenvironment: implications for immunity and therapy response. *Front. Oncol.* 2019; 9: 276.

12. Denkert C., von Minckwitz G., Darb-Esfahani S., Lederer B., Heppner B.I., Weber K.E., et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018; 19 (1): 40–50.

13. Stovgaard E.S., Nielsen D., Hogdall E., Balslev E. Triple negative breast cancer – prognostic role of immune-related factors: a systematic review. *Acta Oncol.* 2018; 57 (1): 74–82.

14. Vihervuori H., Autere T.A., Repo H., Kurki S., Kallio L., Lintunen M.M. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8<sup>+</sup> T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2019; 145 (12): 3105–14.

15. Baxevanis C.N., Sofopoulos M., Fortis S.P., Perez S.A. The role of immune infiltrates as prognostic biomarkers in patients with breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2019; 68: 1671–80.

16. McAllister S.S., Weinberg R.A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat. Cell. Biol.* 2014; 16 (8): 717–27.

17. Spitzer M.H., Carmi Y., Reticker-Flynn N.E., Kwek S.S., Madhiredy D., Martins M.M., et al. Systemic immunity is required for effective cancer immunotherapy. *Cell.* 2017; 168 (3): 487–502.

18. Wang L., Simons D.L., Lu X., Tu T.Y., Avalos C., Chang A.Y., et al. Breast cancer induces systemic immune changes on cytokine signaling in peripheral blood monocytes and lymphocytes. *EBioMedicine.* 2020; 52: 102631.

19. He Q., Li G., Ji X., Ma L., Wang X., Li Y., et al. Impact of the immune cell population in peripheral blood on response and survival in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. *Tumour Biol.* 2017; 39 (5): 1–8.

20. Lin K.R., Pang D.M., Jin Y.B., Hu Q., Pan Y.M., Cui J.H., et al. Circulating CD8<sup>+</sup> T-cell repertoires reveal the biological characteristics of tumors and clinical responses to chemotherapy in breast cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 2018; 67 (11): 1743–52.

21. Zenan H., Zixiong L., Zhicheng Y., Mei H., Xiongbin Y., Tiantian W., et al. Clinical prognostic evaluation of immunocytes in different molecular subtypes of breast cancer. *J. Cell. Physiol.* 2019; 234 (11): 20 584–602.

22. Péguillet L., Milder M., Louis D., Vincent-Salomon A., Dorval T., Piperno-Neumann S., et al. High numbers of differentiated effector CD4 T cells are found in patients with cancer and correlate with clinical response after neoadjuvant therapy of breast cancer. *Cancer Res.* 2014; 74 (8): 2204–16.

23. Disis M.L., Stanton S.E. Immunotherapy in breast cancer: an introduction. *Breast.* 2018; 37: 196–9.

24. Huff W.X., Kwon J.H., Henriquez M., Fetcko K., Dey M. The evolving role of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> immunosenescent T cells in cancer immunology. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (11): E2810.

25. Табаков Д.В., Заботина Т.Н., Захарова Е.Н., Борунова А.А., Короткова О.В., Черткова А.И., et al. The subpopulation balance of effector cells in the peripheral blood of cancer patients. *Иммунология.* 2019; 40 (3): 20–7. DOI: <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-13002> (in Russian)

26. Wang K., Xu J., Zhang T., Xue D. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2016; 7 (28): 44288–98.

27. He J. Folate-modified chitosan nanoparticles containing the ip-10 gene enhance melanoma-specific cytotoxic CD8(+)/CD28(+) T lymphocyte responses. *Theranostics.* 2016; 6 (5): 752–61.

28. Fiorentini S., Licenziati S., Alessandri G., Castelli F., Caligaris S., Bonafede M., et al. CD11b expression identifies CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T

lymphocytes with phenotype and function of both naive/memory and effector cells. *J. Immunol.* 2001; 166 (2): 900–7.

29. Song G., Wang X., Jia J., Yuan Y., Wan F., Zhou X., et al. Elevated level of peripheral CD8(+)CD28(-) T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2013; 62 (6): 1123–30.

30. Wang S., Chen L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell. Mol. Immunol.* 2004; 1 (1): 37–42.

31. Chen X., Liu Q., Xiang A.P. CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells: Not only age-related cells but a subset of regulatory T cells. *Cell. Mol. Immunol.* 2018; 15: 734–6.

32. Song Q., Ren J., Zhou X., Wang X., Song G., Hobeika A., et al. Circulating CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> suppressor T cells tied to poorer prognosis among metastatic breast cancer patients receiving adoptive T-cell therapy: a cohort study. *Cytotherapy.* 2018; 20 (1): 126–33.

33. Crouse J., Xu H.C., Lang P.A., Oxenius A. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. *Trends Immunol.* 2015; 36 (1): 49–58.

## Сведения об авторах

**Заботина Татьяна Николаевна** – д.б.н., заведующая отделом клинико-лабораторной диагностики, и.о. заведующего лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [tatzabotina@yandex.ru](mailto:tatzabotina@yandex.ru), <http://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

**Черткова Антонина Ивановна** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [antcher@gmail.com](mailto:antcher@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>

**Кадагидзе Заира Григорьевна** – д.м.н., проф., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [kad-zaira@yandex.ru](mailto:kad-zaira@yandex.ru), <http://orcid.org/0000-0002-0058-098>

**Борунова Анна Анатольевна** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [borunova-a@yandex.ru](mailto:borunova-a@yandex.ru), <http://orcid.org/0000-0002-1854-3455>

**Шоуа Эсма Константиновна** – врач-онколог лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [essfires@gmail.com](mailto:essfires@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-3937-474X>

**Гордеева Ольга Олеговна** – к.м.н., врач-онколог отделения химиотерапии и комбинированного лечения злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [helga.stolz@yandex.ru](mailto:helga.stolz@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-8266-0218>

**Мещеряков Андрей Альбертович** – д.м.н., заведующий отделением химиотерапии и комбинированного лечения злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [a\\_meshcheryakov@mail.ru](mailto:a_meshcheryakov@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-6009-653X>

## Authors' information

**Tatiana N. Zabolina** – Dr.Sci., Head of the Department Clinical and Laboratory Diagnostics, Deputy Head of Clinical Immunology Laboratory of the «N.N. Blokhin NMRCO» MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [tatzabotina@yandex.ru](mailto:tatzabotina@yandex.ru), <http://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

**Antonina I. Chertkova** – PhD, Senior researcher of Clinical Immunology Laboratory of the «N.N. Blokhin NMRCO» MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [antcher@gmail.com](mailto:antcher@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>

**Zaira G. Kadagidze** – MD, Prof., Leader Researcher of Clinical Immunology Laboratory of the «N.N. Blokhin NMRCO» MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [kad-zaira@yandex.ru](mailto:kad-zaira@yandex.ru), <http://orcid.org/0000-0002-0058-098>

**Anna A. Borunova** – PhD, Senior researcher of Clinical Immunology Laboratory of the «N.N. Blokhin NMRCO» MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [borunova-a@yandex.ru](mailto:borunova-a@yandex.ru), <http://orcid.org/0000-0002-1854-3455>

**Esma K. Shoua** – Physician-oncologist of Clinical Immunology Laboratory of the «N.N. Blokhin NMRCO» MOH of Russia, Moscow, Russia; e-mail: [essfires@gmail.com](mailto:essfires@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0003-3937-474X>

**Olga O. Gordeeva** – PhD, Physician-oncologist of Department of Chemotherapy and Combined Treatment of Malignant Tumors of the «N.N. Blokhin NMRCO» MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [helga.stolz@yandex.ru](mailto:helga.stolz@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-8266-0218>

**Andrey A. Meshcheryakov** – MD, Head of Department of Chemotherapy and Combined Treatment of Malignant Tumors of the «N.N. Blokhin NMRCO» MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [a\\_meshcheryakov@mail.ru](mailto:a_meshcheryakov@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-6009-653X>

© Коллектив авторов, 2020

Авербах М.М., Панова Л.В., Овсянкина Е.С., Хитева А.Ю.

## Роль сывороточного амилоида А и С-реактивного белка в прогнозировании послеоперационных осложнений и обострения туберкулезного процесса после хирургического вмешательства у детей старшего возраста и подростков

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования, 107564, г. Москва, Российская Федерация

### Резюме

**Введение.** Поиск ранних лабораторных маркеров, указывающих на развитие обострения или осложнения основного процесса у детей и подростков, оперированных по поводу туберкулеза, является актуальной проблемой.

**Цель** исследования – изучить изменения уровня белков острой фазы воспаления – сывороточного амилоида А (САА) и С-реактивного белка (СРБ) – до операции, через 1 нед и 1–6 мес после ее проведения для раннего прогнозирования послеоперационных осложнений и обострения туберкулеза.

**Материал и методы.** Исследованы 28 пациентов, которым на разных сроках химиотерапии (ХТ) проведены оперативные вмешательства различного объема. Сформированы 2 группы: 1-я – 22 пациента (без осложнений и прогрессирования туберкулеза), 2-я – 6 пациентов (послеоперационные осложнения – 4, прогрессирование туберкулеза – 2). Уровни САА и СРБ изучали методом иммуноферментного анализа.

**Результаты.** В 1-й группе уровень САА до оперативного вмешательства составлял  $13,11 \pm 0,63$  мкг/мл, во 2-й группе –  $14,86 \pm 0,72$  мкг/мл, эти значения достоверно не различались. Через 1 нед после операции в 1-й группе уровень САА был достоверно ниже, чем во 2-й группе ( $12,3 \pm 0,57$  мкг/мл и  $15,2 \pm 0,6$  мкг/мл;  $p = 0,001747$ ). Подобные различия сохранялись и через 1 мес ( $13,57 \pm 0,46$  мкг/мл и  $18,5 \pm 0,21$  мкг/мл,  $p = 0,0096$ ; соответственно). Уровень СРБ в исследованных группах имел сходную динамику. Через 1 нед и через 1 мес после операции во 2-й группе отмечен достоверный подъем уровня СРБ:  $18,8 \pm 0,76$  мг/л и  $14,75 \pm 1,4$  мг/л ( $p = 0,017581$ ), и  $18,6 \pm 1,1$  мг/мл и  $12,8 \pm 1,73$  мг/мл ( $p = 0,009067$ ) соответственно.

**Заключение.** Одновременное повышение уровней СРБ и САА на ранних сроках после операции служит прогностическим критерием послеоперационного осложнения (экссудативный плеврит) или обострения туберкулеза.

**Ключевые слова:** обострение туберкулеза; послеоперационные осложнения; дети; подростки; сывороточный амилоид А; С-реактивный белок

Статья поступила 21.05.2020. Принята к печати 16.06.2020.

**Для цитирования:** Авербах М.М., Панова Л.В., Овсянкина Е.С., Хитева А.Ю. Роль сывороточного амилоида А и С-реактивного белка в прогнозировании послеоперационных осложнений и обострения туберкулезного процесса после хирургического вмешательства у детей старшего возраста и подростков. Иммунология. 2020; 41 (4): 337–343. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-337-343>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках НИР № 0515-2019-0016 «Персонализированные подходы к лечению туберкулеза органов дыхания у детей и подростков».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции  
Авербах Михаил Михайлович –  
доктор медицинских наук, профессор,  
главный научный сотрудник  
отдела иммунологии  
ФГБНУ «ЦНИИТ»  
Минобрнауки России,  
Москва, Российская Федерация  
E-mail: amm50@mail.ru  
<http://orcid.org/0000-0001-7706-3841>

Averbakh M.M., Panova L.V., Ovsyankina E.S., Khiteva A.Yu.

## The importance of serum amyloid A and C-reactive protein in predicting postoperative complications and exacerbation of tuberculosis after surgical intervention in children of older age

Central Tuberculosis Research Institute of the Ministry of Higher Education and Science of the Russian Federation, 107564, Moscow, Russian Federation

### Summary

**Introduction.** The search for early laboratory markers of tuberculosis progression after surgical treatment in children and adolescents is an urgent problem.

**Aim.** Analysis of the level of production of markers of the acute phase of inflammation – serum amyloid A (SAA) and C-reactive protein (CRP) – before and after surgery in dynamics in order to predict postoperative complications and exacerbate the tuberculosis process.

**Material and methods.** The study was conducted on 28 patients who underwent various surgical interventions after different chemotherapy regimens. The 1<sup>st</sup> group included 22 patients who lacked complications and progression of tuberculosis. The 2<sup>nd</sup> group included 6 patients with postoperative signs of tuberculosis progression.

**Results.** SAA and CRP were examined before and one week and 1–6 months after surgery. In the 1<sup>st</sup> group, the SAA level before surgery was  $13.11 \pm 0.63 \mu\text{g/ml}$ , in the 2<sup>nd</sup> group –  $14.86 \pm 0.72 \mu\text{g/ml}$  and had no statistical differences. After 1 week after surgery in the 1st group patients, SAA level was significantly lower than in the 2<sup>nd</sup> group ( $12.3 \pm 0.57$  and  $15.2 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ , respectively,  $p = 0.001747$ ). Similar differences occurred after 1 month ( $13.57 \pm 0.46 \mu\text{g/ml}$  and  $18.5 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$ ,  $p = 0.0096$ ). The CRP level had similar dynamics. One week and one month after the operation, the 2<sup>nd</sup> group patients had a reliable rise of the CRP level ( $14.75 \pm 1.4 \text{ mg/l}$  and  $18.8 \pm 0.76 \text{ mg/l}$ ,  $p = 0.017581$ , and  $12.8 \pm 1.73$  and  $18.6 \pm 1.1 \text{ mg/ml}$ ,  $p = 0.009067$ ), respectively.

**Conclusion.** The simultaneous increase of CRP and SAA levels earlier after surgery can serve as prognostic criteria for postoperative complications (exudative pleurisy) or exacerbation of tuberculosis.

**Keywords:** tuberculosis exacerbation; postoperative complication; children; adolescents; serum amyloid A; C-reactive protein

Received 21.05.2020. Accepted 16.06.2020.

**For citation:** Averbakh M.M., Panova L.V., Ovsyankina E.S., Khiteva A.Yu. The importance of serum amyloid A and C-reactive protein in predicting postoperative complications and exacerbation of tuberculosis after surgical intervention in children of older age. *Immunologiya*. 2020;41 (4): 337–43. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-337-343> (in Russian)

**Funding.** The study supported by Scientific Research No. 0515-2019-0016 «Personalized Approaches to the Treatment of Respiratory Tuberculosis in Children and Adolescents».

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

### Введение

В настоящее время наряду со снижением показателя заболеваемости туберкулезом детей (2018 г. – 8,3; 2017 г. – 9,6 на 100 000 детей) и подростков (соответственно 21,2 и 18,1 на 100 000 подростков) отмечается увеличение доли больных с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза (МЛУ МБТ) среди бактериовыделителей (2018 г. – 30,0 и 36,8 на 100 000, а в 2017 г. – 39,9 и 47,5 на 100 000 соответственно) [1]. В комплексном лечении этой категории пациентов значительное место занимают хирургические методы, что требует тщательного наблюдения в послеоперационном периоде. В связи с этим поиск новых лабораторных кри-

териев раннего прогнозирования послеоперационных осложнений и обострения туберкулеза после хирургического вмешательства до развития рентгенологических изменений являются актуальной задачей [2].

Основными иницирующими факторами развития тканевой и системной воспалительной реакции при туберкулезе являются как антигены микобактерий, так и молекулы эндогенного происхождения, возникающие вследствие тканевого стресса в очаге инфекции, что сопровождается поступлением в системный кровоток из очага воспаления различных цитокинов и медиаторов воспаления [3]. Наиболее изученными маркерами реакций системного воспалительного ответа являются белки

### For correspondence

Mikhail M. Averbakh –  
MD, Professor,  
Immunology Department,  
CTRI, Ministry of Higher Education  
and Science of the Russian Federation,  
Moscow, Russian Federation  
E-mail: amm50@mail.ru  
<http://orcid.org/0000-0001-7706-3841>

острой фазы воспаления, функции и уровни продукции большинства которых при туберкулезе достаточно хорошо изучены [4]. Уровень С-реактивного белка (СРБ) является информативным и наиболее широко используемым критерием. Уровень СРБ у больных плевритом туберкулезной этиологии в плевральной жидкости и сыворотке достаточно высок (30 мг/л и 65,5 мг/л соответственно), что значительно превышает его содержание в образцах, взятых от больных плевритом иной этиологии [5]. J. Brown и соавт. [6] исследовали содержание сывороточного СРБ в зависимости от выраженности туберкулезного процесса и наличия бактериовыделения. Уровень СРБ в случаях распространенных процессов и бактериовыделения был значительно выше, чем при ограниченных процессах без бактериовыделения – 49 мг/л (16–103 мг/л) и 19 мг/л (5–72 мг/л);  $p < 0,001$  [6].

Сывороточный амилоид А (САА) также является быстро и сильно реагирующим маркером острой фазы воспаления. Его динамика и функция достаточно хорошо изучены при различных формах туберкулеза [7–9]. Исследования значимости уровня продукции САА при туберкулезе у больных детей и подростков немногочисленны, и наиболее низкие показатели выявлены у детей 1–6 лет с первичным туберкулезным комплексом. У группы больных с вторичными формами туберкулеза и бактериовыделением при положительной рентгенологической динамике в легких после 3-месячного курса лечения исходные показатели САА были достоверно выше, чем у детей без бактериовыделения, и быстро снижались под влиянием химиотерапии. Наиболее высокие показатели САА отмечены в группах больных с деструктивными изменениями в легочной ткани и милиарным туберкулезом. У данной категории положительная динамика изменения концентрации САА под воздействием противотуберкулезной химиотерапии была выражена незначительно. Авторы проводили параллельное исследование концентрации СРБ у этих больных и динамика его изменения была сходна с показателями САА [10].

Г.О. Каминская и соавт. [11] также сопоставляли показатели САА и СРБ у взрослых больных активным туберкулезом. Авторы показали, что чувствительность определения САА в качестве маркера активности процесса выше, чем у СРБ, поскольку его повышенные значения обнаруживались у 99,0 % больных, тогда как показатели СРБ в 19,3 % случаев укладывались в пределы нормы. Степень повышения уровня САА также была гораздо выше: превышающие 100 мг/л значения содержания САА наблюдались у 68,8 % больных, а СРБ – лишь в 11,1 % случаев. Степень повышения уровня САА была прямо связана с выраженностью интоксикации и массивностью бактериовыделения, видом лекарственной устойчивости МБТ, распространенностью процесса и наличием деструкции легочной ткани. Тем не менее даже у больных с ограниченными процессами, без распада и бактериовыделения, средние показатели САА группировались вокруг уровня 100 мг/л, т. е. на порядок

превышали верхнюю границу нормы. Максимальные значения уровня САА у больных туберкулезом легких достигали 247 мг/л. При благоприятном эффекте лечения через 3 мес химиотерапии уровень САА снижался примерно вдвое, но оставался значительно увеличенным по отношению к норме. При неэффективном лечении он существенно не менялся.

В научной литературе мы не встретили работ, посвященных изучению динамики СРБ и САА у детей и подростков после хирургического вмешательства по поводу туберкулеза органов дыхания и их значимости для оценки развития послеоперационных осложнений и обострения заболевания.

**Цель исследования** – изучить изменения уровня маркеров острой фазы воспаления (САА и СРБ) до операции, через 1 нед и 1–6 мес после ее проведения для раннего прогнозирования послеоперационных осложнений и обострения туберкулеза.

## Материал и методы

Проведено когортное проспективное исследование за 2018–2019 гг., в которое включены 28 пациентов. Структура клинических форм туберкулеза органов дыхания на момент планового оперативного вмешательства представлена на рисунке.

Из рисунка видно, что в структуре клинических форм туберкулеза органов дыхания преобладали туберкулемы – 67,9 % (из них с распадом 21,4 %), в равном проценте случаев (по 7,1) – фиброзно-кавернозный туберкулез, эмпиема плевры и «туморозная» форма туберкулеза внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ), экссудативный плеврит в фазе осумкования, кавернозный туберкулез и казеозная пневмония – по 3,6 %.



Структура клинических форм туберкулеза на момент операции  
 \* из них с распадом – 6 (21,4%)

Таблица 1. Объем и виды оперативного вмешательства

Объем и вид операции	Абс. число	Доля (%)
Краевая резекция 1 сегмента	6	21,4
Комбинированная резекция 3–4 сегментов (в том числе 1 с лимфодиссекцией 3 групп с ВГЛУ)	5 (1)	17,9 (3,6)
Краевая резекция 2 сегментов	4	14,3
Анатомическая резекция 2 сегментов	3	10,7
Плеврэктомия	3	10,7
Лобэктомия	2	7,1
Анатомическая резекция 1 сегмента	2	7,1
Плевропульмонэктомия	2	7,1
Лимфодиссекция 3 групп с ВГЛУ	1	3,6
ВСЕГО	28	100

*Примечание.* ВГЛУ – туберкулез внутригрудных лимфатических узлов.

Всем пациентам на разных сроках химиотерапии проведены оперативные вмешательства различного объема (табл. 1). Операции выполнены в плановом порядке, на момент их проведения признаки лабораторной (в гемограмме: ускоренная СОЭ, лейкоцитоз, сдвиг лейкоцитарной формулы влево) и рентгенологической активности воспалительного процесса отсутствовали.

Из табл. 1 видно, что наиболее часто выполнялись краевые резекции легких в объеме до 2 сегментов – в 35,7 % случаев, комбинированные резекции легких – в 17,9 % и анатомические резекции до 2 сегментов – в 17,8 %.

Кровь для исследования уровня САА и СРБ брали до оперативного вмешательства, через неделю после операции и далее – ежемесячно до завершения основного курса ХТ. Оценка уровня маркеров острой фазы воспаления определяли методом иммуноферментного анализа в плазме с К<sub>3</sub>ЭДТА, полученной центрифугированием образцов периферической крови исследуемых больных.

САА определяли с помощью набора SEA885Hu (Cloud-Clone Corp., США), согласно инструкции изготовителя. Диапазон определения тест-системы – 1,56–100 нг/мл, минимальная определяемая концентрация – 0,66 нг/мл. Образцы плазмы предварительно разводили 1 : 100 с помощью раствора для разведения. Полученные результаты выражали в мкг/мл.

СРБ тестировали с помощью набора реагентов для высокочувствительного иммуноферментного определения СРБ-ИФА («Вектор Бест», Российская Федерация). Диапазон определения: 0,1–200 МЕ/л, чувствительность – 0,05 МЕ/л. Образцы плазмы предварительно разводили 1 : 100 с помощью раствора для разведения. Полученные показатели пересчитывали в мг/л с использованием коэффициента пересчета 1,020.

Все пациенты находились под наблюдением фтизиатра и хирурга. Через 14 дней после операции выполняли обзорную рентгенограмму органов грудной клетки в двух проекциях (прямой и боковой на стороне операции) для оценки расправления оперированного легкого и мониторинга развития реактивного плеврита. При рентгенологических признаках плеврита и в случаях

наличия жалоб на боль в грудной клетке проводили ультразвуковое исследование (УЗИ) плевральной полости для оценки объема экссудата.

Компьютерную томографию органов грудной клетки (КТ ОГК) проводили на различных сроках после операции:

- при объеме операции менее 2 сегментов, отсутствии у пациента симптомов обострения заболевания или осложнений КТ ОГК проводили через 2 мес после операции;
- при операциях большого объема (более 2 сегментов), комбинированных резекциях более 3 сегментов и плевропульмонэктомии – через 1 мес после оперативного вмешательства с целью контроля расправления оперированного легкого и формирования фиброторакса; в последующем – каждые 2 мес до завершения основного курса ХТ.

Статистическую обработку материала проводили с помощью программы Microsoft Excel. Для каждой группы вычисляли среднее арифметическое ( $M$ ), ошибку среднего ( $m$ ) и доверительный интервал (ДИ). Сравнение групповых средних проводили с помощью критерия Стьюдента. Статистическая значимость считалась достигнутой при  $p < 0,05$ .

## Результаты

С целью изучения влияния травмы легочной ткани при оперативном вмешательстве на показатели маркеров острой фазы воспаления пациенты были разделены на 2 группы. В 1-й группе ( $n = 15$ ) объем оперативного вмешательства составил 1–2 сегмента легочной ткани, во 2-й группе ( $n = 13$ ) – более 2 сегментов (табл. 2).

Изучение показателей сывороточного амилоида А и СРБ в исследованных группах не выявило статистически значимых различий в зависимости от объема оперативного вмешательства до операции и через 1 нед после оперативного вмешательства.

С целью изучения прогностического значения (послеоперационные осложнения, прогрессирование туберкулезного процесса) повышения показателей маркеров острой фазы воспаления были сформированы 2 группы. В 1-ю группу включены 22 больных (без послеоперационных осложнений и прогрессирования тубер-

**Таблица 2.** Показатели маркеров острой фазы воспаления до операции и через неделю после операции в зависимости от объема оперативного вмешательства

Маркеры острой фазы воспаления	Объем операции 1–2 сегмента (n = 15)		Объем операции более 2 сегментов (n = 13)	
	перед операцией	через 1 нед после операции	перед операцией	через 1 нед после операции
Сывороточный амилоид А (мкг/мл)	12,58 ± 0,9 ДИ ±1,76	11,90 ± 0,3 ДИ ±0,59	14,28 ± 0,49 ДИ ± 0,96	14,36 ± 0,55 ДИ ±1,07
С-реактивный белок (мг/л)	12,45 ± 1,13 ДИ ±2,21	16,1 ± 2,2 ДИ ±4,31	13,9 ± 0,9 ДИ ±1,76	17,1 ± 2,17 ДИ ±4,25

*Примечание.* Здесь и в табл. 3: ДИ – доверительный интервал.

кулеза), во 2-ю группу – 6 больных (послеоперационные осложнения – 4, прогрессирование туберкулезного процесса – 2). У 4 больных с осложнением отмечено развитие плеврита объемом от 50 до 120 мл.

Изучение уровня и динамики САА в 1-й группе показало, что его уровень до оперативного вмешательства составлял 13,11 ± 0,63 мкг/мл. Во 2-й группе этот показатель составил 14,86 ± 0,72 мкг/мл, что статистически не отличалось от соответствующего значения в 1-й группе (табл. 3).

Через 1 нед и через 1 мес после операции в 1-й группе уровень САА был достоверно ниже, чем во 2-й группе (12,3 ± 0,57 мкг/мл и 15,2 ± 0,6 мкг/мл;  $p = 0,001747$  и 13,57 ± 0,46 мкг/мл и 18,5 ± 0,21 мкг/мл;  $p = 0,0096$  соответственно). В последующие сроки наблюдения показатели в группах колебались незначительно и не имели статистически достоверных различий.

Уровень СРБ до оперативного вмешательства статистически не различался в исследуемых группах и находился в 1-й группе на уровне 10,3 ± 1,4 мг/л и во 2-й группе 14,85 ± 2,17 мг/л (табл. 4).

Во 2-й группе по сравнению с 1-й группой через 1 нед и через 1 мес после операции отмечен достоверный подъем уровня СРБ (18,8 ± 0,76 мг/л и 14,75 ± 1,4 мг/л;  $p = 0,017581$  и 18,6 ± 1,1 мг/л и 12,8 ± 1,73 мг/л;  $p = 0,009067$  соответственно).

Таким образом, повышение уровней САА и СРБ после операции свидетельствует о развитии воспаления и требует дополнительных исследований с целью выявления послеоперационных осложнений или обострения туберкулеза. Последующий анализ показал, что у 4 пациентов с послеоперационными плевритами во всех случаях подъем САА и СРБ предшествовал выявлению экссудата в плевральной полости, по данным УЗИ. Развитие осложнений было диагностировано, по данным УЗИ плевральной полости, в 1 случае через 2 нед после операции, в 3 – через 1 мес. При этом во всех случаях не наблюдалось клинической картины развившихся осложнений в виде болей в грудной клетке. Следует отметить, что показатели, отражающие воспалительные изменения, в гемограмме также отсутствовали. Обострение специфического процесса было отмечено в 2 случаях. В обоих случаях обострение выявлено по результатам КТ ОГК. У 1 пациента

через 1 мес после операции, по данным КТ ОГК, проведенного досрочно, учитывая большой объем операции (комбинированная резекция), отмечено появление фокуса инфильтрации с нечеткими контурами в оперированном легком. В другом случае при плановом контроле КТ ОГК через 2 мес после операции выявлен инфильтрат с полостью распада до 3 мм в диаметре. Коррекция химиотерапии позволила достичь положительной рентгенологической динамики: в одном случае через 4 мес после операции отмечено полное рассасывание инфильтрации, в другом – через 2 мес после операции (через 1 мес после коррекции схемы химиотерапии) отмечено закрытие полости распада.

## Обсуждение

На настоящий момент основная масса работ в области иммунологии туберкулезной инфекции сосредоточена на двух основных направлениях, которыми являются поиск критериев иммунологической диагностики латентной стадии ее течения и активности различных форм

**Таблица 3.** Показатели сывороточного амилоида А (мкг/мл) до и после операции в зависимости от наличия послеоперационных осложнений или прогрессирования туберкулезного процесса

Срок исследования	1-я группа (n = 22)	2-я группа (n = 6)
До операции	13,11 ± 0,63 ДИ ± 1,23	14,86 ± 0,72 ДИ ± 1,41
После операции		
1 нед	12,3 ± 0,57 ДИ ± 1,1	<b>15,2 ± 0,6*</b> ДИ ± 1,17
1 мес	13,57 ± 0,46 ДИ ± 0,9	<b>18,5 ± 0,21**</b> ДИ ± 0,41
2 мес	13,28 ± 0,51 ДИ ± 0,99	17,71 ± 2,1 ДИ ± 4,1
3 мес	14,6 ± 1,1 ДИ ± 2,15	14,25 ± 1,2 ДИ ± 2,35
4 мес	13,2 ± 0,65 ДИ ± 1,27	14,63 ± 0,52 ДИ ± 1,01
5 мес	13,8 ± 1,1 ДИ ± 2,15	15,05 ± 0,52 ДИ ± 1,01
6 мес	14,9 ± 1,1 ДИ ± 2,15	15,6 ± 0,83 ДИ ± 1,62

*Примечание.* \* –  $p = 0,001747$ ; \*\* –  $p = 0,0001$ .

**Таблица 4.** Показатели С-реактивного белка плазмы крови (мг/л) до и после оперативного лечения в сравниваемых группах

Срок исследования	1-я группа (n = 22)	2-я группа (n = 6)
До операции	10,3 ± 1,4 ДИ ± 2,74	14,85 ± 2,17 ДИ ± 4,25
После операции		
1 нед	14,75 ± 1,4 ДИ ± 2,74	<b>18,8 ± 0,76*</b> <b>ДИ ± 1,49</b>
1 мес	12,8 ± 1,73 ДИ ± 3,4	<b>18,6 ± 1,1**</b> <b>ДИ ± 2,16</b>
2 мес	10,36 ± 1,75 ДИ ± 3,43	14,83 ± 2,63 ДИ ± 4,62
3 мес	4,4 ± 0,83 ДИ ± 1,63	11,14 ± 2,84 ДИ ± 5,57
4 мес	7,9 ± 1,8 ДИ ± 3,53	9,56 ± 3,38 ДИ ± 6,62
5 мес	7,5 ± 1,5 ДИ ± 2,94	10,3 ± 3,25 ДИ ± 6,37
6 мес	5,1 ± 1,28 ДИ ± 2,51	10,53 ± 2,7 ДИ ± 5,29

*Примечание.* \* –  $p = 0,017581$ ; \*\* –  $p = 0,009067$ .

туберкулеза [12]. Исследования, посвященные прогнозированию риска обострения туберкулезного процесса после оперативного вмешательства, единичные и касаются взрослого контингента больных. А.В. Елькин и соавт. [13] представили данные о развитии обострения специфического процесса в виде эмпиемы плевры у 37 % больных, оперированных по поводу фиброзно-кавернозного туберкулеза. Прогностическими неблагоприятными критериями стали совокупность и определенный уровень до операции ряда биохимических показателей (аденозиндеаминаза-1, сывороточный альбумин,  $\alpha_2$ -макроглобулин и ингибитор  $\alpha_1$ -протеазы) [13].

Роль белков острой фазы воспаления (СРБ и САА) при туберкулезе исследовали в основном для контроля эффективности лечения. М.А. De Groote и соавт. (2013)

использовали высокоспецифичную мультиплексную платформу определения большого числа белков в сыворотке 39 больных с активной формой туберкулеза. Мониторинг белковых показателей проводили до начала и через 8 нед специфической терапии. Было показано, что СРБ, САА, гаптоглобин и ингибитор  $\alpha_1$ -протеазы снижались к 8-й неделе практически у всех больных. Активность туберкулезного процесса (бактериовыделение, наличие полостей распада) выражалась в более высоких показателях СРБ и САА лишь у половины исследованных больных [14]. Исследования уровней СРБ и САА у детей и подростков, больных туберкулезом, дают более противоречивые результаты [15], и значимость этих маркеров для прогнозирования послеоперационных осложнений и обострения туберкулезного процесса после хирургического вмешательства ранее не изучались. Вместе с тем новые данные о структуре и функции СРБ и САА и современные методы их определения с помощью высокочувствительных тест-систем могут значительно расширить диагностические и прогностические возможности данных маркеров [6, 9].

## Выводы

1. Объем операции, выполненной в плановом порядке по поводу туберкулеза органов дыхания, не влияет на уровни САА и СРБ через 1 нед после оперативного вмешательства.

2. Одновременное повышение уровней СРБ и САА на ранних сроках после операции (1 нед, 1 мес) свидетельствует о развитии воспалительного процесса и служит прогностическим критерием послеоперационного осложнения (экссудативный плеврит) или обострения туберкулезного процесса.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Овсянкина Е.С., Панова Л.В.; сбор и обработка материала – Хитева А.Ю., Авербах М.М.; статистическая обработка – Авербах М.М.; написание текста – Хитева А.Ю.; редактирование – Панова Л.В.

## Литература

1. Основные показатели по туберкулезу в Российской Федерации за 2018 г. Федеральный Центр мониторинга противодействия распространению туберкулеза в Российской Федерации ФГБУ «ЦНИИОИЗ» Минздрава России. URL: [https://mednet.ru/images/materials/СМТ/2019\\_god\\_tuberkulez\\_deti.pdf](https://mednet.ru/images/materials/СМТ/2019_god_tuberkulez_deti.pdf)

2. Овсянкина Е.С., Эргешов А.Э., Губкина М.Ф., Панова Л.В., Юхименко Н.В. Научные достижения и перспективы научных исследований детско-подросткового отдела ФГБНУ «ЦНИИТ» (к 100-летию детско-подростковой клиники ФГБНУ «ЦНИИТ»). Вестник ЦНИИТ. 2019; (3): 5–12. DOI: <https://doi.org/10.7868/S2587667819030014>

3. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления. Медицинская иммунология. 2012; 14 (1–2): 9–20. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2012-1-2-9-20>

4. Авербах М.М., Гергерт В.Я. Иммуитет при туберкулезе. В кн.: Туберкулез органов дыхания у детей и подростков: руководство для врачей. Эргешов А.Э., Овсянкина Е.С., Губкина М.Ф. (ред.). Москва, 2019: 524 с.

5. Алинежад С.М., Будник О.А., Таганович А.Д. Динамика изменения концентрации С-реактивного белка и активности аденозиндеаминазы при туберкулезном плеврите и их дифференциально-диагностическая ценность. Медицинский журнал. 2008; (2): 21–5. URL: <http://rep.bsmu.by/handle/BSMU/3290>

6. Brown J., Clark K., Smith K. et al. Variation in C-reactive protein response according to host and mycobacterial characteristics in active tuberculosis. BMC Infect. Dis. 2016; (16): 265. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1612-1>

7. Jayaraman S., Haupt C., Gurs O. Paradoxical effects of serum amyloid A on the lipoprotein oxidation suggest a new antioxidant function for SAA. J. Lipid Res. 2016; 57 (12): 2138–49. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.M07119157>

8. Shah C., Hari-Dass R., Raynes J.G. Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. Blood. 2006; 108 (5): 1751–7. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-011932>

9. Ye R.D., Sun L. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. J. Leukoc. Biol. 2015; 98 (6): 923–9. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.3VMR0315-080R>

10. De Beer F.C., Nel A.E., Qie R.P. et al. Serum amyloid A protein and C-reactive protein levels in pulmonary tuberculosis: relationship to amyloidosis. *Thorax*. 1984; 39 (3): 196–200. DOI: <https://doi.org/10.1136/thx.39.3.196.84>

11. Каминская Г.О., Абдулаев Р.Ю., Комиссарова О.Г. Сыровоточный амилоидный белок А у больных туберкулезом легких. Туберкулез и болезни легких. 2012; (5): 27–32.

12. Владимирский М.А. Иммунологические методы диагностики туберкулезной инфекции у детей и подростков. проблемы и перспективы. *Иммунология*. 2018; 39 (1): 61–6. DOI: <http://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-61-66>

## References

1. The main indicators for tuberculosis in the Russian Federation for 2018 are the Federal Center for Monitoring the Response to the Spread of Tuberculosis in the Russian Federation FSBI TsNIOISE of the Ministry of Health of Russia. URL: [https://mednet.ru/images/materials/CMT/2019\\_god\\_tuberkulez\\_deti.pdf](https://mednet.ru/images/materials/CMT/2019_god_tuberkulez_deti.pdf) (in Russian)

2. Ovsyankina E.S., Ergeshov A.E., Gubkina M.F., et al. Scientific achievements and prospects of scientific research of the children's and adolescents', CTRI (dedicated to the 100th anniversary of the children's and adolescents' clinic, CTRI). *Vestnik TsNIIT*. 2019; (3): 5–12. DOI: <https://doi.org/10.7868/S2587667819030014> (in Russian)

3. Chereshev V.A., Gusev E.Yu. Immunological and pathophysiological mechanisms of systemic inflammation. *Meditsinskaya immunologiya*. 2012; 14 (1–2): 9–20. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2012-1-2-9-20> (in Russian)

4. Averbakh M.M., Gergert V.Ya. Immunity in tuberculosis. In: Ergeshov A.E., Ovsyankina E.S., Gubkina M.F. (eds). *Respiratory Tuberculosis in Children and Adolescents. A guide for doctors*. Moscow, 2019: 524 p. (in Russian)

5. Alinezhad S.M., Budnik O.A., Taganovich A.D. Dynamics of change of C-reactive protein concentration and adenosine deaminase activity in tuberculosis pleurisy and their differential diagnostic value. *Meditsinskiy zhurnal*. 2008; (2): 21–5. URL: <http://rep.bsmu.by/handle/BSMU/3290> (in Russian)

6. Brown J., Clark K., Smith K., et al. Variation in C - reactive protein response according to host and mycobacterial characteristics in active tuberculosis. *BMC Infect. Dis.* 2016; (16): 265. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1612-1>

7. Jayaraman S., Haupt C., Gurs O. Paradoxical effects of serum amyloid a on the lipoprotein oxidation suggest a new antioxidant function for SAA. *J. Lipid Res.* 2016; 57 (12): 2138–49. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.M07119157>

13. Елькин А.В., Титаренко О.Т., Эсмельдяева Д.С., Дьякова М.Е., Алексеева Н.П., Перова Т.Л. Оценка риска послеоперационных инфекционных осложнений у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких. Туберкулез и болезни легких. 2009; 86 (5): 31–4.

14. De Groote M.A., Nahid P., Jarlsberg L. et al. Elucidating novel serum biomarkers associated with pulmonary tuberculosis treatment. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, N 4. Article ID e61002. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0061002>

15. Kumar N.P., Anuradha R., Andrade B.B. et al. Circulating biomarkers of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in children. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20 (5): 704–11. DOI: <http://doi.org/10.1128/CVI.00038-13>

8. Shah C., Hari-Dass R., Raynes J.G. Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood*. 2006; 108 (5): 1751–7. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-011932>

9. Ye R.D., Sun L. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2015; 98 (6): 923–9. DOI: <https://doi.org/10.1189/jlb.3VMR0315-080R>

10. De Beer F.C., Nel A.E., Qie R.P., et al. Serum amyloid A protein and C-reactive protein levels in pulmonary tuberculosis: relationship to amyloidosis. *Thorax*. 1984; 39 (3): 196–200. DOI: <https://doi.org/10.1136/thx.39.3.196.84>

11. Kaminskaya G.O., Abdulaev R.Yu., Komissarova O.G. Serum amyloid protein A in patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2012; (5): 27–32. (in Russian)

12. Vladimirsky M.A. Immunological methods for Tb infection diagnostics in children and adolescents. Challenges and opportunities. *Immunologiya*. 2018; 39 (1): 61–6. DOI: <http://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-61-66> (in Russian)

13. Elkin A.V., Titarenko O.T., Esmel'dyaeva D.S., D'yakova M.E., Alekseeva N.P., Perova T.L. Assessment of the risk of postoperative infectious complications in patients with fibrous-cavernous pulmonary tuberculosis. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2009; 86 (5): 31–4. (in Russian)

14. De Groote M.A., Nahid P., Jarlsberg L., et al. Elucidating novel serum biomarkers associated with pulmonary tuberculosis treatment. *PLoS One*. 2013; 8 (4): e61002. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0061002>

15. Kumar N.P., Anuradha R., Andrade B.B., et al. Circulating biomarkers of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in children. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20 (5): 704–11. DOI: <http://doi.org/10.1128/CVI.00038-13>

## Сведения об авторах

**Авербах Михаил Михайлович** – д.м.н., проф., главный научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «ЦНИИТ» Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [amm50@mail.ru](mailto:amm50@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0001-7706-3841>

**Панова Людмила Владимировна** – д.м.н., ведущий научный сотрудник детско-подросткового отдела ФГБНУ «ЦНИИТ» Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [detstvociit@mail.ru](mailto:detstvociit@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0003-2417-8295>

**Овсянкина Елена Сергеевна** – д.м.н., проф., руководитель детско-подросткового отдела ФГБНУ «ЦНИИТ» Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [detstvociit@mail.ru](mailto:detstvociit@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-0460-7585>

**Хитева Антонина Юрьевна** – м.н.с. детско-подросткового отдела ФГБНУ «ЦНИИТ» Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [detstvociit@mail.ru](mailto:detstvociit@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0003-3664-1750>

## Authors' information

**Mikhail M. Averbakh** – MD, Prof., Principal Researcher of Immunology Department, CTRI of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [amm50@mail.ru](mailto:amm50@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0001-7706-3841>

**Lyudmila V. Panova** – MD, Leader Researcher of Child and Adolescent Department, CTRI of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [detstvociit@mail.ru](mailto:detstvociit@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0003-2417-8295>

**Elena S. Ovsyankina** – MD, Prof., Head of Child and Adolescent Department, CTRI of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [detstvociit@mail.ru](mailto:detstvociit@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0002-0460-7585>

**Antonina Yu. Khiteva** – Junior Researcher of Child and Adolescent Department, CTRI of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [detstvociit@mail.ru](mailto:detstvociit@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0003-3664-1750>

© Коллектив авторов, 2020

Маркелова Е.В.<sup>1</sup>, Лазанович В.А.<sup>1</sup>, Шуматов В.Б.<sup>1</sup>, Малков В.А.<sup>1</sup>,  
Евсегнеева И.В.<sup>2</sup>

## Клиническая оценка В- и Т-лимфоцитов у пациентов с хирургическим сепсисом

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 690002, г. Владивосток, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

### Резюме

**Введение.** Иммунные нарушения при сепсисе включают в себя широкий спектр реакций от «цитокинового шторма» до глубокой иммуносупрессии. Клеточные реакции врожденного и адаптивного иммунитета ответственны за меняющийся сценарий на разных этапах заболевания. Исследований, касающихся аспектов механизмов иммунного ответа со стороны клеток адаптивного иммунного ответа при сепсисе, мало. Отмечены важные изменения количественного состава и роль В- и Т-лимфоцитов в регуляции воспаления на различных этапах течения сепсиса. Вопрос о возможности их использования в качестве биомаркеров при септических состояниях и критериев при диагностике его фенотипов и эндотипов остается открытым.

**Цель** исследования – провести расширенное исследование клеточного звена адаптивного иммунитета при различных клинических вариантах течения сепсиса в динамике.

**Материал и методы.** Представлены данные проспективного исследования, в котором были проанализированы результаты состояния клеток адаптивного иммунитета 43 пациентов. С учетом тяжести состояния и выраженности органной недостаточности они были распределены на группы по шкале – SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessments Score Sequential Organ Failure Assessment). Забор крови проводился у пациентов в первые 48 ч после поступления в отделение интенсивной терапии и на 21–28-е сутки заболевания. Определение уровня В- и Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), а также субпопуляций Т-лимфоцитов Th1 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>ИФНγ<sup>+</sup>), Th2 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>ИЛ-4<sup>+</sup>), Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>neg</sup>CD45<sup>+</sup>) осуществляли методом проточной цитометрии.

**Результаты.** Отмечена лимфопения на 21–28-е сутки заболевания в группе с более тяжелым течением сепсиса ( $p < 0,05$ ), как относительно группы сравнения, так и по отношению к показателям дебюта болезни. Уровень CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов был снижен в группе с более выраженной тяжестью органной дисфункции относительно группы сравнения ( $p < 0,05$ ) на 21–28-е сутки. В группах с различной степенью органной дисфункции на начальной стадии заболевания (первые 48 ч) не выявлено дисбаланса соотношения Th1 и Th2. На более поздних стадиях (21–28-е сутки) преобладает Th2-субпопуляция Т-лимфоцитов ( $p < 0,05$ ), а в группе с выраженной органной дисфункцией зарегистрировано повышенное содержание Treg ( $p < 0,01$ ).

**Заключение.** Выявлены минимальные изменения со стороны клеток адаптивного иммунитета на начальных стадиях сепсиса, независимо от тяжести течения и степени органной дисфункции. На более поздних сроках (21–28-е сутки) зафиксировано снижение CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов, преобладание Th2-субпопуляции над Th1 ( $p < 0,05$ ), повышенное содержание Treg. Одним из маркеров, позволяющих определять наступление иммуносупрессивной фазы сепсиса, может явиться количество Treg.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия; В-лимфоциты; Т-лимфоциты; Т-регуляторные лимфоциты; сепсис; прогноз

Статья поступила 06.06.2020. Принята в печать 16.07.2020.

**Для цитирования:** Маркелова Е.В., Лазанович В.А., Шуматов В.Б., Малков В.А., Евсегнеева И.В. Клиническая оценка В- и Т-лимфоцитов у пациентов с хирургическим сепсисом. Иммунология. 2020; 41 (4): 344–353. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-344-353>

Для корреспонденции  
Маркелова Елена Владимировна –  
доктор медицинских наук, профессор,  
заведующая кафедрой нормальной  
и патологической физиологии  
ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России,  
Владивосток, Российская Федерация  
E-mail: [markev2010@mail.ru](mailto:markev2010@mail.ru)  
<http://orcid.org/0000-0001-5846-851X>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках внутривузовского научного гранта ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации – «Клинико-иммунологическая оценка биомаркеров системного воспаления для диагностики сепсиса и его фенотипов».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Markelova E.V.<sup>1</sup>, Lazanovich V.A.<sup>1</sup>, Shumatov V.B.<sup>1</sup>, Malkov V.A.<sup>1</sup>,  
Evsegneeva I.V.<sup>2</sup>

## Clinical evaluation of B- and T-lymphocytes in patients with surgical sepsis

<sup>1</sup> Pacific State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 690002, Vladivostok, Russian Federation

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

### Abstract

**Introduction.** Immune disorders in sepsis include a wide range of reactions from the «cytokine storm» to deep immunosuppression. The cellular reactions of the innate and adaptive immune systems are responsible for the changing scenario at different stages of the disease. There is very limited studies on aspects of the mechanisms of the immune response by adaptive immune response cells in sepsis. Important changes in the quantitative composition and the role of B- and T-lymphocytes in the regulation of inflammation at different stages of sepsis were noted. The question of the possibility of their use as biomarkers in septic conditions and criteria for the diagnosis of its phenotypes and endotypes remains open.

**The aim.** An expanded study of the cellular adaptive immunity in various clinical course options of sepsis in dynamics.

**Material and methods.** The data of a prospective study are presented in which the results of the state of cells of adaptive immunity of 43 patients were analyzed. Given the severity of the condition and the severity of organ failure, they were divided into groups on a scale of SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessments Score Sequential Organ Failure Assessment). Blood sampling was performed in patients in the first 48 hours after admission to the intensive care unit and on days 21–28 of the disease. Determination of the level of B- and T-lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), as well as subpopulations of T1 lymphocytes Th1 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>), Th2 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>), Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>neg</sup>CD45<sup>+</sup>) was carried out by flow cytometry.

**Results.** Lymphopenia was noted on days 21–28 of the disease in the group with a more severe course of sepsis ( $p < 0.05$ ), both in comparison with the comparison group and relative to the initial stage of observation. The level of CD19<sup>+</sup>-lymphocytes was reduced in the group with a more pronounced severity of organ dysfunction compared with the comparison group ( $p < 0.05$ ) on days 21–28. In groups with varying degrees of organ dysfunction at the initial stage of the disease (the first 48 hours) there was no imbalance in the ratio of Th1 and Th2. At later stages, days 21–28, Th2 subpopulations of T-lymphocytes predominate ( $p < 0.05$ ), and in the group with severe organ dysfunction, increased content of Treg ( $p < 0.01$ ) was recorded.

**Conclusion.** Minimal changes were revealed on the part of adaptive immunity cells at the initial stages of sepsis, regardless of the severity of the course and the degree of organ dysfunction. At a later date (21–28 days) in patients of both groups (depending on the severity of organ dysfunction), a decrease in CD19<sup>+</sup>-lymphocytes, a predominance of Th2-subpopulation of T-lymphocytes over Th1 ( $p < 0.05$ ), an increased content of Treg compared with the comparison group was revealed. One of the markers that can determine the onset of the immunosuppressive phase of sepsis may be the quantification of Treg.

**Keywords:** flow cytometry; B-lymphocytes; T-lymphocytes; regulatory T-lymphocytes; sepsis; prognosis

### For correspondence

Elena V. Markelova – MD, Professor,  
Head of Normal and Pathological  
Physiology Department,  
Pacific State Medical University,  
Ministry of Health  
of the Russian Federation,  
Vladivostok, Russian Federation  
E-mail: markev2010@mail.ru  
<http://orcid.org/0000-0001-5846-851X>

Received 06.06.2020. Accepted 16.07.2020.

**For citation:** Markelova E.V., Lazanovich V.A., Shumatov V.B., Malkov V.A., Evsegneeva I.V. Clinical evaluation of B- and T-lymphocytes in patients with surgical sepsis. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 344–53. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-344-353> (in Russian)

**Funding.** The study was carried out as part of an internal University scientific grant of the Pacific Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation – «Clinical and immunological evaluation of biomarkers of systemic inflammation for the diagnosis of sepsis and its phenotypes».

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

## Введение

В настоящее время сепсис определен как угрожающая жизни органная дисфункция, вызванная дисрегуляторным ответом организма на инфекцию [1]. Тем не менее в широком смысле под сепсисом продолжают понимать патологический процесс, в основе которого лежит генерализованная (системная) воспалительная реакция на повреждение инфекционной природы (бактериальной, вирусной, грибковой) [2]. Основу данного состояния составляют сложные клеточные взаимодействия врожденного и адаптивного иммунного ответа, реализующегося в ответ на инфекцию и/или эндогенные молекулы – Danger-associated molecular patterns (DAMP), которые образуются в большом количестве при некрозе или ином клеточном дистрессе [3].

Работ о роли клеток врожденного иммунитета, продуцируемых ими цитокинов, биомаркеров системного воспаления достаточно много, а исследований, касающихся аспектов механизмов иммунного ответа со стороны клеток адаптивного иммунитета при сепсисе, весьма ограничено. Адаптивный иммунный ответ осуществляется Т- и В-клетками. Они высокоспецифичны, образуются в результате клональной экспансии *de novo* в ответ на антиген, узнаваемый при помощи паттерн-распознающих рецепторов (PRR) клеток врожденного иммунитета после обработки микробных пептидов антиген-презентирующими клетками. Иммунные реакции клеток адаптивного иммунитета отсрочены по времени, поэтому в начале иммунный ответ при сепсисе, который часто характеризуют как «цитокиновый шторм» с высвобождением большого количества про- и противовоспалительных цитокинов, связывают с реакциями именно врожденного иммунитета. Во многом именно поэтому принято считать, что изменения в начальной фазе воспаления при сепсисе со стороны адаптивного иммунитета минимальны. Тем не менее они характеризуются лимфопенией, повышением содержания нейтрофилов и, по мнению некоторых исследователей, это может быть сопряжено с тяжестью клинического течения заболевания [4]. Но в других работах данные о прогностической роли количественных изменений уровня лимфоцитов ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ), на ранних этапах воспалительной реакции подвергались сомнению и не нашли подтверждения [5]. В рамках другого исследования с использованием многовариантного регрессионного анализа Кокса, с учетом таких показателей, как пол, возраст, APACHE II, уровень иммуноглобулинов, факторов комплемента (C3, C4), основных клеточных субпопуляций лимфоцитов ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , НК-клетки), было установлено отсутствие

корреляционных связей с тяжестью течения септического процесса и летальностью [6]. Исследования, отражающие количественные показатели В-лимфоцитов, также немногочисленны. Показано, что на начальных стадиях септического процесса их уровень не претерпевает значительных изменений [7].

Количественная оценка основных иммунных клеток, реализующих адаптивный иммунитет, может быть начальным и наиболее доступным методом, отражающим состояние иммунного ответа при септической патологии в широкой клинической практике. Следующим уровнем диагностики может быть определение субпопуляций клеток, в частности Т-лимфоцитов, с оценкой экспрессии маркеров, отражающих их функциональное состояние. Именно клетки иммунной системы и их активированные рецепторы играют не только ключевую роль в реакции организма хозяина на инфекцию, но могут быть биомаркерами иммунного ответа при септических состояниях и выступать в качестве критериев диагностики его фенотипов и эндотипов [8]. Это особенно важно на более поздних стадиях заболевания: если ранняя летальность при сепсисе связана с гипертрофической реакцией врожденного иммунитета, то в дальнейшем неблагоприятные исходы во многом обусловлены иммуносупрессией, вызванной реакциями адаптивного иммунитета, где особую роль отводят Т-лимфоцитам [9].

Работы многих авторов указывают на важные изменения и роль различных субпопуляций Т-лимфоцитов в регуляции воспаления при сепсисе [10, 11]. Зрелые  $CD4^+$ -Т-клетки представлены разными подтипами – Th1, Th2 и Th17 – в зависимости от цитокинов в окружении и которые они продуцируют при стимуляции в ходе иммунного ответа. Th1- и Th2-клетки продуцируют различные профили цитокинов: Th1-клетки – интерферон- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), опосредуя клеточный иммунный ответ, а Th2-клетки – ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ИЛ-13. Th1- и Th2-клетки перекрестно регулируют друг друга и их баланс важен для устранения инфекции. Избыточная продукция Th2-цитокинов может вызывать иммуносупрессию при септических состояниях [12]. Еще одним важным наблюдением является то, что на поздней стадии сепсиса исследователи отмечали снижение абсолютного числа циркулирующих Т-клеток ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ), за исключением регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) [13]. Treg важны для индукции и поддержания иммунной толерантности. Недавние исследования показывают, что увеличение количества Treg при сепсисе коррелирует со снижением пролиферации и функциональной активности эффекторных Т-клеток [14, 15].

Несмотря на эти отдельные работы, общепризнанных маркеров или фенотипических особенностей иммунного ответа у пациентов с сепсисом, ассоциированных с различными клиническими вариантами течения заболевания, в настоящее время не выявлено. Данная проблема остается открытой и требует дальнейшего изучения.

**Цель** исследования – расширенное исследование клеточного звена адаптивного иммунитета при различных клинических вариантах течения сепсиса в динамике.

## Материал и методы

**Пациенты и дизайн исследования.** В проспективном исследовании, проведенном на базе краевого Центра анестезиологии и реаниматологии ГБУЗ Приморской краевой клинической больницы № 1 г. Владивостока, были проанализированы исследования клеток адаптивного иммунитета у 43 пациентов. Исследование выполнено с информированного согласия всех пациентов, включенных в исследование, и одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г., протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., и в соответствии со статьями 20, 22, 23 Федерального закона «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ (ред. от 21.07.2014).

Из 43 пациентов, включенных в исследование, больше половины (56 %) составили мужчины ( $n = 24$ ), женщины составили 44 % ( $n = 19$ ). Возраст варьировал от 24 до 72 лет, средний показатель составлял  $51,4 \pm 13,5$  года. Причинами сепсиса являлось распространение инфекционного агента, источниками которого служили органы брюшной полости – 72 % ( $n = 31$ ), легкие – 14 % ( $n = 6$ ), мочевыводящие пути – 9 % ( $n = 4$ ), инфекции кожи и подкожной клетчатки – 5 % ( $n = 2$ ). 28-дневная летальность в 1-й группе (SOFA < 6 баллов) составила 4 (17 %) пациента, во 2-й – с более тяжелым течением септического процесса (SOFA > 6 баллов) – 7 (37 %) пациентов, общая летальность в обеих группах – 11 (26 %) пациентов. Данные о пациентах представлены в табл. 1. Группу сравнения составили практически здоровые, сравнимые по возрасту и полу добровольцы ( $n = 25$ ).

Пациенты были распределены на 2 группы с учетом тяжести состояния и выраженности органной недостаточности. 1-я группа ( $n = 24$ ) – пациенты с диагнозом «сепсис» со степенью тяжести органной дисфункции < 6 баллов по шкале SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessments Score Sequential Organ Failure Assessment). 2-я группа ( $n = 19$ ) – пациенты с диагнозом «сепсис» со степенью тяжести органной дисфункции > 6 баллов по шкале SOFA. Забор крови у пациентов проводили в первые 48 ч после поступления в отделение интенсивной терапии и установки диагноза «сепсис» в соответствии

**Таблица 1.** Характеристика обследованных пациентов

Показатель	Результаты
Средний возраст $M \pm \sigma$ , лет	$51,4 \pm 13,5$
Мужчины/женщины (абс / %)	24/19 (56/44 %)
Органная недостаточность SOFA $M \pm \sigma$ , баллы	$8,3 \pm 3,2$
28-дневная летальность (абс / %)	11 (26 %)

с критериями III международного консенсуса по сепсису и септическому шоку, SCCM-ESICM и Общероссийского экспертного совета РАСХИ и на 21–28-е сутки заболевания [16].

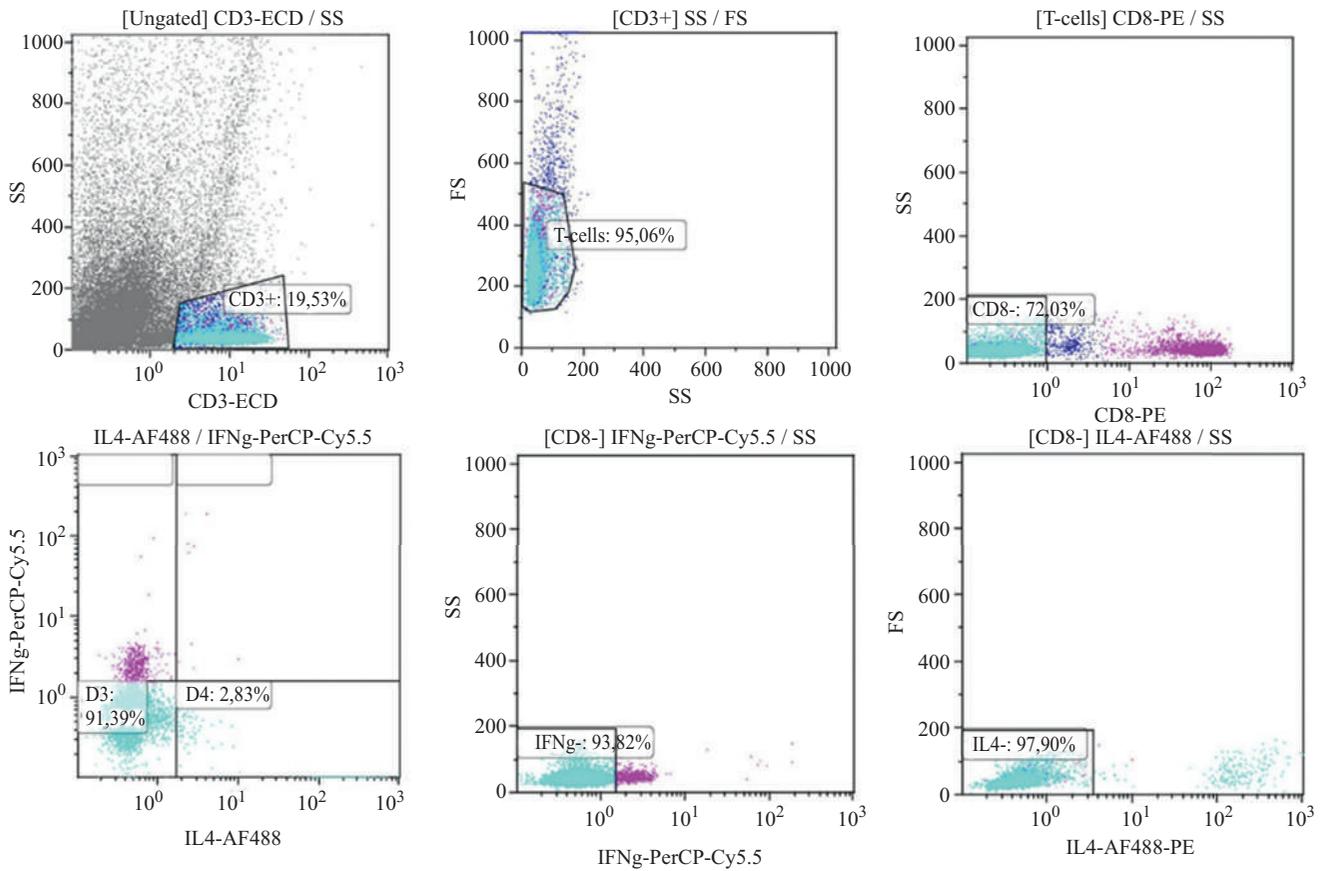
**Забор крови и проточная цитометрия.** Кровь забирали в две стандартные вакуумные пробирки (с гепарином лития и  $K_2$ ЭДТА) не позднее чем через 4 ч после взятия крови проводили лабораторный анализ. Вся последующая обработка крови была стандартизирована и выполнялась одними и теми же реактивами и в одинаковые временные интервалы для всех пациентов.

Определение уровня В- и Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD19^+$ ,  $CD3^+CD19^-$ ,  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ ), а также субпопуляций Т-лимфоцитов Th1 ( $CD3^+CD4^+ИФН-\gamma^+$ ), Th2 ( $CD3^+CD4^+ИЛ-4^+$ ), Treg ( $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{neg}CD45^+$ ) осуществляли методом проточной цитометрии. Их оценку проводили в цельной венозной крови при использовании многоцветного анализа на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter FC 500 с использованием реактивов фирм: Beckman Coulter (США), Thermo Fisher Scientific (США). Учет количества Th1- и Th2-клеток проводили путем анализа продукции внутриклеточных цитокинов (ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4) спустя 18 ч инкубации совместно с коктейлем для стимуляции клеток [форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) + иономицин], предварительно выполнив ингибирование внутриклеточного транспорта при помощи брэфелдина А. В каждой пробе анализировали не менее 25 000 событий по  $CD3^+$ -популяции и проводили гейтирование Th1 и Th2 с учетом постановки изотипического контроля (рис. 1). Treg-клетки определяли как  $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{neg}CD45^+$  (рис. 2).

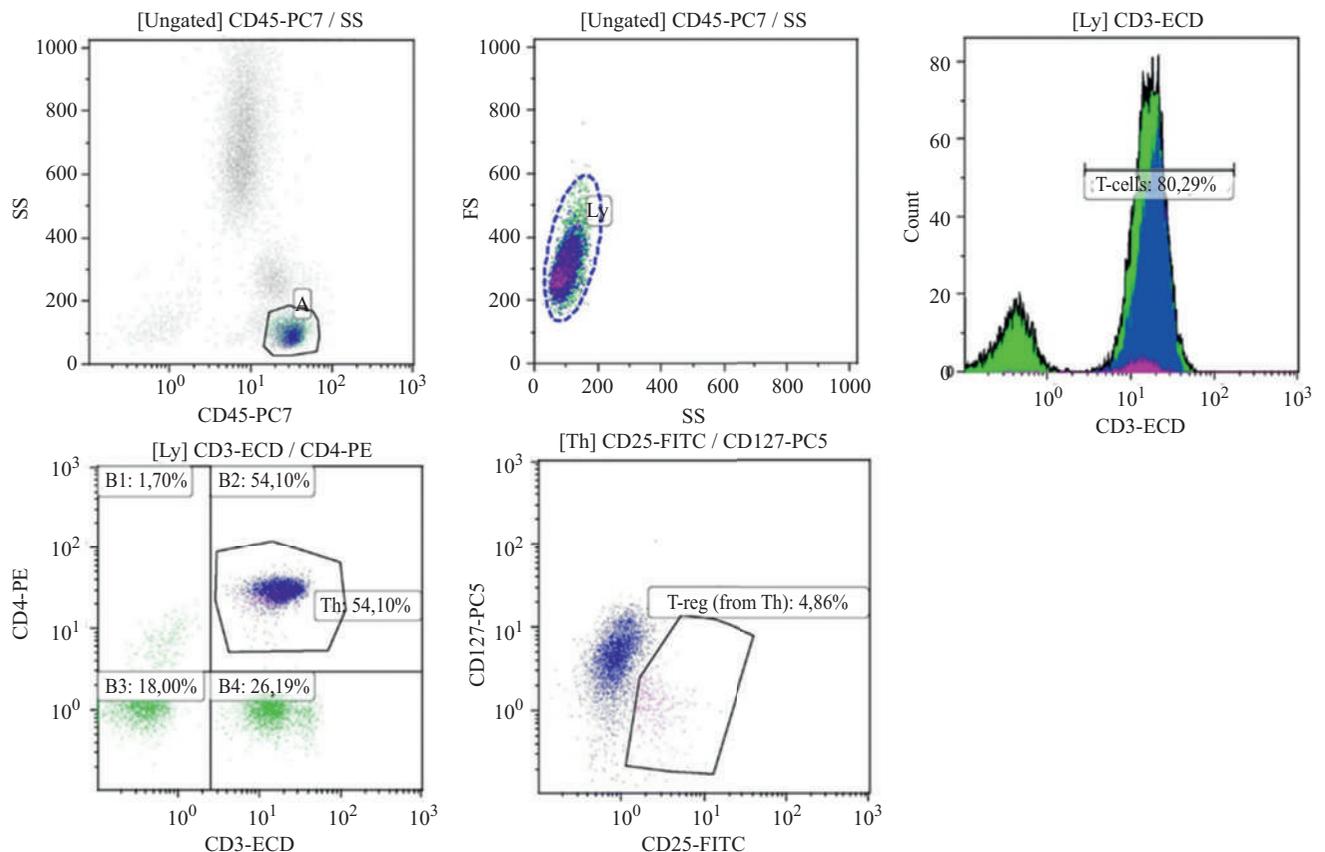
**Статистическая обработка.** Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием пакета прикладных программ Statistica-10 методом Манна–Уитни для независимых выборок. Сопряженность уровня Treg на 21-е и 28-е сутки с исходом заболевания оценивалась с использованием критерия  $\chi^2$ . Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Референсные интервалы для исследуемых показателей представлены в табл. 2, значения для Treg указаны от общего количества лимфоцитов.

## Результаты

Средние значения уровней В- и Т-лимфоцитов и субпопуляций Т-клеток у пациентов обследуемых групп в зависимости от выраженности органной дисфункции в динамике заболевания, полученные в ходе исследования, представлены в табл. 3.



**Рис. 1.** Тактика гейтирования Th1- и Th2-лимфоцитов методом проточной цитометрии при помощи оценки продукции внутриклеточных цитокинов (ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4)



**Рис. 2.** Идентификация Treg с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{neg}$  методом проточной цитометрии

**Таблица 2.** Референсные интервалы для исследованных субпопуляций В- и Т-лимфоцитов

Показатель	Абсолютное значение	Относительное значение, %
Лейкоциты, · 10 <sup>9</sup> /л	4–9	–
Лимфоциты, · 10 <sup>9</sup> /л	0,81–3,8	20–40
CD19 <sup>+</sup> (В-лимфоциты общие), · 10 <sup>9</sup> /л	0,1–0,5	5–19
CD3 <sup>+</sup> (Т-лимфоциты общие), · 10 <sup>9</sup> /л	0,8–2,2	55–85
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (Т-хелперы), · 10 <sup>9</sup> /л	0,6–1,6	31–52
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (цитотоксические Т-лимфоциты), · 10 <sup>9</sup> /л	0,19–0,65	12–32
Иммунорегуляторный индекс (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )	1,5–2,6	–
Соотношение Th1/Th2	0,95–1,05	–
Treg (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>bright</sup> CD127 <sup>neg</sup> CD45 <sup>+</sup> ), · 10 <sup>9</sup> /л	0,009–0,078	0,6–1,1

У пациентов обеих групп на начальной стадии течения септического процесса отмечен повышенный уровень лейкоцитов в отличие от группы сравнения ( $p < 0,05$ ). Количественные показатели лимфоцитов в абсолютных и относительных значениях не претерпевали каких-либо существенных отличий между группами по степени выраженности органной дисфункции (шкала SOFA) и здоровых индивидуумов. Данные результаты согласуются с данными других исследований и указывают на минимальные изменения со стороны адаптивного иммунитета на первоначальной стадии септического процесса. На 21–28-е сутки у пациентов отмечена лимфопения, наиболее выраженная в группе с более тяжелым течением сепсиса ( $p < 0,05$ ) относительно как группы сравнения, так и пациентов обеих

групп на начальном этапе наблюдения. Полученные данные совпадают с результатами недавнего крупного ретроспективного исследования, которые говорят о том, что снижение уровня лимфоцитов может служить биомаркером прогноза иммуносупрессии и неблагоприятного исхода при сепсисе [17].

Уровень CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов не претерпевал существенных изменений на начальном этапе в обеих исследуемых группах в первые дни болезни. В дальнейшем (21–28-е сутки) мы наблюдали статистически значимое снижение абсолютного количества данного типа клеток только в группе с более выраженной тяжестью органной дисфункции относительно группы сравнения:  $0,27 \pm 0,17 \cdot 10^9/\text{л}$  против  $0,41 \pm 0,16 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 3.** Средние значения показателей субпопуляций лимфоцитов у пациентов в зависимости от выраженности органной дисфункции в динамике ( $M \pm \sigma$ )

Показатель, единицы измерения	Группа				сравнения
	1-я (SOFA < 6 баллов) $n = 24$	2-я (SOFA > 6 баллов) $n = 19$	1-я (SOFA < 6 баллов) $n = 24$	2-я (SOFA > 6 баллов) $n = 19$	
Сроки исследования	48 ч от начала заболевания		На 21–28-е сутки заболевания		Однократно
Лейкоциты, · 10 <sup>9</sup> /л	14,6 ± 4,8 <sup>#</sup>	16,6 ± 5,8 <sup>#</sup>	11,0 ± 3,8 <sup>#*</sup>	5,7 ± 3,9 <sup>*^</sup>	7,1 ± 1,5
Лимфоциты, · 10 <sup>9</sup> /л	2,7 ± 0,51	2,3 ± 0,64	1,3 ± 0,38 <sup>#*</sup>	1,1 ± 0,37 <sup>#*</sup>	2,9 ± 0,9
Лимфоциты, (%)	28,4 ± 4,9	29,3 ± 5,7	18,2 ± 6,9 <sup>#*</sup>	14,2 ± 9,3 <sup>#*</sup>	30,4 ± 10,2
CD19 <sup>+</sup> (В-лимфоциты общие), · 10 <sup>9</sup> /л	0,38 ± 0,15	0,29 ± 0,13	0,31 ± 0,12	0,27 ± 0,17 <sup>#</sup>	0,41 ± 0,16
CD3 <sup>+</sup> (Т-лимфоциты общие), (%)	66,2 ± 13,4	65,3 ± 11,3	76,5 ± 17,6	72,3 ± 13,4	61,3 ± 13,4
CD3 <sup>+</sup> (Т-лимфоциты общие), · 10 <sup>9</sup> /л	1,5 ± 0,44	1,7 ± 0,39	1,7 ± 0,39	1,3 ± 0,27	1,2 ± 0,33
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (Т-хелперы), (%)	45,7 ± 11,3	39,4 ± 15,3	38,4 ± 14,8	34,4 ± 12,9	44,2 ± 16,4
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (Т-хелперы), · 10 <sup>9</sup> /л	1,1 ± 0,26	1,1 ± 0,39	0,9 ± 0,29	1,0 ± 0,39	1,2 ± 0,34
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (цитотоксические Т-лимфоциты), %	18,7 ± 5,33	12,5 ± 5,3	21,9 ± 9,5	18,7 ± 7,53	24,4 ± 11,4
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (цитотоксические Т-лимфоциты), · 10 <sup>9</sup> /л	0,44 ± 0,16	0,58 ± 0,21	0,32 ± 0,11	0,29 ± 0,13	0,45 ± 0,19
CD19 <sup>+</sup> (В-лимфоциты общие), %	16,2 ± 5,9	14,3 ± 5,8	11,7 ± 4,7	9,6 ± 3,2 <sup>#</sup>	14,9 ± 4,9
Иммунорегуляторный индекс (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> / CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )	1,6 ± 0,36	1,5 ± 0,66	1,4 ± 0,76	1,7 ± 0,56	1,9 ± 0,46
Соотношение Th1/Th2	0,9 ± 0,11	0,86 ± 0,2	0,67 ± 0,19 <sup>*^</sup>	0,64 ± 0,14 <sup>*^</sup>	1,0 ± 0,21
Treg (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>bright</sup> CD127 <sup>neg</sup> CD45 <sup>+</sup> ), (%)	0,94 ± 0,18	0,92 ± 0,26	1,27 ± 0,34 <sup>*^#</sup>	4,61 ± 1,1 <sup>*^#2</sup>	0,85 ± 0,12

**Примечание.** Статистическая достоверность различий между группами в разные сроки заболевания: \* –  $p < 0,05$ ; между группами на этапе заболевания: ^ –  $p < 0,05$ ; между группами пациентов и группой сравнения: # –  $p < 0,05$ ; #2 –  $p < 0,01$ .

Таблица 4. Взаимосвязь уровня содержания Treg с исходом заболевания на 21–28-е сутки

Исход болезни	Частота встречаемости				Статистические показатели сопряженности признаков по критерию $\chi^2$
	Количество пациентов с уровнем Treg на 21–28-е сутки заболевания				
	> 2 %, <i>n</i> = 14		< 2 %, <i>n</i> = 17		
	абс.	%	абс.	%	
Умерли ( <i>n</i> = 11)	8	72,7	3	27,3	$\chi^2 = 8,543$ <i>p</i> = 0,004
Выжили ( <i>n</i> = 32)	6	18,8	26	81,2	

Нами не выявлено существенных различий основных популяций Т-лимфоцитов (CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>), их относительных и абсолютных значений, соотношения (иммунорегуляторный индекс) в исследуемых группах, в дебюте заболевания, как относительно группы сравнения, так и в зависимости от выраженности органной дисфункции. Подобные результаты были отмечены и на более поздних (21–28-е сутки) сроках течения сепсиса. Далее был изучен субпопуляционный состав Т-лимфоцитов. В группах с различной степенью органной дисфункции на начальной стадии заболевания (первые 48 ч), не было зафиксировано дисбаланса соотношения Th1- и Th2-клеток, а количество Treg, хотя и было повышено, но различия не достигали значимых величин относительно группы сравнения. Полученные результаты указывают на отсутствие существенных изменений как со стороны основных популяций CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, так и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в дебюте заболевания. На более поздних сроках (21–28-е сутки) у пациентов обеих групп (в зависимости от выраженности органной дисфункции) выявлено преобладание Th2-субпопуляции Т-лимфоцитов над Th1-субпопуляцией (*p* < 0,05). Кроме того, на более поздних сроках течения септического процесса выявлено повышенное содержание Treg в обеих группах относительно группы сравнения, причем данный показатель был наиболее высок в группе с более выраженной органной дисфункцией (SOFA > 6 баллов) (*p* < 0,01). Между группами на данной стадии заболевания также были выявлены достоверные различия содержания Treg. Так, в группе с более выраженной органной дисфункцией (SOFA > 6 баллов) средний уровень содержания Treg был выше и составил 4,61 ± 1,1 % против 1,27 ± 0,34 % в группе с менее выраженной органной дисфункцией (SOFA < 6 баллов) (*p* < 0,05).

В связи с этим был проведен анализ сопряженности уровня содержания Treg на 21–28-е сутки с исходом заболевания (использован критерий  $\chi^2$ ). Результаты анализа представлены в табл. 4. При исследовании сопряженности содержания Treg на данном этапе заболевания в группах пациентов с различным исходом зафиксировано наличие случаев как высокого (> 2 %) так и низкого уровня данной субпопуляции лимфоцитов (< 2 %). У выживших пациентов выявлено 6 случаев высокого уровня Treg (18,8 %) и 26 случаев – низкого уровня Treg (81,2 %). У пациентов с летальным исходом в 8 случаях установлен высокий уровень (72,7 %) и в 3 (27,3 %) – низкий уровень данных клеток. Проведенный анализ подтвердил, что показатель содержания

Treg более 2 % на 21–28-е сутки сопряжен (*p* = 0,004) с особенностями течения заболевания, и может являться прогностическим критерием неблагоприятного исхода при сепсисе.

### Обсуждение

При генерализованном воспалении в первую очередь наблюдаются выраженные изменения со стороны врожденного иммунитета. Гранулоциты, покидая костный мозг, следуют по градиентам хемокинов к месту повреждения, что и приводит к лейкоцитозу, особенно на начальных стадиях заболевания. Это показано в том числе и в нашем исследовании. Данное состояние приводит к миграции из костного мозга эффекторных клеток врожденного иммунитета и незрелых миелоидных клеток, что получило название «экстренный гранулопоз/миелопоэз» [18]. В ходе иммунного ответа наивные CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоциты дифференцируются в различные субпопуляции клеток, отличительной особенностью которых является продукция тех или иных цитокинов. Полученные нами результаты подтверждают патогенетическую и диагностическую значимость соотношения Th1- и Th2-клеток при сепсисе, что ранее было показано при многих иммуноопосредованных заболеваниях [19]. Потенциальным механизмом иммуносупрессии при сепсисе многие авторы отмечают сдвиг от Th1 к Th2. Дисбаланс Th1/Th2 отражает меняющийся вектор иммунного ответа, свидетельствует об увеличении продукции противовоспалительных цитокинов, изменении в ходе заболевания фенотипа Т-клеток в сторону Th2 [20]. Повышение Treg, выявленное в ходе исследования на поздних стадиях заболевания, увеличивает супрессорную активность и вызывает в итоге анергию Т-клеток и переход в стадию «иммунного паралича» [21]. Понимание причин и своевременная диагностика данных изменений позволит выбрать правильное направление терапии в каждом конкретном случае, персонализировать и улучшить результаты лечения сепсиса.

Считаем важным подчеркнуть, что во многом супрессию иммунного ответа на поздних стадиях сепсиса связывают именно с Treg [22]. Treg (regulatory T cells – CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которая характеризуется конститутивной экспрессией CD25 (рецептор ИЛ-2, IL-2R), наличием внутриклеточного транскрипционного фактора Foxp3, регулирующего транскрипцию генов, ответственных за дифференцировку Т-клеток, продукцию антиген-презентирующими клетками цито-

кинов и других факторов, участвующих в реализации иммунного ответа. Данный тип клеток играет ключевую роль не только при онкологических, аутоиммунных заболеваниях и аллергопатологии, но и при инфекционных болезнях. Они регулируют Т-клеточный гомеостаз, предотвращают развитие аутоиммунных заболеваний, аллергии, гиперчувствительности, реакции «трансплантат против хозяина» [23]. С другой стороны, Treg снижают противоопухолевый иммунитет и иммунитет к инфекциям. Основная их роль – контролировать силу и продолжительность иммунных реакций. Исследования показывают, что увеличение Treg при сепсисе коррелирует со снижением пролиферации и функциональной активности эффекторных Т-клеток [24]. ЛПС-активированные Treg могут влиять на функцию и выживаемость нейтрофилов, индуцировать апоптоз этих клеток, снижая продукцию ими цитокинов [25]. На экспериментальной модели сепсиса было показано, что у мышей дикого типа C57Bl/10ScNJ с дефицитом экспрессии сигнального рецептора (TLR4<sup>-/-</sup>) была снижена активность Treg и отмечена более высокая продукция провоспалительных цитокинов [26]. Кроме того, молекулы патогенов при септическом процессе могут взаимодействовать с дендритными клетками через активирующие и ингибирующие рецепторы, изменяя проведение внутриклеточных сигналов и нарушая тем самым созревание дендритных клеток, в результате чего они становятся толерогенными и вызывают дифференцировку Treg из конвенциональных CD4<sup>+</sup>-Т-клеток. Микробные патогены также способны непосредственно взаимодействовать с Treg через рецепторы врожденного иммунитета и усиливать экспрессию транскрипционного фактора Foxp3, повышая их супрессивную активность [27].

Treg-клетки способны прямо или косвенно подавлять активность иммуноцитов за счет различных факторов и механизмов: продукция противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-35 и ТФРβ), а также перфорина и гранзима, повреждающих клеточную мембрану с развитием апоптоза; высокая экспрессия CD25; подавление дендритных клеток через ингибиторные корецепторы (CTLA-4, LAG-3 и др.); метаболические нарушения (экспрессия CD39 на Treg опосредует превращение аденозинтрифосфат в аденозин и аденозинмонофосфат, и уменьшает пролиферацию Т-эффекторов); поляризация дифференцировки моноцитов в сторону M2-макрофагов и предотвращение их дифференцировки в провоспалительные M1-макрофаги; индукция супрессивного фенотипа нейтрофилов и снижение секреции цитокинов лимфоцитами врожденного иммунитета (ILC2, innate lymphoid cells 2) [28]. Таким образом, Treg участвуют в нарушениях как врожденных, так и адаптивных иммунных реакций, наблюдаемых при патологии, в том числе у пациентов с сепсисом [29]. Недавно был описан синдром хронического воспаления, иммуносупрессии и катаболизма (persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome, PICS), который возникает при данной патологии [30]. Ценность

определения данного синдрома заключается в том, что предполагается наличие механизма, который может объяснить стойкое воспаление и подавление адаптивного иммунитета при септических состояниях. В настоящее время принято считать, что хронический дисрегулируемый иммунный ответ связан с супрессорной активностью клеток с фенотипом MDSC (myeloid derived suppressor cells). Во время экстренного миелопоэза на фоне «цитокинового шторма» дифференцировка незрелых миелоидных клеток в зрелые блокируется, что приводит к образованию гетерогенной популяции незрелых клеток с иммунодепрессивными и воспалительными свойствами, называемыми миелоидными супрессорными клетками – CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> (MDSC). MDSC-клетки экспрессируют аргиназу (ARG1) и регулируют зависящие от аргинина биологические процессы. В условиях недостатка аргинина нарушается внутриклеточная сигнализация, экспрессия Т-клеточного рецептора, формирование клеток памяти и Т-клетки подвергаются апоптозу [31]. Но Treg являются клетками, более устойчивыми к сепсис-индуцированному апоптозу по сравнению с другими типами Т-клеток, и это способствует их «выживанию» в условиях септического процесса [32, 33]. Кроме того, прямой контакт моноцитарных MDSC через CD40-рецепторы приводит к индукции Treg [34]. В связи с этим роль Treg, как основного регулятора реакций адаптивного иммунитета, является одной из ключевых при сепсисе, а их количественная оценка может отражать меняющийся клинический фенотип и быть предиктором неблагоприятного исхода. Все это требует дальнейшего уточнения и диктует необходимость продолжения исследований в данной области.

## Заключение

Полученные данные свидетельствуют о минимальных изменениях со стороны клеток адаптивного иммунитета на начальных стадиях сепсиса и, напротив, указывают на значительные изменения субпопуляций Т-лимфоцитов на более поздних стадиях заболевания. Определение фенотипов иммуноцитов в ходе септического процесса важно в динамике, так как это способно изменить тактику терапии, которая может быть противовоспалительной на стадии гипервоспаления либо иммуностимулирующей на стадии «иммунного паралича». Одним из маркеров, позволяющих определять наступление иммуносупрессивной фазы сепсиса и способных служить предиктором неблагоприятного исхода, может стать количественное определение Treg.

## Вклад авторов

Координация исследования, анализ данных, редактирование текста – Маркелова Е.В.; сбор клинического материала, статистическая обработка, анализ данных, написание статьи – Лазанович В.А.; сбор и обработка материала – Шуматов В.Б.; проведение лабораторных исследований, статистическая обработка данных – Малков В.А.; курация и координация исследования, участие в анализе данных – Евсегнеева И.В.

## ■ Литература

- Singer M., Deutschman S., Seymour C.W. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315 (8): 801–10.
- Сепсис. Классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение : практическое руководство. В.С. Савельев, Б.Р. Гельфанд (ред.). Москва : Медицинское информационное агентство, 2010.
- Angus D.C., Van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369 (9): 840–51.
- Zahorec R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts-rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl. Lek. Listy*. 2001; 102 (1): 5–14.
- Andaluz-Ojeda D., Iglesias V., Bobillo F. et al. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit. Care*. 2011; 15 (5): R243.
- Rimmelé T., Payen D., Cantaluppi V. Immune cell phenotype and function in sepsis. *Shock*. 2016; 45 (3): 282–91.
- Donadello K., Taccone F.S. Should we measure immunoglobulin levels in septic patients? *Int. Immunopharmacol.* 2012; 12 (3): 540–1.
- Лазанович В.А., Степанюк В.Н., Смирнов Г.А. Маркелова Е.В. Биомаркеры воспаления в прогнозе исхода абдоминального сепсиса. *Фундаментальные исследования*. 2012; 4: 311–5.
- Cabrera-Perez J., Condotta S.A., Badovinac V.P. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2014; 96 (5): 767–77.
- Gouel-Cheron A., Venet F., Allaouchiche B., Monneret G. CD4+ T-lymphocyte alterations in trauma patients. *Crit. Care*. 2012; 16: 432.
- Inoue S. Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. *Crit. Care Med.* 2013; 41: 810–9.
- Xing-hai Chen., Yong-jie Yin., Jing-xiao Zhang. Sepsis and immune response. *World J. Emerg. Med.* 2011; 2: 88–92.
- Chang K.C., Burnham C.A., Compton S.M. et al. Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care*. 2013; 3: R85.
- Gupta D.L., Bhoi S., Mohan T. et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with post traumatic sepsis. *Cytokine*. 2016; 88: 214–21.
- Курганова Е.В., Тихонова М.А., Стрельцова Е.И., Останин А.А., Черных Е.Р., Козлов В.А. Регуляторные Т клетки с супрессорной активностью при хирургическом сепсисе. *Медицинская иммунология*. 2006; 1: 51–60.
- Савельев В.С., Гельфанд Б.Р. Сепсис: классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение : практическое руководство. Москва : Медицинское информационное агентство, 2013.
- Drewry A.M., Samra N., Skrupky L.P. et al. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock*. 2014; 42 (5): 383–91.
- Manz M.G., Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14 (5): 302–14.
- Хайдук С.В., Зурочка А.В. Возможности проточной цитофлуориметрии в диагностике инфекционных заболеваний. *Инфекция и иммунитет* 2011; 1: 59–66.
- Boomer J.S. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011; 306: 2594–605.
- Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курганова Е.В., Стрельцова Е.И., Останин А.А., Козлов В.А. Феномен Т клеточной анергии при хирургическом сепсисе. *Медицинская иммунология*. 2003; 5: 529–38.
- Venet F., Chung C.S., Kherouf H. et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med.* 2009; 35 (4): 678–86.
- Козлов И.Б., Ватазин А.В., Кильдюшевский А.В., Зулкарнаев А.Б., Федулкина В.А., Фаенко А.П., Яздовский В.В., Гудима Г.О., Кофиади И.А. Анализ экспрессии генов иммунной системы, ответственных за активацию и ингибирование Т-клеточного иммунного ответа, у реципиентов почечного трансплантата после ЭКФ. *Иммунология*. 2020; 41 (1): 20–30. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-1-20-30>
- Liu Q., An L., Qi Z. Increased expression of programmed cell death-1 in regulatory T cells of patients with severe sepsis and septic shock: an observational clinical study. *Scand. J. Immunol.* 2017; 86 (5): 408–17.
- Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 862–74.
- Cao C., Chai Y., Shou S. et al. Toll-like receptor 4 deficiency increases resistance in sepsis-induced immune dysfunction. *Int. Immunopharmacol.* 2018; 54: 169–76.
- Гариб Ф.Ю., Ризопулу А.П. Стратегия иммунной эвазии патогенов: супрессия иммунного ответа путем активирования Т-регуляторных клеток хозяина. *Иммунология*. 2016; 37 (1): 35–46.
- Romano M., Fanelli G., Albany C.J., Giganti G. Past, present and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Front. Immunol.* 2019; 10: 43.
- Li J., Li M., Su L., Wang H. et al. Alterations of T helper lymphocyte subpopulations in sepsis, severe sepsis, and septic shock: a prospective observational study. *Inflammation*. 2015; 38: 995–1002.
- Gentile L.F., Cuenca A.G., Efron P.A. et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J. Trauma Acute Care Surg.* 2012; 72(6): 1491–501.
- Russell B., Hawkins I., Steven L. et al. Chronic critical illness and the persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome. *Front. Immunol.* 2018; 2: 1511.
- Venet F. et al. Increased percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> lymphocytes. *Crit. Care Med.* 2004; 32: 2329–31.
- Суровой Ю.А., Царенко С.В. Сепсис-индуцированная иммуносупрессия. *Иммунология*. 2019; 40 (3): 93–101. DOI: <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-13010>
- Pan P.Y., Ma G., Weber K.J. et al. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* 2010; 70 (1): 99–108.
- Donadello K., Taccone F.S. Should we measure immunoglobulin levels in septic patients? *Int. Immunopharmacol.* 2012; 12 (3): 540–1.
- Lazanovich V.A., Stepanyuk V.N., Smirnov G.A. Markelova E.V. Inflammation biomarkers in predicting the outcome of abdominal sepsis. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2012; 4: 311–5. (in Russian)
- Cabrera-Perez J., Condotta S.A., Badovinac V.P. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2014; 96 (5): 767–77.
- Gouel-Cheron A., Venet F., Allaouchiche B., Monneret G. CD4+ T-lymphocyte alterations in trauma patients. *Crit. Care*. 2012; 16: 432.
- Inoue S. Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. *Crit. Care Med.* 2013; 41: 810–9.
- Xing-hai Chen., Yong-jie Yin., Jing-xiao Zhang. Sepsis and immune response. *World J. Emerg. Med.* 2011; 2: 88–92.

## ■ References

- Singer M., Deutschman S., Seymour C.W., et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315 (8): 801–10.
- Sepsis. Classification, clinical diagnostic concept and treatment. Practical guide. In: V.S. Savel'ev, B.R. Gel'fand (eds). Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2010. (in Russian)
- Angus D.C., Van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369 (9): 840–51.
- Zahorec R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts-rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl. Lek. Listy*. 2001; 102 (1): 5–14.
- Andaluz-Ojeda D., Iglesias V., Bobillo F., et al. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit. Care*. 2011; 15 (5): R243.
- Rimmelé T., Payen D., Cantaluppi V. Immune cell phenotype and function in sepsis. *Shock*. 2016; 45 (3): 282–91.
- Donadello K., Taccone F.S. Should we measure immunoglobulin levels in septic patients? *Int. Immunopharmacol.* 2012; 12 (3): 540–1.
- Lazanovich V.A., Stepanyuk V.N., Smirnov G.A. Markelova E.V. Inflammation biomarkers in predicting the outcome of abdominal sepsis. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2012; 4: 311–5. (in Russian)
- Cabrera-Perez J., Condotta S.A., Badovinac V.P. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *J. Leukoc. Biol.* 2014; 96 (5): 767–77.
- Gouel-Cheron A., Venet F., Allaouchiche B., Monneret G. CD4+ T-lymphocyte alterations in trauma patients. *Crit. Care*. 2012; 16: 432.
- Inoue S. Reduction of immunocompetent T cells followed by prolonged lymphopenia in severe sepsis in the elderly. *Crit. Care Med.* 2013; 41: 810–9.
- Xing-hai Chen., Yong-jie Yin., Jing-xiao Zhang. Sepsis and immune response. *World J. Emerg. Med.* 2011; 2: 88–92.

13. Chang K.C., Burnham C.A., Compton S.M., et al. Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care*. 2013; 3: R85.
14. Gupta D.L., Bhoi S., Mohan T., et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with post traumatic sepsis. *Cytokine*. 2016; 88: 214–21.
15. Kurganova E.V., Tikhonova M.A., Strel'tsova E.I., Ostaniin A.A., Chernykh E.R., Kozlov V.A. Regulatory T-cells with suppressive activity in surgical sepsis. *Meditinskaya immunologiya*. 2006; 1: 51–60. (in Russian)
16. Savel'ev V.S., Gel'fand B.R. Sepsis: classification, clinical diagnostic concept and treatment: Practical guide. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2013. (in Russian)
17. Drewry A.M., Samra N., Skrupky L.P., et al. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock*. 2014; 42 (5): 383–91.
18. Manz M.G., Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* 2014; 14 (5): 302–14.
19. Khaydukov S.V., Zurochka A.V. Possibilities of flow cytometry in the diagnosis of infectious diseases. *Infektsiya i immunitet*. 2011; 1: 59–66. (in Russian)
20. Boomer J.S. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011; 306: 2594–605.
21. Chernykh E.R., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kurganova E.V., Strel'tsova E.I., Ostaniin A.A., Kozlov V.A. T cell anergy in surgical sepsis. *Meditinskaya immunologiya*. 2003; 5: 529–38. (in Russian)
22. Venet F., Chung C.S., Kherouf H., et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2009; 35 (4): 678–86.
23. Kozlov I.B., Vatazin A.V., Kil'dushevskiy A.V., Zul'karnayev A.B., Fedulkina V.A., Faenko A.P., Yazdovskiy V.V., Gudima G.O., Kofiadi I.A. Analysis of expression of immune system genes that are responsible for activation and inhibition of T-cell immune response in renal transplant recipients after extracorporeal photochemotherapy. *Immunologiya*. 2020; 41 (1): 20–30. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-1-20-30> (in Russian)
24. Liu Q., An L., Qi Z. Increased expression of programmed cell death-1 in regulatory T cells of patients with severe sepsis and septic shock: an observational clinical study. *Scand. J. Immunol.* 2017; 86 (5): 408–17.
25. Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 862–74.
26. Cao C., Chai Y., Shou S., et al. Toll-like receptor 4 deficiency increases resistance in sepsis-induced immune dysfunction. *Int. Immunopharmacol.* 2018; 54: 169–76.
27. Garib F.Y., Rizopulu A.P. Strategy of immune evasion of pathogens: the suppression of immune response by host's T-regulatory cells activation. *Immunologiya*. 2016; 37 (1): 35–46. (in Russian)
28. Romano M., Fanelli G., Albany C.J., Giganti G. Past, present and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Front. Immunol.* 2019; 10: 43.
29. Li J., Li M., Su L., Wang H., et al. Alterations of T helper lymphocyte subpopulations in sepsis, severe sepsis, and septic shock: a prospective observational study. *Inflammation*. 2015; 38: 995–1002.
30. Gentile L.F., Cuenca A.G., Efron P.A., et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J. Trauma Acute Care Surg*. 2012; 72(6): 1491–501.
31. Russell B., Hawkins L., Steven L., et al. Chronic critical illness and the persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome. *Front. Immunol.* 2018; 2: 1511.
32. Venet F., et al. Increased percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> lymphocytes. *Crit. Care Med*. 2004; 32: 2329–31.
33. Surovoy Yu.A., Tsarenko S.V. Sepsis-induced immunosuppression. *Immunologiya*. 2019; 40 (3): 93–101. DOI: <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-13010> (in Russian)
34. Pan P.Y., Ma G., Weber K.J., et al. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res*. 2010; 70 (1): 99–108.

## Сведения об авторах

**Маркелова Елена Владимировна** – д.м.н., проф., зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Российская Федерация; e-mail: [markev2010@mail.ru](mailto:markev2010@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0001-5846-851X>

**Лазанович Владимир Анатольевич** – к.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Российская Федерация; <http://orcid.org/0000-0003-0354-4890>

**Шуматов Валентин Борисович** – д.м.н., проф., зав. кафедрой реанимации, анестезиологии, интенсивной терапии и скорой медицинской помощи ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Российская Федерация; <http://orcid.org/0000-0002-9645-3471>

**Малков Владимир Александрович** – ассистент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Российская Федерация; <http://orcid.org/0000-0002-7186-299X>

**Евсегнеева Ирина Валентиновна** – д.м.н., проф., кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация; <http://orcid.org/0000-0002-6624-1363>

## Authors' information

**Elena V. Markeleva** – MD, Prof., Head of Normal and Pathological Physiology Chair of PSMU MOH of Russia, Vladivostok, Russian Federation; e-mail: [markev2010@mail.ru](mailto:markev2010@mail.ru), <http://orcid.org/0000-0001-5846-851X>

**Vladimir A. Lazanovich** – PhD, Associate prof. of Normal and Pathological Physiology Chair of PSMU MOH of Russia, Vladivostok, Russian Federation; <http://orcid.org/0000-0003-0354-4890>

**Valentin B. Shumatov** – MD, Prof., Head of Reanimatology, Anesthesiology and Urgent Medical Care Chair of PSMU MOH of Russia, Vladivostok, Russian Federation; <http://orcid.org/0000-0002-9645-3471>

**Vladimir A. Malkov** – Assistant of Normal and Pathological Physiology Chair of PSMU MOH of Russia, Vladivostok, Russian Federation; <http://orcid.org/0000-0002-7186-299X>

**Irina V. Evsegneeva** – MD, Prof. of the Clinical Immunology and Allergology Chair of I.M. Sechenov FMSMU of the MOH of Russia (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; <http://orcid.org/0000-0002-6624-1363>

© Смирнова О.В., Елманова Н.Г., 2020

Смирнова О.В., Елманова Н.Г.

## Взаимообусловленность влияний I и II типов воспаления на процессы липопероксидации и антиоксидантной защиты у пациентов с механической желтухой желчнокаменного генеза в послеоперационном периоде

Обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального исследовательского центра Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 660022, г. Красноярск, Российская Федерация

### Резюме

**Введение.** Патогенез механической желтухи (МЖ) сложен, характеризуется развитием местной и системной воспалительных реакций, эндотоксикоза и сопутствующих органических и гистодеструктивных изменений. Воспалительная активация иммунных клеток стимулирует транскрипцию генов, ответственных за окислительный стресс; активные формы кислорода разрушают мембраны иммунокомпетентных клеток, пролонгируя локальное воспаление.

**Цель** исследования – оценка вклада иммуновоспалительных изменений в процессы липопероксидации и функционирование антиоксидантной защиты в формировании послеоперационных осложнений у больных МЖ желчнокаменного генеза.

**Материал и методы.** Обследованы 70 больных с клинической картиной МЖ. Изучена концентрация 6 цитокинов: I (ИЛ-2, ИЛ-8, ФНО $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ ) и II (ИЛ-4, ИЛ-10) типов воспаления методом иммуноферментного анализа. Содержание малонового диальдегида и активность антиоксидантных ферментов изучали в эритроцитах спектрофотометрическими методами. Статистические данные анализировали с помощью прикладных программ Statistica 10.

**Результаты.** Продемонстрирована преимущественная роль в патогенезе МЖ с осложненным послеоперационным периодом воспалительного процесса I типа, а в патогенезе МЖ с неосложненным послеоперационным периодом – воспаления I и II типов. Обнаружено значительное повышение содержания малонового диальдегида в эритроцитах у больных обеих сравниваемых групп, что подтверждает усиление процессов липопероксидации в раннем послеоперационном периоде. Вместе с тем выявленные в нашей работе результаты, указывающие на усиление активности антиоксидантной защиты, увеличение активности ферментов супероксиддисмутазы и каталазы, которые способствуют снижению проявлений окислительного стресса и свидетельствуют скорее о протекторной роли воспаления II типа у больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом.

**Заключение.** У больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом выявляется усиление процессов липопероксидации, снижение активности ферментов антиоксидантной защиты и преимущественный I тип воспаления. У больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом проявления окислительного стресса компенсируются повышением активности энзимов антиоксидантной защиты, выявляются I и II типы воспаления.

**Ключевые слова:** механическая желтуха; окислительный стресс; цитокины; антиоксидантные ферменты

Статья поступила 06.06.2020. Принята в печать 16.07.2020.

**Для цитирования:** Смирнова О.В., Елманова Н.Г. Влияние I и II типов воспаления на процессы липопероксидации и антиоксидантной защиты у пациентов с механической желтухой желчнокаменного генеза в послеоперационном периоде. Иммунология. 2020; 41(4): 354–362. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-354-362>

**Финансирование.** Работа проводилась за счет средств государственного задания НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН № 007-01216ПР.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции  
Смирнова Ольга Валентиновна –  
доктор медицинских наук, доцент,  
заведующая лабораторией  
клинической патофизиологии  
НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН,  
Минобрнауки России  
Красноярск, Российская Федерация  
E-mail: [ovsmirnova71@mail.ru](mailto:ovsmirnova71@mail.ru)  
<https://orcid.org/0000-0003-3992-9207>

Smirnova O.V., Elmanova N.G.

## Interconditionality of the effects of types I and II of inflammation on the processes of lipid peroxidation and antioxidant protection in patients with obstructive jaundice of gallstone origin in the postoperative period

Research Institute of Medical Problems of the North, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 660022, Krasnoyarsk, Russian Federation

### Abstract

**Introduction.** The pathogenesis of obstructive jaundice is complex, characterized by the development of local and systemic inflammatory reactions, endotoxemia and associated organ and histodestructive changes. Inflammatory activation of immune cells stimulates the transcription of genes responsible for oxidative stress, reactive oxygen species destroy the membranes of immunocompetent cells, prolonging local inflammation.

**Aim** of the study was to assess the contribution of immuno-inflammatory changes to lipid peroxidation processes and the functioning of antioxidant defense in the formation of postoperative complications in patients with obstructive jaundice of gallstone origin.

**Material and methods.** 70 patients with a clinical picture of obstructive jaundice were examined. The concentration of 6 cytokines was studied: type I inflammation (IL-2, IL-8, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ); type II (IL-4, IL-10) by enzyme immunoassay. The content of malondialdehyde and the activity of antioxidant enzymes were studied in red blood cells by spectrophotometric methods. Analysis of statistical data was carried out using the Statistica 10 application programs.

**Results.** The predominant role in the pathogenesis of obstructive jaundice with a complicated postoperative period of type I inflammatory process has been demonstrated, and in the pathogenesis of obstructive jaundice with an uncomplicated postoperative period of type I and type II inflammation. A significant increase in the content of malondialdehyde in red blood cells was found in patients of both compared groups, which confirms the strengthening of lipid peroxidation in the early postoperative period. At the same time, the results revealed in our work, indicating an increase in the activity of antioxidant defense, an increase in the activity of superoxide dismutase and catalase enzymes, which contribute to a decrease in the manifestations of oxidative stress and are more likely indicative of the protective role of type II inflammation in OJ patients with uncomplicated postoperative period.

**Conclusion.** In patients with OJ with a complicated postoperative period, an increase in the processes of lipid peroxidation, a decrease in the activity of antioxidant enzymes and a predominant type I inflammation are revealed. In patients with OJ with an uncomplicated postoperative period, the manifestations of oxidative stress are compensated by an increase in the activity of antioxidant enzymes, types I and II of inflammation are detected.

**Keywords:** obstructive jaundice; oxidative stress; cytokines; antioxidant enzymes

Received 06.06.2020. Accepted 16.07.2020.

**For citation:** Smirnova O.V., Elmanova N.G. Interconditionality of the effects of types I and II of inflammation on the processes of lipid peroxidation and antioxidant protection in patients with obstructive jaundice of gallstone origin in the postoperative period. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 354–62. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-354-362> (in Russian)

**Funding.** The work was carried out at the expense of the State task of the Research Institute of Medical Problems of the North No 007-01216PP.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

### Введение

Механическая желтуха (МЖ) остается одной из проблем неотложной медицины, а среди факторов риска развития МЖ доброкачественного генеза важная роль принадлежит холелитиазу [1]. Патогенез МЖ сложен, характеризуется развитием местной и системной вос-

палительных реакций, эндотоксикоза и сопутствующих органных и гистодеструктивных изменений [2]. В качестве вероятных патофизиологических причин развития осложнений в послеоперационном периоде МЖ называли операцию как сильнейшую травму организма, окислительный стресс [3, 4]. В последние годы все

### For correspondence

Olga V. Smirnova –  
MD, Assistant Professor,  
Head of the Laboratory  
of Clinical Pathophysiology,  
Scientific Research Institute  
of Medical Problems  
of the North, Ministry  
of Science and High Education  
of Russian Federation  
Krasnoyarsk, Russian Federation  
E-mail: [ovsmirnova71@mail.ru](mailto:ovsmirnova71@mail.ru)  
<https://orcid.org/0000-0003-3992-9207>

чаще в качестве основного механизма послеоперационных осложнений, включающего большинство вышеперечисленных факторов, рассматривают длительный воспалительный процесс в гепатобилиарной зоне [5]. Провоспалительные цитокины интерлейкин (ИЛ)-8 и фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ) выполняют ключевую роль в развитии воспаления при МЖ. ФНО $\alpha$  стимулирует фактор транскрипции NF- $\kappa$ B, активирующий ген ИЛ-8 в макрофагах и эпителиальных клетках. ИЛ-8 выполняет роль мощного хемоаттрактанта для нейтрофилов, ФНО $\alpha$  усиливает воспалительный процесс [2]. Воспалительная активация иммунных клеток стимулирует транскрипцию генов, ответственных за окислительный стресс, активные формы кислорода разрушают мембраны иммунокомпетентных клеток, пролонгируя локальное воспаление. Все это способствует развитию «порочного воспалительного круга» и появлению септических послеоперационных осложнений [6, 7].

Однако конкретные клеточные иммунные механизмы, лежащие в основе воспалительной реакции у больных МЖ желчнокаменного генеза с неосложненным послеоперационным периодом, и их отличия от механизмов МЖ с осложненным послеоперационным периодом во многом остаются неизученными. Практически отсутствуют данные о том, какой из известных типов воспаления преобладает у больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом, как изменяется система перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты (ПОЛ-АОЗ) в зависимости от типа воспаления. Каждый тип воспаления характеризуется своим профилем клеток-индукторов и клеток-эффекторов с различным набором цитокинов и своими особенностями [8]. Без четкого понимания характеристик того или иного типа воспаления во взаимосвязи с особенностями ПОЛ-АОЗ-систем невозможно изучить все патофизиологические механизмы послеоперационных осложнений при МЖ желчнокаменного генеза.

**Цель** нашей работы – оценка вклада иммуновоспалительных изменений в процессы липопероксидации и функционирования антиоксидантной защиты в формировании послеоперационных осложнений у больных МЖ желчнокаменного генеза.

## Материал и методы

**Характеристика обследованных групп и дизайн исследования.** Обследованы 70 больных 35–69 лет (средний возраст  $46,8 \pm 9$  лет) с клинической картиной МЖ, подтвержденной инструментальными (ультразвуковое исследование, рентгеновское обследование, магнитно-резонансная томография и т. д.) и лабораторными методами исследования (клинический и биохимический анализ крови, гемостаз и т. д.), находившихся на лечении в хирургических отделениях Красноярской межрайонной клинической больницы скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича г. Красноярск. У всех диагностированная МЖ сопровождалась гипербилирубинемией (от 97 до 367 мкмоль/л). Всем больным проведена чрескожная декомпрессия желчных протоков для купирования желтухи, восстановления гомеостатических показателей организма.

Больных разделили на две группы. В 1-ю группу ( $n = 54$ ) вошли пациенты с клинико-лабораторными маркерами МЖ с неосложненным послеоперационным периодом. Во 2-ю группу ( $n = 16$ ) включили пациентов с МЖ с осложненным послеоперационным периодом. Больные двух групп были сопоставимы по полу, возрасту, длительности МЖ.

Группу сравнения составили 125 практически здоровых добровольцев, отобранных при профилактических медицинских осмотрах в поликлиническом отделении НИИ МПС Красноярск. Все участники исследования подписывали форму информированного согласия о добровольном участии в исследовании. При исследовании соблюдались все принципы Хельсинкской декларации ВМА.

**Методы изучения иммуновоспалительных изменений.** В образцах венозной крови, взятой на 7-е сутки после оперативного лечения, у больных определяли следующие концентрации цитокинов методом иммуноферментного анализа на иммуноферментном анализаторе «Thermo Scientific» (BioMerieux, Франция). Концентрацию цитокинов определяли в пг/мл. Изучали концентрацию 6 цитокинов: I (ИЛ-2, ИЛ-8, ФНО $\alpha$ , ИФН $\gamma$ ) и II (ИЛ-4, ИЛ-10) типа в сыворотке крови [9]. Использовались диагностические тест-системы ЗАО «Вектор-Бест».

Для характеристики процессов липопероксидации и антиоксидантной защиты использовали следующие биохимические маркеры: малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза, каталаза. Содержание малонового диальдегида и активность антиоксидантных ферментов изучали в эритроцитах крови спектрофотометрическими методами. Концентрацию малонового диальдегида (МДА) определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой сразу после эксфузии крови.

Для оценки антиоксидантной системы (АОС) определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) по методу Сироты Т.В. (1999) при ингибировании восстановления нитросинеготеразолия супероксидом, образованным при аутоокислении адреналина. Для оценки активности каталазы в плазме крови использовали метод Королюка М.А. [4].

Для дополнительной информации о преобладающем типе воспаления изучали содержание лейкоцитов и их субпопуляций в крови обеих групп исследования, лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ), отражающий оценку тяжести воспалительной интоксикации организма и степени разрушения тканей:

$$\text{ЛИИ} = (4 \times \text{Миелоциты} + 3 \times \text{Юные} + 2 \times \text{Палочкоядерные нейтрофилы} + 1 \times \text{Сегментоядерные нейтрофилы}) / (\text{плазматиты} + 1) / (\text{моноциты} + \text{лимфоциты}) / (\text{эозинофилы} + 1).$$

ЛИИ может использоваться как коэффициент прогноза при ведении послеоперационных больных для определения степени воспалительного процесса и риска развития инфекционных осложнений.

Статистические данные анализировали с помощью прикладных программ Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Обнаружено отсутствие нормального распределения признаков во всех выборках при использовании критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лилиефорса. В исследовании использовали методы непараметрической статистики. Все данные представлены в виде медианы и интерквартильного разброса медианы (*Me*) [ $Q_1$ – $Q_3$ ]. Статистически значимые различия считали при помощи *U*-критерия Манна–Уитни ( $p < 0,05$ ).

## Результаты

### Клиническая характеристика больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом в сравнении с больными МЖ с неосложненным течением

Анализ клинической картины послеоперационного периода у пациентов с МЖ с гнойными осложнениями выявил преобладание болевого синдрома. Изучение факторов риска развития осложнений в сравниваемых группах выявило статистически достоверное преобла-

дание фактора длительности анамнеза желчнокаменной болезни у пациентов с МЖ с осложненным послеоперационным периодом (10 лет и более). В то же время частота абдоминального ожирения и другие заболеланий гепатобилиарной зоны в группах статистически не различалась.

При детальном сравнительном анализе состояния печени и почек выявлены более высокие показатели цитолита в виде повышения уровня трансаминаз и холестерина, а также снижение синтетической функции печени у больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом.

### Сравнение типа иммуновоспалительных изменений у больных МЖ с осложненным и неосложненным послеоперационным периодом

Изменения концентрации цитокинов в сыворотке крови больных в сравнении с таковыми у здоровых лиц, представленные в табл. 1, включают значительное повышение концентрации провоспалительных цитокинов в обеих группах больных. Отмечено статистически достоверное увеличение уровней ИЛ-2, ФНО $\alpha$ , ИФН- $\gamma$  у больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом относительно не только группы сравнения, но и больных с неосложненным течением МЖ.

У больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом обнаруживается значительное уве-

**Таблица 1.** Содержание цитокинов в сыворотке крови у больных механической желтухой (МЖ) с неосложненным и осложненным послеоперационным периодом относительно группы сравнения, пг/мл, *Me* [ $Q_1$ – $Q_3$ ]

Показатель, пг/мл	Группа сравнения, n = 125 (1)		Больные МЖ с неосложненным послеоперационным периодом, n = 54 (2)		Больные МЖ с осложненным послеоперационным периодом, n = 16 (3)	
	<i>Me</i>	$C_{25}$ – $C_{75}$	<i>Me</i>	$C_{25}$ – $C_{75}$	<i>Me</i>	$C_{25}$ – $C_{75}$
ИЛ-2	1,1	0,5–3,05	5,5	3–7,3	12,26	7,96–15,21
			$p_{1-2} = 0,00 \cdot 10^{-10}$		$p_{1-3} = 0,001$ $p_{2-3} = 0,001$	
ФНО $\alpha$	0,54	0,38–0,88	8,1	3,1–51	60,33	8,15–146,19
			$p_{1-2} = 0,001$		$p_{1-3} = 0,001$ $p_{2-3} = 0,001$	
ИФН- $\gamma$	0,6	0,22–4,0	7,3	2,7–8,1	15,6	4,73–36,9
			$p_{1-2} = 0,001$		$p_{1-3} = 0,001$ $p_{2-3} = 0,001$	
ИЛ-8	1,6	0,1–2,1	61,7	53,88–99,3	80,21	70,04–129,1
			$p_{1-2} = 0,0006$		$p_{1-3} = 0,0006$	
ИЛ-4	2,15	0,6–4,8	38,4	4,3–377,6	0,017	0,015–2,9
			$p_{1-2} = 0,00005$		$p_{1-3} = 0,00001$ $p_{2-3} = 0,0012$	
ИЛ-10	14,8	8,65–26,85	2,1	1,05–2,75	0,9	0,85–2,75
			$p_{1-2} = 0,04$		$p_{1-3} = 0,001$ $p_{2-3} = 0,04$	

**Примечание.** Здесь и в табл. 3:  $p_{1-2}$  – достоверные различия между группой сравнения и группой больных механической желтухой (МЖ) с неосложненным послеоперационным периодом;  $p_{1-3}$  – достоверные различия между группой сравнения и группой больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом;  $p_{2-3}$  – достоверные различия между группой больных МЖ с неосложненным и группой больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом.

**Таблица 2.** Корреляционные связи лейкоцитарного индекса интоксикации с концентрацией цитокинов крови у больных механической желтухой с неосложненным и осложненным послеоперационным периодом

Показатель цитокинов	МЖ с неосложненным послеоперационным периодом ( $r = 0,37; p = 0,03$ )	МЖ с осложненным послеоперационным периодом ( $r = 0,42; p = 0,04$ )
ИЛ-2	$r = 0,54; p = 0,001$	$r = -0,27; p = 0,02$
ФНО $\alpha$	$r = 0,69; p = 0,02$	$r = -0,54; p = 0,001$
ИФН- $\gamma$	$r = 0,48; p = 0,03$	$r = -0,26; p = 0,02$
ИЛ-8	$r = -0,4; p = 0,045$	$r = 0,56; p = 0,045$
ИЛ-4	$r = 0,71; p = 0,001$	$r = -0,23; p = 0,01$
ИЛ-10	$r = 0,23; p = 0,03$	$r = -0,33; p = 0,045$

личение содержания цитокина ИЛ-4 относительно индивидуумов группы сравнения и пациентов с МЖ с осложненным послеоперационным периодом. Следует заметить, что в литературе имеются сообщения о преимущественном I типе иммуновоспалительных изменений при МЖ [10]. Результаты нашего исследования показывают, что преимущественный тип воспалительных реакций при МЖ зависит от развития осложнений в послеоперационном периоде. Так, у пациентов с МЖ при неосложненном течении послеоперационного периода выявляется сочетанный I и II типы иммуновоспалительных изменений, а при осложненном течении сохраняется I тип воспалительных реакций.

У больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом в крови выявлялся лейкоцитоз (более  $17 \cdot 10^9/\text{л}$ ) с увеличением абсолютных и относительных количеств нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов и их субпопуляций относительно больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом. С целью получения дополнительной информации о преобладающем типе воспаления у сравниваемых групп больных мы проанализировали корреляционные связи между ЛИИ и отдельными концентрациями цитокинов в каждой группе больных (табл. 2).

Из табл. 2 понятно, что механизмы воспаления в сравниваемых группах различаются коренным образом. Почти все показатели, которые положительно коррелируют с величиной ЛИИ у больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом, у больных МЖ с осложненным течением обнаруживают отрицательную корреляцию, и наоборот. Судя по положительной корреляции с ЛИИ, полагаем, что у больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом главными эффекторами воспалительной реакции выступают мононуклеары: моноциты, цитотоксические Т-лимфоциты, что является характерным признаком сочетанного воспаления I и II типов [23–25]. Это согласуется с литературными данными о повышенной активности Th2-клеток у больных МЖ с благоприятным прогнозом послеоперационного периода [26, 27]. Отрицательная корреляция ЛИИ у больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом и уровня ИЛ-4 исключает наличие воспаления II типа.

Учитывая приведенные данные, мы провели спектрофотометрическое определение содержания малонового диальдегида (МДА) и активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ) в эритроцитах здоровых доноров и больных для оценки баланса перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты. Результаты, приведенные в табл. 3, свидетельствуют о том, что содержание МДА у всех больных повышено относительно здоровых доноров.

В то же время активности СОД и КАТ достоверно повышены у больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом по сравнению с оставшимися группами. МДА – химически активное соединение, имеющее две альдегидные группы. Он способен вступать в реакцию с белками, липидами, модифицируя белки, ферменты антиоксидантной системы, снижая их активность [33]. СОД и КАТ – tandemная бифункциональная антиоксидантная система, пероксид водорода из реакции, катализируемой СОД, эффективно далее устраняется каталазой [34, 35]. СОД устраняет первично активную форму кислорода – супероксиданион – радикал, запускающий каскад липопероксидации [36, 37]. Низкая активность СОД

**Таблица 3.** Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в эритроцитах у больных механической желтухой (МЖ) с неосложненным и осложненным послеоперационным периодом в сравнении с группой сравнения,  $Me [Q_1-Q_3]$

Показатель	Группа сравнения, $n = 125$ (1)		Больные МЖ с неосложненным послеоперационным периодом, $n = 54$ (2)		Больные МЖ с осложненным послеоперационным периодом, $n = 16$ (3)	
	$Me$	$C_{25}-C_{75}$	$Me$	$C_{25}-C_{75}$	$Me$	$C_{25}-C_{75}$
МДА, нмоль/1 г Hb	11,47	9,14–16,76	30,02	24,8–38,8	48,4	43,7–49,6
			$p_{1-2}=0,000005$		$p_{1-3}=0,000001$	
СОД, ед/мин/1 г Hb	1917,1	1668,9–2372,9	2789,2	2479,4–2884,9	1544,5	1424,4–1643,1
			$p_{1-2}=0,001$		$p_{1-3}=0,000006$ $p_{2-3}=0,01$	
КАТ, ммоль/с/1 г Hb	1,77	1,41–2,03	2,7	2,47–2,88	1,5	1,3–1,78
			$p_{1-2}=0,001$		$p_{1-3}=0,000009$	

у пациентов с МЖ с осложненным послеоперационным периодом свидетельствует о высоком уровне аутоокисления гемоглобина у них. Высокая активность каталазы у больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом свидетельствует о высоком содержании в эритроцитах внутриклеточного пероксида водорода, который, вероятно, образовался из-за компенсаторного механизма за счет синтеза фермента на уровне ядерного предшественника эритроцитов. Избыток пероксида водорода может быть обусловлен увеличением реакций с участием флавиновых коферментов и оксидаз [38].

Полученные нами данные об усилении перекисного окисления липидов и снижении антиоксидантной защиты при МЖ с осложненными инфекционными проявлениями в послеоперационном периоде и усилении перекисного окисления липидов и активации антиоксидантной защиты при МЖ с неосложненным течением указывают на протективный эффект I и II типов воспаления и ускоренное развитие инфекционных осложнений при выраженном I типе воспаления.

Таким образом, несмотря на некоторое сходство сдвигов иммуновоспалительного статуса крови у больных МЖ с осложненным и неосложненным послеоперационным периодом, роль этих изменений в патогенезе воспалительного повреждения гепатобилиарной зоны противоположна, и, следовательно, иммуномодулирующая терапия больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом должна быть направлена на мишени, отличающиеся от таковых у больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом. У больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом наиболее значимых положительных эффектов следует ожидать от лечения, направленного на индукторы и эффекторы I типа воспаления, тогда как у больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом более целесообразна терапия, мишенями которой станут индукторы I и II типов воспаления [39].

## Обсуждение

Продемонстрирована преимущественная роль воспалительного процесса I типа в патогенезе механической желтухи с осложненным послеоперационным периодом, а в патогенезе механической желтухи с неосложненным послеоперационным периодом – воспаления I и II типов.

В группе больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом наблюдали увеличение количества лимфоцитов, фагоцитов, продуцирующих провоспалительные цитокины (ИЛ-2, ФНО $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ ), т. е. можно предположить, что у этих больных имеется дефицит клеток, продуцирующих противовоспалительные цитокины. Выявленное нарушение часто ассоциируется с нарушениями баланса окислительной и антиокислительной систем организма и воспалительными реакциями [11, 12]. В ответ на развитие клеточного стресса, обусловленного окисленными липопротеинами низкой плотности или в ответ на ИЛ-8, вероятно, развивается аутофагия [13–15]. При этом активные формы кисло-

рода участвуют в активации нейтрофилов, повышают их микробицидность и позволяют осуществлять высокоэффективную противoinфекционную защиту организма [16–18]. В тяжелых случаях они являются источником системных аутоиммунных нарушений или вызывают разрушения эндотелия сосудов [19, 20]. Компенсаторное увеличение количества моноцитов у больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом сопровождается аккумуляцией в этих клетках липопротеинов. Отсутствие цитокинов II типа воспаления, возможно, снижает переключение моноцитов/макрофагов на альтернативно активированный M2-фенотип и не активирует образование Трег [21, 22].

У больных МЖ с неосложненным и осложненным послеоперационными периодами выявлено увеличение содержания нейтрофилов относительно группы сравнения, что, вероятно, указывает на различную роль данных клеток иммунной системы в патогенезе заболевания. Нейтрофилы, по-видимому, играют у больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом не только провоспалительную, но и иммунорегуляторную роль, блокируя пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов и секрецию ими цитокинов. Дополнительный вклад в иммунорегуляцию может обеспечивать процесс эффероцитоза. Макрофаги фагоцитируют апоптотические нейтрофилы, при этом в макрофагах ингибируется продукция провоспалительных цитокинов и одновременно стимулируются противовоспалительные и иммунорегуляторные [28, 29].

Противоположная роль нейтрофилов – иммунорегуляторная у больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом и провоспалительная у больных с осложненным течением – может быть связана с фактом многократного превышения концентрации цитокина ФНО $\alpha$  у больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом по сравнению с таковым у больных МЖ с неосложненным течением. ФНО $\alpha$  выступает сильным индуктором экзоцитоза первичных и вторичных гранул нейтрофилов, содержащих миелопероксидазу, вызывающую образование активных форм кислорода, нейтрофильную эластазу, а также множественные протеиназы, вызывающие апоптоз эндотелия сосудов. Иммунорегулирующая функция нейтрофилов обусловлена высвобождением из третичных гранул аргиназы [26, 30]. В последнее время появились исследования о возможности нейтрофилов, аналогично макрофагам, дифференцироваться в различные функциональные фенотипы, определяющие различный исход воспалительных реакций [31, 32].

Обнаружено значительное повышение содержания малонового диальдегида в эритроцитах у больных обеих сравниваемых групп, что подтверждает усиление процессов липопероксидации в раннем послеоперационном периоде. Вместе с тем полученные в нашей работе результаты указывают на усиление активности антиоксидантной защиты, увеличение активности ферментов супероксиддисмутазы и каталазы, которые способствуют снижению проявлений окислительного

стресса и свидетельствуют скорее о протективной роли воспаления II типа у больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом.

## Выводы

1. У больных МЖ с осложненным послеоперационным периодом выявляется усиление процессов липопероксидации, снижение активности ферментов антиоксидантной защиты и преимущественный I тип воспаления.

2. У больных МЖ с неосложненным послеоперационным периодом проявления окислительного стресса

компенсируются повышением активности энзимов антиоксидантной защиты, выявляются I и II типы воспаления.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Смирнова О.В.; сбор и обработка материала – Елманова Н.Г.; статистическая обработка – Смирнова О.В., Елманова Н.Г.; написание текста – Смирнова О.В.; редактирование – Смирнова О.В.; утверждение окончательного варианта статьи – Смирнова О.В., Елманова Н.Г.; ответственность за целостность всех частей статьи – Смирнова О.В.

## Литература

1. Воронова Е.А., Пахомова Р.А. Современные представления о классификации механической желтухи. Современные проблемы науки и образования. 2015; 6: 298.
2. Кошевский П.П., Алексеев С.А., Бовтук Н.Я., Картун Л.В. Коррекция эндотоксикоза и дисбаланса противовоспалительных цитокинов в раннем послеоперационном периоде у пациентов с механической желтухой и желчной гипертензией неопухольевой этиологии. Российский медицинский журнал. 2014; 1 (74): 74–8.
3. Нартайлаков М.А., Соколов С.В., Соколов В.П., Грицаенко А.И., Мухамедьянов И.Ф., Рисберг Р.Ю. Анализ осложненных антеградных рентгеноэндобилиарных вмешательств у больных механической желтухой. Медицинский вестник Башкортостана. 2017; 4 (70): 9–13.
4. Гридасов И.М., Горошинская И.А., Ушакова Н.Д., Леонова А.В., Максимов А.Ю. Динамика окислительного стресса и состояние антиоксидантного потенциала у больных с механической желтухой опухолевого генеза при коррекции желчеоттока. Современные проблемы науки и образования. 2013; 5: 297.
5. Рахимова М.Б., Ходжиев С.Э., Разиков А.А., Рахимова М.Э. Оценка состояния гепатобилиарной зоны у больных с хроническими формами ИБС на фоне стандартного лечения. Медицина и здравоохранение : материалы VII Международной научной конференции (г. Краснодар, январь 2019 г.). Краснодар : Новация, 2019: 11–21.
6. Galkina E., Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. Annu. Rev. Immunol. 2009; 27: 165–97. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132620>
7. Dodson M., Darley-Usmar V., Zhang J. cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. Free Radic. Biol. Med. 2013; 63: 207–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.014>
8. Таширева Л.А., Перельмутер В.М., Манских В.Н., Денисов Е.В., Савельева О.Е., Кайгородова Е.В., Завьялова М.В. Типы иммуновоспалительных реакций как алгоритмы взаимодействия клеток в условиях репаративной регенерации и опухолевого роста. Биохимия. 2017; 5 (82): 732–48.
9. Смирнова О.В., Титова Н.М., Каспаров Э.В., Елманова Н.Г. Характеристика цитокиновой регуляции у больных с синдромом механической желтухи доброкачественного, доброкачественного опухолевого и злокачественного генезов. В мире научных открытий. 2016; 11 (83): 27–41.
10. Курбонов К.М., Назирбоев К.Р. Эндотоксикоз и показатели уровня цитокинов у пациентов с механической желтухой неопухольевой генеза. Новости хирургии. 2017; 4 (25): 359–64.
11. Насиров М.Я., Джамалов Ф.Г., Джамалова Т.П., Захидов З.Т., Гараев Г.Ш., Алекберова С.А. Взаимосвязь оксидативного стресса и цитокинов при экспериментальной механической желтухе. Вісник проблем біології і медицини. 2016; 4 (1): 167–70.
12. Hock B.D., Taylor K.G., Cross N.B., Kettle A.J., Hampton M.B., McKenzie J.L. Effect of activated human polymorphonuclear leucocytes on T lymphocyte proliferation and viability. Immunology. 2012; 137 (3): 249–58. DOI: <https://doi.org/10.1111/imm.12004>
13. Muller C., Salvayre R., Ne'gre-Salvayre A., Vindis C. Oxidized LDLs trigger endoplasmic reticulum stress and autophagy: prevention by HDLs. Autophagy. 2011; 7 (5): 541–3. DOI: <https://doi.org/10.4161/auto.7.5.15003>
14. Mihalache C.C., Simon H.U. Autophagy regulation in macrophages and neutrophils. Exp. Cell Res. 2012; 318 (11): 1187–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.12.021>
15. Меньяло М.Е., Малащенко В.В., Шмаров В.А., Газатова Н.Д., Мелашенко О.Б., Гончаров А.Г., Селедцова Г.В., Селедцов В.И. Роль интерлейкина-8 в непосредственной регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов. Медицинская иммунология. 2017; 19 (5): 529–36. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-5-529-536>
16. Radic M., Marion T.N. Neutrophil extracellular chromatin traps connect innate immune response to autoimmunity. Semin. Immunopathol. 2013; 35 (4): 465–80. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0376-6>
17. Keshari R.S., Jyoti A., Dubey M., Kothari n., Kohli M., Bogra J. et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. PLoS One. 2012; 7 (10): e48111.
18. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J. Cell Biol. 2007; 176 (2): 231–41.
19. Saffarzadeh M., Juenemann C., Queisser M.A., Lochnit G., Barreto G., Galuska S.P., Lohmeyer J., Preissner K.T. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. PLoS One. 2012; 7 (2): e32366. doi: [10.1371/journal.pone.0032366](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366).
20. Darbousset R., Thomas G.M., Mezouar S., Fraere C., Bonier R., Mackman N., Renné T., Dignat-George F., Dubois C., Panicot-Dubois L. Tissue factor-positive neutrophils bind to injure endothelial wall and initiate thrombus formation. Blood. 2012; 120 (10): 2133–43. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-437772>
21. Vu M.D., Xiao X., Gao W., Degauque N., Chen M., Kroemer A., Killeen N., Ishii N., Li X.C. OX40 costimulation turns off Foxp3+ tregs. Blood. 2007; 110 (7): 2501–10.
22. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., Giometto R., Höpner S., Centonze D., Bernardi G., Dell'Acqua M.L., Rossini P.M., Battistini L., Röttschke O., Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. Blood. 2007; 110 (4): 1225–32.
23. Островский В.К., Машенко А.В., Янголенко Д.В., Макаров С.В. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях. Клиническая лабораторная диагностика. 2006; 6: 50–3.
24. Федоров В.Э., Гусев К.А. Индивидуализация тактики ведения больных механической желтухой при остром калькулезном холецистите. Фундаментальные исследования. 2015; 1 (3): 618–22.
25. Ferrante C.J., Pinhal-Enfield G., Elson G., Cronstein B.N., Hasko G., Outram S., Leibovich S.J. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Rα) signaling. Inflammation. 2013; 36 (4): 921–31.
26. Barron L., Smith A.M., El Kasmii K.C., Qualls J.E., Huang X., Cheever A., Borthwick L.A., Wilson M.S., Murray P.J., Wynn T.A. Role of arginase 1 from myeloid cells in th2- dominated lung inflam-

mation. PLoS One. 2013; 8 (4): e6196. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061961>

27. Тагиев Э.Г. Динамика интерлейкина-4 при хирургическом лечении механической желтухи доброкачественного генеза. *Здравоохранение (Минск)*. 2016; 6: 4–8.

28. Hasko G., Pacher P., Deitch E.A., Vizi E.S. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacol. Ther.* 2007; 113 (2): 264–75.

29. Gleissner Ch.A. Macrophage phenotype modulation by CXCL4 in atherosclerosis. *Front. Physiol.* 2012; 3: 1. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00001>

30. Долгушин И.И. Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 30–7.

31. Villalta A., Nguyen H.X., Deng B., Gotoh T., Tidball J.G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18 (3): 482–96. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn376>

32. Tabas L., Bornfeldt K.E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis. *Circ Res.* 2016; 118 (4): 653–67. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306256>

33. Kilicoglu B., Gencay C., Kismet K., Serin Kilicoglu S., Erguder I., Erel S., Sunay A.E., Erdemli E., Durak I., Akkus M.A. The ultrastructural research of liver in experimental obstructive jaundice and effect of honey. *Am. J. Surg.* 2008; 195 (2): 249–56.

34. Hatipoglu S., Yildiz H., Bulbuloglu E., Coskuner I., Kurutas E.B., Hatipoglu F., Ciralik H., Berhuni M.S. Protective effects of intravenous anesthetics on kidney tissue in obstructive jaundice. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20 (12): 3320–6.

35. Ismail N.A., Okasha S.H., Dhawan A., Abdel-Rahman A.O., Shaker O.G., Sadik N.A. Antioxidant enzyme activities in hepatic tissue from children with chronic cholestatic liver disease. *Saudi J. Gastroenterol.* 2010; 16 (2): 90–4. DOI: <https://doi.org/10.4103/1319-3767.61234>

36. Нимаева О.Д., Карпова А.Б., Прадедова Е.В., Салаяев Р.К. Образование супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в вакуолярном содержимом в присутствии гербицидов. *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология*. 2017; 22: 12–26.

37. Assimakopoulos S.F., Mavrikakis A.G., Grintzalis K., Papapostolou I., Zervoudakis G., Konstantinou D., Chroni E., Vagianos C.E., Georgiou C. Superoxide radical formation in diverse organs of rats with experimentally induced obstructive jaundice. *Redox Rep.* 2008; 13 (4): 179–84. DOI: <https://doi.org/10.1179/135100008X308902>

38. Билова Т.Е., Шарова Е.И. Влияние оксидаз клеточных стенок на содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в апопласте проростков кукурузы. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология*. 2010; 3: 84–92.

39. Хаитов Р.М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность. *Иммунология*. 2020; 41 (2): 101–6. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-101-106>

## References

1. Voronova E.A., Pakhomova R.A. Modern views on the classification of obstructive jaundice. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 6: 298. (in Russian)

2. Koshevskiy P.P., Alekseev S.A., Bovtyuk N.Ya., Kartun L.V. Correction of endotoxemia and an imbalance of anti-inflammatory cytokines in the early postoperative period in patients with obstructive jaundice and biliary hypertension of a non-tumor etiology. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 1 (74): 74–8. (in Russian)

3. Nartaylakov M.A., Sokolov S.V., Sokolov V.P., Gritsaenko A.I., Mukhamed'yanov I.F., Risberg R.Yu. Analysis of the complications of antegrade X-ray endobiliary interventions in patients with obstructive jaundice. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2017; 4 (70): 9–13. (in Russian)

4. Gridasov I.M., Goroshinskaya I.A., Ushakova N.D., Leonova A.V., Maksimov A.Yu. Dynamics of oxidative stress and the state of antioxidant potential in patients with obstructive jaundice of tumor origin during correction of bile outflow. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; 5: 297. (in Russian)

5. Rakhimova M.B., Khodzhiev S.E., Razikov A.A., Rakhimova M. E. Assessment of the hepatobiliary zone in patients with chronic forms of ischemic heart disease during standard treatment. In: *Meditsina i zdravookhranenie: materialy VII Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii (g. Krasnodar, Yanvar' 2019) [Medicine and Healthcare: Proceedings of the VII International Scientific Conference (Krasnodar, January 2019)]*. Krasnodar: Novatsiya, 2019: 11–21. (in Russian)

6. Galkina E., Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 165–97. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132620>

7. Dodson M., Darley-Usmar V., Zhang J. cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 2013; 63: 207–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.014>

8. Tashireva L.A., Perel'muter V.M., Mansikh V.N., Denisov E.V., Savel'eva O.E., Kaygorodova E.V., Zav'yalova M.V. Types of immun-inflammatory reactions as algorithms for the interaction of cells in the conditions of reparative regeneration and tumor growth. *Biokhimiya*. 2017; 5 (82): 732–48. (in Russian)

9. Smirnova O.V., Titova N.M., Kasparov E.V., Elmanova N.G. Characterization of cytokine regulation in patients with obstructive jaundice syndrome of benign, benign tumor and malignant genesis. *V mire nauchnykh otkrytiy*. 2016; 11 (83): 27–41. (in Russian)

10. Kurbonov K.M., Nazirboev K.R. Endotoxemia and cytokine levels in patients with obstructive jaundice of non-tumor origin. *Novosti khirurgii*. 2017; 4 (25): 359–64. (in Russian)

11. Nasirov M.Ya., Dzhamalov F.G., Dzhamalova T.P., Zakhidov Z.T., Garaev G.Sh., Alekberova S.A. Interrelation of oxidative stress

and cytokines in experimental obstructive jaundice. *Visnik problem biologii i meditsini*. 2016; 4 (1): 167–70. (in Russian)

12. Hock B.D., Taylor K.G., Cross N.B., Kettle A.J., Hampton M.B., McKenzie J.L. Effect of activated human polymorphonuclear leukocytes on T lymphocyte proliferation and viability. *Immunology*. 2012; 137 (3): 249–58. DOI: <https://doi.org/10.1111/imm.12004>

13. Muller C., Salvayre R., Ne'gre-Salvayre A., Vindis C. Oxidized LDLs trigger endoplasmic reticulum stress and autophagy: prevention by HDLs. *Autophagy*. 2011; 7 (5): 541–3. DOI: <https://doi.org/10.4161/auto.7.5.15003>

14. Mihalache C.C., Simon H.U. Autophagy regulation in macrophages and neutrophils. *Exp. Cell Res.* 2012; 318 (11): 1187–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.12.021>

15. Menyaylo M.E., Malashchenko V.V., Shmarov V.A., Gazatova N.D., Melashchenko O.B., Goncharov A.G., Seledtsova G.V., Seledtsov V.I. The role of interleukin-8 in the direct regulation of the functional activity of T-lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya*. 2017; 19 (5): 529–36. DOI: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2017-5-529-536> (in Russian)

16. Radic M., Marion T.N. Neutrophil extracellular chromatin traps connect innate immune response to autoimmunity. *Semin. Immunopathol.* 2013; 35 (4): 465–80. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0376-6>

17. Keshari R.S., Jyoti A., Dubey M., Kothari n., Kohli M., Bogra J., et al. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e48111.

18. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2007; 176 (2): 231–41.

19. Saffarzadeh M., Juenemann C., Queisser M.A., Lochnit G., Barreto G., Galuska S.P., Lohmeyer J., Preissner K.T. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One*. 2012; 7 (2): e32366. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032366>

20. Darbousset R., Thomas G.M., Mhezouar S., Fraere C., Bonier R., Mackman N., Renné T., Dignat-George F., Dubois C., Panicot-Dubois L. Tissue factor-positive neutrophils bind to injure endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood*. 2012; 120 (10): 2133–43. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-437772>

21. Vu M.D., Xiao X., Gao W., Degauque N., Chen M., Kroemer A., Killeen N., Ishii N., Li X.C. OX40 costimulation turns off Foxp3+ tregs. *Blood*. 2007; 110 (7): 2501–10.

22. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., Giometto R., Höpner S., Centonze D., Bernardi G., Dell'Acqua M.L., Rossini P.M., Battistini L., Röttschke O., Falk K.

Expression of ectonucleotidase cD39 by Foxp3+ treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007; 110 (4): 1225–32.

23. Ostrovskiy V.K., Mashchenko A.V., Yangolenko D.V., Makarov S.V. The indicators of blood and leukocyte intoxication index in assessing the severity and determining the prognosis for inflammatory, purulent and purulent-destructive diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2006; 6: 50–3. (in Russian)

24. Fedorov V.E., Gusev K.A. Individualization of management tactics for patients with obstructive jaundice in acute calculous cholecystitis. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2015; 1 (3): 618–22. (in Russian)

25. Ferrante C.J., Pinal-Enfield G., Elson G., Cronstein B.N., Hasko G., Outram S., Leibovich S.J. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R $\alpha$ ) signaling. *Inflammation*. 2013; 36 (4): 921–31.

26. Barron L., Smith A.M., El Kasmi K.C., Qualls J.E., Huang X., Cheever A., Borthwick L.A., Wilson M.S., Murray P.J., Wynn T.A. Role of arginase 1 from myeloid cells in th2- dominated lung inflammation. *PLoS One*. 2013; 8 (4): e6196. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061961>

27. Tagiev E.G. The dynamics of interleukin-4 in the surgical treatment of obstructive jaundice of benign origin. *Zdravookhranenie (Minsk)*. 2016; 6: 4–8. (in Russian)

28. Hasko G., Pacher P., Deitch E.A., Vizi E.S. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacol. Ther.* 2007; 113 (2): 264–75.

29. Gleissner Ch.A. Macrophage phenotype modulation by CXCL4 in atherosclerosis. *Front. Physiol.* 2012; 3: 1. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00001>

30. Dolgushin I.I. Neutrophilic granulocytes: new faces of old acquaintances. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2019; 18 (1): 30–7. (in Russian)

31. Villalta A., Nguyen H.X., Deng B., Gotoh T., Tidball J.G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine

metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18 (3): 482–96. DOI: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn376>

32. Tabas I., Bornfeldt K.E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis. *Circ Res.* 2016; 118 (4): 653–67. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306256>

33. Kilicoglu B., Gencay C., Kismet K., Serin Kilicoglu S., Erguder I., Erel S., Sunay A.E., Erdemli E., Durak I., Akkus M.A. The ultrastructural research of liver in experimental obstructive jaundice and effect of honey. *Am. J. Surg.* 2008; 195 (2): 249–56.

34. Hatipoglu S., Yildiz H., Bulbuloglu E., Coskuner I., Kurutas E.B., Hatipoglu F., Ciralik H., Berhuni M.S. Protective effects of intravenous anesthetics on kidney tissue in obstructive jaundice. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20 (12): 3320–6.

35. Ismail N.A., Okasha S.H., Dhawan A., Abdel-Rahman A.O., Shaker O.G., Sadik N.A. Antioxidant enzyme activities in hepatic tissue from children with chronic cholestatic liver disease. *Saudi J. Gastroenterol.* 2010; 16 (2): 90–4. DOI: <https://doi.org/10.4103/1319-3767.61234>

36. Nimaeva O.D., Karpova A.B., Pradedova E.V., Salyaev R.K. Formation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in vacuolar contents in the presence of herbicides. *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya. Ekologiya*. 2017; 22: 12–26. (in Russian)

37. Assimakopoulos S.F., Mavrakis A.G., Grintzalis K., Papapostolou I., Zervoudakis G., Konstantinou D., Chroni E., Vagianos C.E., Georgiou C. Superoxide radical formation in diverse organs of rats with experimentally induced obstructive jaundice. *Redox Rep.* 2008; 13 (4): 179–84. DOI: <https://doi.org/10.1179/135100008X308902>

38. Bilova T.E., Sharova E.I. The effect of cell wall oxidases on the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the apoplast of maize seedlings. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Seriya 3. Biologiya*. 2010; 3: 84–92. (in Russian)

39. Khaitov R.M. Immunomodulators: myths and reality. *Immunologiya*. 2020; 41 (2): 101–6. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-101-106> (in Russian)

## Сведения об авторах

**Смирнова Ольга Валентиновна** – д.м.н., доцент, заведующая лабораторией клинической патофизиологии НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Российская Федерация; e-mail: [ovsmirnova71@mail.ru](mailto:ovsmirnova71@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-3992-9207>

**Елманова Нина Георгиевна** – младший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Российская Федерация; e-mail: [elm-nina@yandex.ru](mailto:elm-nina@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6073-0601>

## Authors' information

**Olga V. Smirnova** – MD, Assistant Prof., Head of the Laboratory of Clinical Pathophysiology of the KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation; e-mail: [ovsmirnova71@mail.ru](mailto:ovsmirnova71@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-3992-9207>

**Nina G. Elmanova** – Junior Researcher of the Laboratory of Clinical Pathophysiology of the KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russian Federation; e-mail: [elm-nina@yandex.ru](mailto:elm-nina@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6073-0601>

## Методы

© Коллектив авторов, 2020

Невская Л.В., Капитанова В.К., Петрова Н.Э.

### Сравнительный анализ современных методов диагностики аллергических реакций немедленного типа

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, г. Москва, Российская Федерация

#### Резюме

Эффективность лечения аллергических заболеваний (АЗ), большинство которых возникает из-за развития у пациентов аллергических реакций немедленного типа (АРНТ), напрямую связана с диагностикой. Для специфической диагностики АЗ, обусловленных развитием АРНТ, применяют тесты как *in vivo*, так и *in vitro*, которые связаны с образованием комплекса аллерген – антитело класса IgE. Один из диагностических методов *in vivo* – кожные пробы – прост в постановке, результат исследования известен через 20 мин. Однако для постановки кожных проб имеется ряд противопоказаний, несоблюдение которых может спровоцировать нежелательные осложнения, в том числе и анафилактический шок. Современные тесты *in vitro* (REAST и аллергочип) противопоказаний для проведения не имеют и позволяют более точно установить причинно-значимый аллерген. Они относятся к методам молекулярной диагностики (МД), поскольку при их применении используют отдельные компоненты природного аллергенного комплекса, включающего несколько различных антигенных детерминант, которые разделяются на мажорные и минорные. Главные (мажорные) компоненты аллергенного комплекса вызывают сенсибилизацию у 50 % и более пациентов, минорные компоненты аллергенного комплекса – менее чем у 10 % пациентов. С помощью методов МД был изучен механизм возникновения перекрестных аллергических реакций на аллергены, к которым у пациента не было первичной сенсибилизации, и разработаны карты перекрестной иммунореактивности. Методы МД более затратны по сравнению с кожными пробами, однако по их результатам можно оценить эффективность аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ), что приводит к существенному снижению стоимости лечения. Если у пациентов выявлена сенсибилизация к главным компонентам аллергенного комплекса, то АСИТ будет эффективна, поскольку препараты аллергенов, используемые для ее проведения, представляют собой водно-солевые экстракты только природных аллергенов, в которых присутствуют в значительных количествах главные аллергенные компоненты.

**Ключевые слова:** аллергические заболевания; аллергические реакции немедленного типа; IgE; аллергодиагностика; тесты *in vivo*; тесты *in vitro*; молекулярная диагностика; REAST аллергочип; аллергены; аллергенные компоненты; аллерген-специфическая иммунотерапия

Статья поступила 10.05.2020. Принята в печать 16.06.2020.

**Для цитирования:** Невская Л.В., Капитанова В.К., Петрова Н.Э. Сравнительный анализ современных методов диагностики аллергических реакций немедленного типа. Иммунология. 2020; 41 (4): 363–369. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-363-369>

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции  
Невская Лариса Валерьевна –  
кандидат биологических наук,  
главный эксперт  
лаборатории иммунологии  
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,  
Москва, Российская Федерация  
E-mail: [Nevskaya@expmed.ru](mailto:Nevskaya@expmed.ru)  
<http://orcid.org/0000-0001-5371-8532>

Nevskaya L.V., Kapitanova V.K., Petrova N.E.

### Comparative analysis of modern methods for diagnostics of immediate allergic reactions

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russian Federation

**Abstract**

The effectiveness of treatment of allergic diseases (AD), most of which are associated with the development of immediate allergic reactions in patients (immediate-type allergy), is directly related to the diagnosis. For specific diagnostics of AD caused by the development of immediate-type allergy, both *in vivo* and *in vitro* tests are used, which are associated with the formation of an allergen-antibody (IgE) complex. Skin tests are easy to set up, the result of the study is known in 20 minutes. However, for skin tests, there are a number of contraindications, failure to comply with can provoke undesirable complications, including anaphylactic shock. Modern *in vitro* tests (REAST and allergochip) do not have contraindications for their conduct and allow to have more accurately determine the cause-significant allergen. They belong to the methods of molecular diagnostics (MD) because they use separate components of a natural allergenic complex, which includes several different antigenic determinants, which are divided into major and minor. The main (major) components of the allergen complex cause sensitization of 50 % or more patients, minor components of the allergen complex – in less than 10 % of patients. Using MD methods the mechanism of cross-allergic reactions to allergens to which the patient did not have primary sensitization was studied and cross-immunoreactivity maps were developed. MD methods are more expensive than skin tests, but their results can be used to evaluate the effectiveness of allergen specific immunotherapy (ASIT), which leads to a significant reduction in the cost of treatment. If patients are found to be sensitized to the main components of the allergenic complex, then ASIT will be effective, since the allergen preparations used for its implementation are water-salt extracts of only natural allergens, which contain significant amounts of the main allergenic components.

**Keywords:** allergic diseases; immediate type allergic reactions; IgE; allergodiagnostics; *in vivo* tests; *in vitro* tests; molecular diagnostics; REAST; allergochip; allergens; allergenic components; allergen-specific immunotherapy

**Received** 10.05.2020. **Accepted** 16.06.2020.

**For citation:** Nevskaya L.V., Kapitanova V.K., Petrova N.E. Comparative analysis of modern methods for diagnosing immediate allergic reactions. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 363–9. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-363-369> (in Russian)

**Funding.** The work was performed as part of the state task of the Federal State Budgetary Institution of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 056-00003-20-00 for conducting applied scientific research (state registration number AAAA-A18-118021590046-9).

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

**For correspondence**  
Larisa V. Nevskaya –  
PhD, Chief Expert  
of the Laboratory of Immunology,  
Scientific Centre  
for Expert Evaluation  
of Medicinal Products,  
Ministry of Health  
of the Russian Federation,  
Moscow, Russian Federation  
E-mail: [Nevskaya@expmed.ru](mailto:Nevskaya@expmed.ru)  
<http://orcid.org/0000-0001-5371-8532>

**Введение**

Рост числа аллергических заболеваний (АЗ), большинство которых связано с развитием у пациентов аллергических реакций немедленного типа (АРНТ), является одной из актуальных проблем современной медицины [1]. Развитие АРНТ связано с патологической реакцией организма на экзогенные аллергены (пыльцевые, пищевые, бытовые, микробные, лекарственные). При первичном контакте организма с аллергеном синтезируется специфический IgE, концентрация которого превышает норму в 20–40 раз (стадия сенсибилизации). После повторного контакта с аллергеном АРНТ развиваются сразу или через несколько минут, что проявляется в виде анафилактического шока, отека Квинке, атопического дерматита, атопической бронхиальной астмы, поллинозов и т. п. [2–4]. На рисунке представлена схема развития АРНТ [5].

Эффективность лечения АЗ и, соответственно, улучшение качества жизни пациентов напрямую связана с ранней диагностикой таких заболеваний. Постановка диагноза АЗ направлена на выявление при-

чин (причинно-значимого аллергена) и факторов, способствующих формированию и манифестации АРНТ. Диагностика основана на корреляции анамнеза с этиологической ролью различных аллергенов, наличия положительных результатов тестирования, подтверждающих диагноз. Обследование пациента включает тщательный сбор аллергоанамнеза (обострения симптомов аллергии при повторной провокации аллергеном, анализ фармакологического, пищевого анамнеза), неспецифические методы обследования (сбор анамнеза, физикальное обследование, клинический анализ периферической крови, биохимический анализ, клинический анализ мочи, цитологическое исследование секрета, мазков или смывов из полости носа, слизистой конъюнктивы и др.), инструментальные и функциональные методы обследования (передняя риноскопия, исследование функции внешнего дыхания и др.) [6]. Для специфической диагностики АЗ, обусловленных развитием АРНТ, применяют тесты как *in vivo*, так и *in vitro*, которые связаны с образованием комплекса аллерген-антитело класса IgE.

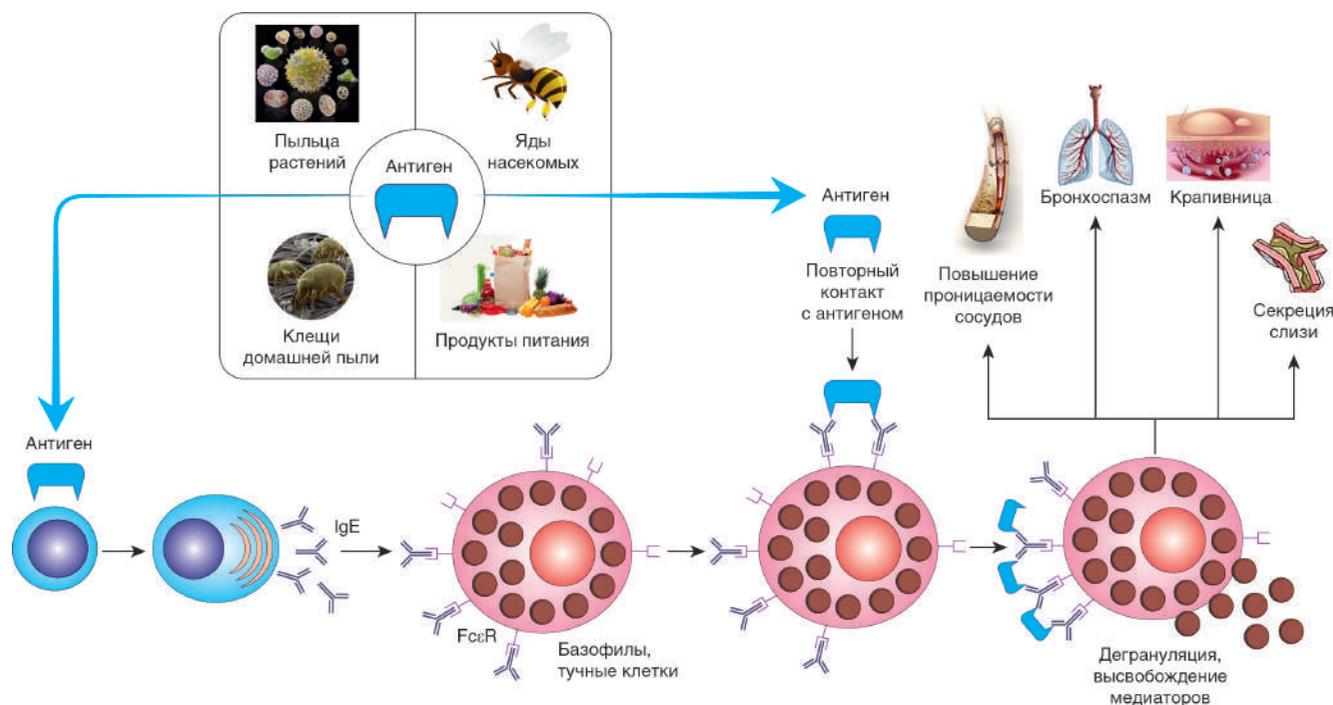


Схема развития аллергической реакции немедленного типа (по [5] с изменениями)

### Аллергодиагностика *in vivo*

Применение тестов *in vivo* для подтверждения АЗ имеет более чем 100-летнюю историю и продолжает оставаться актуальным по сегодняшний день, поскольку тесты *in vivo* обладают хорошей чувствительностью, специфичностью и точностью; их воспроизводимость колеблется от 75 до 88 %. При аллергодиагностике наиболее часто применяют кожные тесты: прик-тест (тест уколом) или скарификацию. Они просты в постановке, поскольку для кожных тестов необходимо иметь аллерген, раствор гистамина (положительный контроль), скарификатор или иглу для прокола кожи; результаты анализа известны через 20 мин [7, 8].

Однако необходимо отметить, что тесты *in vivo* и кожные пробы в частности имеют серьезные противопоказания, в первую очередь – обострение АЗ, острых и хронических заболеваний других этиологий. Также к противопоказаниям относятся гормональная терапия, психические заболевания, заболевания центральной нервной системы, беременность и период лактации. На результаты кожных проб влияет возраст пациентов – у детей до 5 лет и лиц старше 60 лет снижена реакция кожи. Но несмотря на это в некоторых ситуациях тесты *in vivo* имеют решающее значение для определения причинно-значимого аллергена [8].

### Аллергодиагностика *in vitro*

С развитием иммунохимических методов исследования стало возможным выявлять аллерген-специфические IgE-антитела (IgE-Ат) в крови пациентов. Методы иммуноанализа в аллергодиагностике АРНТ основаны на связывании исследуемого белка (аллергена) со специфичными к нему IgE-Ат и последующем выявлении об-

разовавшегося комплекса антиген–антитело с помощью метки, которая легко детектируется с использованием высокочувствительных устройств – счетчиков радиоактивных частиц, спектрофотометров, флуориметров и т. п. Исследуемые аллергены (природные аллергенные экстракты, содержащие как аллергенные, так и неаллергенные компоненты) сорбировали на твердом носителе, в качестве которого использовали бумажные диски, полистироловый планшет или нитроцеллюлозную мембрану. В 1967 г. для выявления IgE-Ат впервые был применен радиоаллергосорбентный тест (РАСТ). Позже для этих целей стали использовать и другие методы иммуноанализа, такие как иммуноблоттинг, ИФА и т. п. [9]. Необходимо отметить, что первое поколение тестов *in vitro* обладало более низкой чувствительностью по сравнению с кожными пробами, концентрация выявляемых IgE-Ат не всегда коррелировала с тяжестью заболевания [10–12].

Применение новых технологий и материалов в разработках тест-систем на основе методов иммуноанализа привело к тому, что чувствительность тестов *in vitro* и *in vivo* стала сопоставима. В этих тест-системах наряду с нативными аллергенами используются также и рекомбинантные.

В частности, для проведения диагностики *in vitro* в настоящее время применяют тест-системы, основанные на методе REAST – реверсивный аллергосорбентный тест («capture» REAST) – с использованием биотинилированных жидкофазных моно- и микст-аллергенов. Отличие «capture» REAST от классических вариантов ИФА состоит в том, что в планшет с сорбированными моноклональными антителами к IgE человека вносятся исследуемый образец крови и раствор биотинилированного аллергена. Чувствительность тест-системы

Тест-системы для выявления специфических IgE-АТ к аллергенным компонентам

Тест-система	Метод
ImmunoCAP ISAC (ThermoFisher Scientific)	аллергочип
ImmunoCAP specific IgE (ThermoFisher Scientific)	REAST
Specific IgE REAST (Dr. Fooko)	
АллергоИФА-специфические IgE (АлкорБио)	

повышается за счет того, что растворенный аллерген обладает большей доступностью для связи со специфическим IgE, чем аллерген, связанный с поверхностью планшета [13, 14].

В последнее время широкую популярность получил метод диагностики с использованием биочипов (аллергочипов). В аллергочипе ImmunoCAP Immuno Solid-Phase Allergen Chip (ISAC) используется технология мультиплексного анализа: на микрочип методом ультраточного дозирования нанесены 112 аллергенов. Для тестирования требуется всего 30 мкл сыворотки или плазмы крови пациента [15, 16].

REAST и тестирование с помощью аллергочипа ImmunoCAP ISAC относятся к методам молекулярной или компонентной диагностики (МД), поскольку используют отдельные компоненты природного аллергенного комплекса, включающего несколько различных антигенных детерминант (белковых молекул), обладающих различной способностью вызывать аллергическую реакцию. Главные (мажорные) компоненты аллергенного комплекса обладают наибольшей иммуногенностью и вызывают сенсibilизацию 50 % и более пациентов с аллергией, они более крупные по размеру и более иммуногенные. По сравнению с ними малые по размеру компоненты аллергенного комплекса (минорные аллергены) вызывают сенсibilизацию у менее чем 10 % пациентов [17, 18]. Аллергенные компоненты классифицированы по их принадлежности к различным белковым семействам исходя структуры и функций белков. Ведется и постоянно дополняется база аллергенных молекул. В настоящее время описаны и охарактеризованы более 3 тыс. аллергенов, в числе которых выявлены 1400 изоформ и более 1500 воспроизведены как рекомбинантные молекулы [19].

Сравнительная оценка диагностической эффективности показала, что выявление причинно-значимого аллергена с помощью аллергочипа ImmunoCAP ISAC было более точным по сравнению с кожными пробами у пациентов, проживающих в местности с гипервыбросом пыльцы различных трав, деревьев и кустарников, что позволило снизить расходы на лечение более чем в 2 раза [20].

С помощью методов МД был изучен механизм возникновения перекрестных аллергических реакций на аллергены, к которым у пациента не было первичной сенсibilизации. Это связано с тем, что аллергены

имеют сходные трехмерные структурные области (эпитопы), и поэтому IgE-Ат, специфичные для одного аллергена, могут распознавать другие аллергены как свой специфичный аллерген. Так например установлено, что основной причиной перекрестной реактивности между аллергенами березы и яблони является биохимическое и иммунологическое сходство между основными аллергенными компонентами Bet v 1 и Mal d 1. Встречаемость перекрестной аллергенной реактивности по различным данным варьирует от 26 до 70 %. В настоящее время разработаны карты перекрестной иммунореактивности, что позволяет определить аллергены, после контакта с которыми у пациента может развиваться аллергическая реакция [21–24].

К недостаткам методов МД относится их более высокая стоимость по сравнению с кожными пробами и более длительное время получения результатов исследования (не менее 2 ч). Кроме того, тесты МД являются простым доказательством сенсibilизации, которое не содержит никакой информации об их клинической значимости. В конечном итоге только врач может оценить клиническую значимость полученных с помощью тестов *in vitro* результатов независимо от использования нативных экстрактов аллергенов или отдельных компонентов [25]. В таблице приведены доступные в Российской Федерации тест-системы, с помощью которых можно выявить IgE-Ат к отдельным аллергенным компонентам.

### Применение методов молекулярной диагностики для оценки эффективности аллерген-специфической иммунотерапии

Одним из направлений использования МД аллергии является индивидуальный подбор аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) пациентам, имеющим АЗ, обусловленные IgE-зависимой гиперчувствительностью. Методика АСИТ заключается в многократном введении аллергена в организм больного, начиная с пороговой дозы и постепенном повышении ее до хорошо переносимой. Коммерческие препараты аллергенов, используемые для АСИТ, представляют собой водно-солевые экстракты только природных аллергенов, в которых присутствуют в значительных количествах главные аллергенные компоненты. Их применяют в виде подкожных инъекций или сублингвальных форм (таблетки или капли). Эффективность АСИТ не вызывает вопросов, когда она проводится, например, пациентам, чувствительным к пыльце амброзии, поскольку главный аллергенный компонент амброзии Amb a 1 в 100 % случаев вызывает развитие АЗ [8, 26]. В случае сенсibilизации к клещам домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* показано, что АСИТ будет эффективна только у 80 % пациентов, поскольку в 20 % случаев АЗ вызвано минорными аллергенными компонентами, которые присутствуют в природном аллергенном экстракте в мизерных количествах. Соответственно, пациентам с АЗ, вызванными минорными аллергенными компонентами, рекомендовать АСИТ не следует [27].

Также показано, что эффективность АСИТ будет высокой для пациентов с аллергией на пыльцу березы в случае обнаружения сенсибилизации к мажорному аллергену Bet v 1. При наличии специфических IgE как к мажорному компоненту Bet v 1, так и к минорному компоненту Bet v 2 эффективность АСИТ будет средней, а при отсутствии IgE к мажорному аллергену Bet v 1 АСИТ будет малоэффективной [28].

Необходимо отметить, что в странах ЕС оценка количественного содержания аллергенных компонентов имеет рекомендательный характер [29], в Российской Федерации она рекомендована только для стандартных образцов аллергенов [30, 31]. Возможно, это связано с малой доступностью реагентов для выявления отдельных аллергенных компонентов, поскольку производством этих веществ и соответствующих моноклональных антител, необходимых для их выявления, занимаются только отдельные фирмы, которые имеют ограниченный выпуск такой продукции. В ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при разработке стандартных образцов аллергенов для количественной оценки отдельных компонентов используют коммерческие наборы фирмы INDOOR Biotechnologies [32]. В настоящий момент отсутствуют рекомендации по количественному содержанию в препаратах лечебных аллергенов аллергенных компонентов, необходимых для достижения терапевтического эффекта. Из всех зарегистрированных в Российской Федерации аллергенов, рекомендованных для АСИТ, только в нормативной документации препаратов фирмы «АЛК Абелло» предусмотрена количественная оценка главных аллергенных компонентов.

## ■ Литература

1. Хаитов Р.М. Аллергология и клиническая иммунология. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2019: 336 с.
2. Адо А.Д. Общая Аллергология : руководство для врачей. 2-е изд. Москва : Медицина, 197: 464 с.
3. Хутуева С.Х., Федосеева В.Н. Аллергенспецифическая иммунотерапия бронхиальной астмы. Москва : Экон, 2000: 252 с.
4. Ярилин А.А. Иммунология. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010: 752 с.
5. Бурместер Г.-Р., Пецутто А. Наглядная иммунология. Москва : Бином. Лаборатория знаний, 2014: 320 с.
6. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. Аллергология: Федеральные клинические рекомендации. Москва : Фармарус Принт Медиа, 2014: 126 с.
7. The World Allergy Organization; Oppenheimer J., Duram S., Nelson H., Wolthers O.D. Allergy Diagnostic Testing, 2014. URL: <https://www.worldallergy.org/education-and-programs/education/allergic-disease-resource-center/professionals/allergy-diagnostic-testing> (date of access June 23, 2020)
8. Lockey R.F., Ledford D.K. Allergens and Allergen Immunotherapy. Subcutaneous, Sublingua, and Oral. 5th ed. CRC Press, 2014: 576 p. DOI: <http://doi.org/10.1201/b16539>
9. Невская Л.В., Радунская С.Ф., Лавренчук Е.И., Мовсесянц А.А., Капитанова В.К., Короткова М.Ю. Применение иммуноанализа для решения актуальных задач стандартизации аллергенных препаратов. Биопрепараты. Профилактика, диагностика и лечение. 2015; (3): 17–20.
10. Bernstein I.L., Li J.T., Bernstein D.I. et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. Ann. Allergy Asthma Immunol. 2008; 100 (3): P. 1–148. DOI: [http://doi.org/10.1016/s1081-1206\(10\)60305-5](http://doi.org/10.1016/s1081-1206(10)60305-5)
11. Matricardi P.M., Kleine-Tebbe J., Hoffmann H.J. et al. EAACI Molecular allergology user's guide. Pediatr. Allergy Immunol. 2016; 27 (23): 1–250. <http://doi.org/DOI 10.1111/pai.12563>
12. Бала А.М., Клещенко А.Б., Чурсинова Ю.В. Современные возможности лабораторной аллергодиагностики. РМЖ. 2019; 1 (II): 56–61.
13. Павлов А.В., Сейлиева Н.А., Мухортых О.Ю., Стефанов В.Е. Получение и оценка свойств рекомбинантного аналога мажорного аллергена пыльцы березы Bet v 1. Российский аллергологический журнал. 2012; 3: 7–13.
14. Невская Л.В., Лавренчик Е.А., Жданова М.Ю. Аллергены на основе рекомбинантных белков. Иммунология. 2018; 39 (4): 239–42.
15. Lupinek C, Wollmann E, Baar A. Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: the MeDALL allergen-chip. Methods. 2014; 66: 106–19. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.10.008>
16. Alessandri C., Ferrara R., Bernardi M.L., Zennaro D., Tuppo L., Giangrieco I., Tamburrini M., Mari A., Ciardiello M.A. Diagnosing allergic sensitizations in the third millennium: why clinicians should know allergen molecule structures. Clin. Transl. Allergy. 2017; 7: 21. DOI: <http://doi.org/10.1186/s13601-017-0158-7>
17. Valenta R., Lidholm J., Niederberger V., Hayek B., Kraft D., Grönlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). Clin. Exp. Allergy. 1999; 29: 896–904. DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00653.x>
18. Kleine-Tebbe J, Jakob T. Molecular allergy diagnostics using IgE singleplex determinations: methodological and practical consideration for use in clinical routine – Part 18 of the Series

## Заключение

Таким образом, диагностика АЗ, обусловленных развитием АРНТ, основывается на выявлении комплекса аллерген–IgE–Ат. Для этого используются тесты как *in vivo* (в основном кожные пробы), так и *in vitro*. Кожные пробы просты в постановке, результат исследования известен через 20 мин. Однако для кожных проб имеется ряд противопоказаний, несоблюдение которых может спровоцировать нежелательные осложнения, в том числе и анафилактический шок. Тесты *in vitro* противопоказаний не имеют, и современные методы аллергодиагностики, основанные на выявлении отдельных компонентов аллергенного комплекса (REAST, аллгерочип), позволяют более точно установить причинно-значимый аллерген. В настоящее время МД не может заменить традиционные методы диагностики АЗ и в большинстве случаев рассматривается как подход третьей линии после клинического анамнеза и кожного тестирования. И хотя они более затратны по сравнению с кожными пробами, по их результатам можно оценить эффективность АСИТ, что приводит к существенному снижению стоимости лечения. Индивидуальный подбор препаратов аллергенов для АСИТ пока невозможен, поскольку оценка количественного содержания аллергенных компонентов в них имеет рекомендательный характер.

## Вклад авторов

Сбор и обработка материала – Невская Л.В., Капитанова В.К., Петрова Н.Э.; написание текста – Невская Л.В.; редактирование – Капитанова В.К., Петрова Н.Э.

Molecular Allergy. *Allergo J. Int.* 2015; 24: 185–97. DOI: <http://doi.org/10.1007/s40629-015-0067-z>

19. Allergome. The platform for allergen knowledge. URL: <http://www.allergome.org/index.php> (date of access June 23, 2020)

20. Saltabaeva U., Garib V., Morenko M. et al. Greater real-life diagnostic efficacy of allergen molecular-based diagnosis for prescription of immunotherapy in area with multiple pollen exposure. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2017; 173 (2): 93–8. DOI: <http://doi.org/10.1159/000477442>

21. Хайтов Р.М., Ильина Н.И. Аллергология и иммунология : национальное руководство. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2014: 656 с.

22. Mohapatra S.S., Lockey R.F., Polo F. Weed pollen allergens. *Clin. Allergy Immunol.* 2004; 18: 207–222. PMID: 18828502

23. Holm J., Baerentzen G., Gajhede M., Ipsen H., Larsen J.N., Lowenstein H., Wissenbach M., Spangfort M.D. Molecular basis of allergic cross-reactivity between group 1 major allergens from birch and apple. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2001; 756 (1–2): 307–13. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0378-4347\(01\)00089-5](http://doi.org/10.1016/s0378-4347(01)00089-5)

24. ThermoFisher Scientific ImmunoCAP Whole Allergen. URL: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/lab/wo/en/our-science/immunocap-assays/whole-allergens.html> (date of access June 18, 2020)

25. Kleine-Tebbe J., Jappe U. Molecular allergy diagnostic tests: development and relevance in clinical practice. *Allergol. Select.* 2017; 1 (2): 169–89. DOI: <http://doi.org/10.5414/ALX01617E>

## ■ References

1. Khaitov R.M. Allergy and clinical immunology. Moscow: GEOTAR-Media, 2019: 336 p. (in Russian)

2. Ado A.D. General allergy: a guide for doctors. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: Meditsina, 1978: 464 p. (in Russian)

3. Khutueva S.Kh., Fedoseeva V.N. Allergen-specific immunotherapy of bronchial asthma Moscow: Ekon, 2000: 252 p. (in Russian)

4. Yarin A.A. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media, 2010: 752 p. (in Russian)

5. Burmester G.-R., Petsutto A. Visual immunology. Moscow: Bionom. Laboratoriya znaniy, 2014: 320 p. (in Russian)

6. Khaitov R.M., Il'ina N.I. Allergy: Federal clinical recommendations. Moscow: Farmarus Print Media, 2014: 126 p. (in Russian)

7. The World Allergy Organization; Oppenheimer J., Duram S., Nelson H., Wolthers O.D. Allergy Diagnostic Testing, 2014. URL: <https://www.worldallergy.org/education-and-programs/education/allergic-disease-resource-center/professionals/allergy-diagnostic-testing> (date of access June 23, 2020)

8. Lockey R.F., Ledford D.K. Allergens and Allergen Immunotherapy. Subcutaneous, Sublingual, and Oral. 5th ed. CRC Press, 2014: 576 p. DOI: <http://doi.org/10.1201/b16539>

9. Nevskaya L.V., Radunskaya S.F., Lavrenchuk E.I., Movsesyants A.A., Kapitanova V.K., Korotkova M.Yu. Application of immunoassay for solving actual problems of standardization of allergenic preparations. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika i lechenie.* 2015; (3): 17–20. (in Russian)

10. Bernstein I.L., Li J.T., Bernstein D.I., et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2008; 100 (3): P. 1–148. DOI: [http://doi.org/10.1016/s1081-1206\(10\)60305-5](http://doi.org/10.1016/s1081-1206(10)60305-5)

11. Matricardi P.M., Kleine-Tebbe J., Hoffmann H.J., et al. EAA-CI Molecular allergy user's guide. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2016; 27 (23): 1–250. <http://doi.org/10.1111/pai.12563>

12. Bala A.M., Kleshchenko A.B., Chursinova Yu.V. Modern possibilities of laboratory allergodiagnosics. *RMZh.* 2019; 1 (II): 56–61. (in Russian)

13. Pavlov A.V., Seylieva N.A., Mukhorthykh O.Yu., Stefanov V.E. Obtaining and evaluating the properties of a recombinant analog of the major allergen of birch pollen Bet v 1. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal.* 2012; 3: 7–13. (in Russian)

14. Nevskaya L.V., Lavrenchik E.A., Zhdanova M.Yu. Allergens based on recombinant proteins. *Immuologiya.* 2018; 39 (4): 239–42. (in Russian)

15. Lupinek C, Wollmann E, Baar A. Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: the MeDALL allergen-chip. *Methods.* 2014; 66: 106–19. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.10.008>

16. Alessandri C., Ferrara R., Bernardi M.L., Zennaro D., Tuppo L., Giangrieco I., Tamburrini M., Mari A., Ciardiello M.A. Diagnosing allergic sensitizations in the third millennium: why clinicians should

26. Valenta R., Linhart B., Swoboda I., Niederberge V. Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy.* 2011; 66: 775–83. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02565.x>

27. Casset A., Mari A., Purohit A. Varying allergen composition and content affects the in vivo allergenic activity of commercial *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012; 159 (3): 253–62. DOI: <http://doi.org/10.1159/000337654>

28. Geroldinger-Simic M., Zelniker T., Aberer W., Ebner C., Egger C., Greiderer A. Birch pollen-related food allergy: clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127: 616–22. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.027>

29. European Pharmacopeia online. URL: <https://pheur.edqm.eu/home> (date of access June 30, 2020)

30. Государственная Фармакопея Российской Федерации. 14-е изд. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения: 03.07.2020)

31. Невская Л.В., Жданова М.Ю. Требования к качеству аллергенов в Российской Федерации. *Российский аллергологический журнал.* 2019; 16 (1, ч. 2): 105–7.

32. Indoor Biotechnologies. URL: <https://inbio.com/> (date of access June 30, 2020)

know allergen molecule structures. *Clin. Transl. Allergy.* 2017; 7: 21. DOI: <http://doi.org/10.1186/s13601-017-0158-7>

17. Valenta R., Lidholm J., Niederberger V., Hayek B., Kraft D., Grönlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin. Exp. Allergy.* 1999; 29: 896–904. DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00653.x>

18. Kleine-Tebbe J, Jakob T. Molecular allergy diagnostics using IgE singleplex determinations: methodological and practical consideration for use in clinical routine – Part 18 of the Series Molecular Allergy. *Allergo J. Int.* 2015; 24: 185–97. DOI: <http://doi.org/10.1007/s40629-015-0067-z>

19. Allergome. The platform for allergen knowledge. URL: <http://www.allergome.org/index.php> (date of access June 23, 2020)

20. Saltabaeva U., Garib V., Morenko M., et al. Greater real-life diagnostic efficacy of allergen molecular-based diagnosis for prescription of immunotherapy in area with multiple pollen exposure. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2017; 173 (2): 93–8. DOI: <http://doi.org/10.1159/000477442>

21. Khaitov R.M., Il'ina N.I. Allergy and immunology. National leadership. GEOTAR-Media, 2014: 656 p. (in Russian)

22. Mohapatra S.S., Lockey R.F., Polo F. Weed pollen allergens. *Clin. Allergy Immunol.* 2004; 18: 207–222. PMID: 18828502

23. Holm J., Baerentzen G., Gajhede M., Ipsen H., Larsen J.N., Lowenstein H., Wissenbach M., Spangfort M.D. Molecular basis of allergic cross-reactivity between group 1 major allergens from birch and apple. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2001; 756 (1–2): 307–13. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0378-4347\(01\)00089-5](http://doi.org/10.1016/s0378-4347(01)00089-5)

24. ThermoFisher Scientific ImmunoCAP Whole Allergen. URL: <https://www.thermofisher.com/diagnostic-education/lab/wo/en/our-science/immunocap-assays/whole-allergens.html> (date of access June 18, 2020)

25. Kleine-Tebbe J., Jappe U. Molecular allergy diagnostic tests: development and relevance in clinical practice. *Allergol. Select.* 2017; 1 (2): 169–89. DOI: <http://doi.org/10.5414/ALX01617E>

26. Valenta R., Linhart B., Swoboda I., Niederberge V. Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy.* 2011; 66: 775–83. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02565.x>

27. Casset A., Mari A., Purohit A. Varying allergen composition and content affects the in vivo allergenic activity of commercial *Dermatophagoides pteronyssinus* extracts. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012; 159 (3): 253–62. DOI: <http://doi.org/10.1159/000337654>

28. Geroldinger-Simic M., Zelniker T., Aberer W., Ebner C., Egger C., Greiderer A. Birch pollen-related food allergy: clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 127: 616–22. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.027>

29. European Pharmacopoeia online. URL: <https://pheur.edqm.eu/home> (date of access June 30, 2020)

30. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 14th ed. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (date of access July 3, 2020) (in Russian)

31. Nevskaya L.V., Zhdanova M.Yu. Requirements for the quality of allergens in the Russian Federation. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal*. 2019; 16 (1, ch 2): 105–7. (in Russian)

32. Indoor Biotechnologies. URL: <https://inbio.com/> (date of access June 30, 2020)

## Сведения об авторах

**Невская Лариса Валерьевна** – к.б.н., главный эксперт лаборатории иммунологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [Nevskaya@expmed.ru](mailto:Nevskaya@expmed.ru), <http://orcid.org/0000-0001-5371-8532>

**Капитанова Вера Константиновна** – эксперт 1-й категории лаборатории иммунологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [Kapitanova@expmed.ru](mailto:Kapitanova@expmed.ru), <http://orcid.org/0000-0001-8422-3452>

**Петрова Надежда Эдуардовна** – к.б.н., ведущий эксперт лаборатории иммунологии ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [petrovaNE@expmed.ru](mailto:petrovaNE@expmed.ru), <http://orcid.org/0000-0002-7333-1076>

## Authors' information

**Larisa V. Nevskaya** – PhD, Chief Expert of the Laboratory of Immunology of SCEEMP, MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [Nevskaya@expmed.ru](mailto:Nevskaya@expmed.ru), <http://orcid.org/0000-0001-5371-8532>

**Vera K. Kapitanova** – 1<sup>st</sup> Professional Category Expert of the Laboratory of Immunology of SCEEMP, MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [Kapitanova@expmed.ru](mailto:Kapitanova@expmed.ru), <http://orcid.org/0000-0001-8422-3452>

**Nadezhda E. Petrova** – PhD, Leading Expert of the Laboratory of Immunology of SCEEMP, MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [petrovaNE@expmed.ru](mailto:petrovaNE@expmed.ru), <http://orcid.org/0000-0002-7333-1076>

© Коллектив авторов, 2020

Балмасова И.П.<sup>1,2</sup>, Царев В.Н.<sup>1</sup>, Ющук Е.Н.<sup>1</sup>, Доровских А.С.<sup>1</sup>, Малова Е.С.<sup>2</sup>,  
Караков К.Г.<sup>3</sup>, Эльбекьян К.С.<sup>3</sup>, Арутюнов С.Д.<sup>1</sup>

## Заболевания пародонта и атеросклероз: микроэкологические, метаболические и иммунологические механизмы взаимосвязи

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127473, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 117198, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 355017, г. Ставрополь, Российская Федерация

### Резюме

Обзор содержит анализ литературных данных последних десятилетий, посвященный микроэкологическим, метаболическим и иммунологическим механизмам связи между заболеваниями пародонта и атеросклеротическим поражением сосудов. Показана роль липидного обмена и иммунных механизмов, подтвержденная современными представлениями о патогенезе атеросклероза. Обсуждена концепция о потенциальном значении инфекционных агентов как компонентов биопленки зубодесневой борозды в патогенезе атеросклероза с позиций данных последних лет о свойствах бактерий-персистеров. Представлены доказательства участия пародонтопатогенных бактерий в формировании атеросклеротических бляшек и рассмотрены механизмы такого участия. В итоге удалось показать, что одним из главных связующих компонентов для заболеваний пародонта и атеросклероза служит этиологический фактор, включающий способность пародонтопатогенных бактерий влиять на липидный обмен в тканях, проникать внутрь макрофагов, персистировать в кровотоке, участвовать в формировании пенистых клеток и атеросклеротических бляшек, влиять на прогрессирование атеросклеротического и аутоиммунного процесса.

**Ключевые слова:** заболевания пародонта; атеросклероз; пародонтопатогенные бактерии; системные эффекты; липидный обмен; иммунные механизмы

Статья поступила 28.04.2020. Принята в печать 16.06.2020.

**Для цитирования:** Балмасова И.П., Царев В.Н., Ющук Е.Н., Доровских А.С., Малова Е.С., Караков К.Г., Эльбекьян К.С., Арутюнов С.Д. Заболевания пародонта и атеросклероз: микроэкологические, метаболические и иммунологические механизмы взаимосвязи. Иммунология. 2020; 41 (4): 370–380. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-370-380>

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Balmasova I.P.<sup>1,2</sup>, Tsarev V.N.<sup>1</sup>, Yushchuk E.N.<sup>1</sup>, Dorovskikh A.S.<sup>1</sup>, Malova E.S.<sup>2</sup>,  
Karakov K.G.<sup>3</sup>, Elbekyan K.S.<sup>3</sup>, Arutyunov S.D.<sup>1</sup>

## Periodontal diseases and atherosclerosis: microecological, metabolic and immunological mechanisms of interconnection

<sup>1</sup> A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Ministry of Health of the Russian Federation, 127473, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Peoples' Friendship University of Russia, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 117198, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Stavropol State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 355017, Stavropol, Russian Federation

### Для корреспонденции

Балмасова Ирина Петровна –  
доктор медицинских наук,  
профессор, заведующая лабораторией  
патогенеза и методов лечения  
инфекционных заболеваний  
НИМСИ ФГБОУ ВО МГМСУ  
им. А.И. Евдокимова  
Минздрава России,  
Москва, Российская Федерация  
E-mail: [iri.balm@mail.ru](mailto:iri.balm@mail.ru)  
<https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

## Summary

The review provides an analysis of the literature of recent decades on microecological, metabolic and immunological mechanisms of the relationship between periodontal diseases and atherosclerotic vascular lesion. The role of lipid metabolism and immune mechanisms, confirmed by modern ideas about the pathogenesis of atherosclerosis, is shown. The concept of the potential significance of infectious agents as components of the dental sulcus biofilm in the pathogenesis of atherosclerosis is discussed from the standpoint of recent data on the properties of persistent bacteria. Evidence of the participation of periodontal pathogenic bacteria in the formation of atherosclerotic plaques is presented and the mechanisms of such participation are considered. The analysis of modern literature which is devoted to the significance of periodontal diseases in the development of systemic pathology on the example of atherosclerosis has shown that one of the main binding components in this case is an etiological factor, including the ability of periodontopathogenic bacteria to influence lipid metabolism in tissues, enter into macrophages, persist in the bloodstream, participate in the formation of foam cells and atherosclerotic plaques, and influence the progression of the atherosclerotic process.

**Keywords:** periodontal diseases, atherosclerosis; periodontopathogenic bacteria; systemic effects; lipid metabolism; immune mechanisms

**Received** 28.04.2020. **Accepted** 16.06.2020.

**For citation:** Balmasova I.P., Tsarev V.N., Yushchuk E.N., Dorovskikh A.S., Malova E.S., Karakov K.G., Elbekyan K.S., Arutyunov S.D. Periodontal diseases and atherosclerosis: microecological, metabolic and immunological mechanisms of interconnection. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 370–80. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-370-380> (in Russian)

**Funding.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

## For correspondence

Irina P. Balmasova –  
MD, Professor,  
Head of Pathogenesis  
and Treatment Methods  
of Infectious Diseases Laboratory  
of MDRI,  
A.I. Evdokimov Moscow State University  
of Medicine and Dentistry,  
Ministry of Health  
of the Russian Federation,  
Moscow, Russian Federation  
E-mail: [iri.balm@mail.ru](mailto:iri.balm@mail.ru)  
<https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

## Введение

В литературе последних лет появляется все больше свидетельств того, что сердечно-сосудистые заболевания и заболевания пародонта инфекционно-воспалительной природы часто ассоциированы между собой и, возможно, причинно связаны [1, 2].

Пародонтит – это широко распространенное среди населения Земли хроническое инфекционное заболевание опорных тканей зубов. Этиология заболевания тесно связана с колонизацией тканей пародонта сложной ассоциацией анаэробных грам-отрицательных бактерий [3, 4], хотя грам-положительные бактерии также составляют значительный компонент субгингивальной биопленки и могут быть причинно связаны с заболеваниями пародонта [4, 5]. Последующая воспалительная реакция ответственна за медленную прогрессирующую деграцию периодонтальной связки и альвеолярной кости, зубы при этом становятся подвижными и в конечном итоге выпадают [6].

Многочисленные научные исследования говорят о том, что риск возникновения инфекционно-воспалительных заболеваний пародонта связан с общим иммунным статусом, наличием общесоматических заболеваний, генетической предрасположенностью, неудовлетворительным состоянием гигиены ротовой полости [7]. Все это непосредственно отражается на местном иммунном статусе полости рта, поскольку все формы воспалительных заболеваний пародонта протекают на фоне прогрессирующих в нем патологических изменений [8]. В свою очередь поражение пародонта по

мере прогрессирования служит фактором риска многочисленных системных заболеваний, среди которых одно из ведущих мест занимает патология сердечно-сосудистой системы, в первую очередь – атеросклероз [1, 9].

Атеросклероз – это хроническое воспалительное заболевание, характеризующееся субэндотелиальным накоплением воспалительных клеток и липидов, которые в совокупности способствуют развитию системного патологического процесса с формированием атеросклеротических бляшек в стенке сосудов при высоком риске их разрушения и распространением атеросклеротических поражений по кровеносному руслу [10]. К настоящему времени сложилось четкое представление об атеросклерозе как о многофакторном заболевании, в основе которого лежит сочетание нарушений биохимических, иммунологических и молекулярно-генетических процессов. В атерогенез вовлекается сложный комплекс взаимодействий между сосудистой стенкой, форменными элементами крови, растворенными в ней биологически активными веществами и локальным нарушением кровотока [11].

Современная гипотеза об эпидемиологической связи между сердечно-сосудистыми заболеваниями и пародонтитом базируется на представлении о том, что воспаленные ткани пародонта служат входными воротами для проникновения микроорганизмов в кровоток и отдаленные органы [12]. Эта гипотеза основана на том факте, что бактерии из полости рта были идентифицированы в атеросклеротических бляшках [13]. Кроме того, известно, что эндотоксины грам-отрицательных бактерий могут усиливать воспалительные процессы

при атеросклеротических поражениях [14]. Это приводит к увеличению вероятности разрыва атеросклеротической бляшки и образованию тромба, а следовательно, к ишемии в дистальных тканях [1].

**Цель** данного обзора – анализ литературы последних лет по микробиологическим и иммунологическим механизмам связи между заболеваниями пародонта и атеросклеротическим поражением сосудов.

### Современные взгляды на метаболические и иммунные механизмы развития атеросклероза

На протяжении многих десятилетий одним из наиболее четко определенных патогенетически значимых факторов атеросклероза считалось диетическое ожирение, поскольку признано, что пищевые жиры активируют воспалительные и иммунные пути, усиливают адгезию лейкоцитов и способствуют развитию эндотелиальной дисфункции, связанной с прогрессированием атеросклероза [15]. Ключевые события в этом контексте связаны с накоплением холестерина, включая липопротеины низкой плотности (ЛПНП), в том числе аполипопротеина В [16] в интима крупных и средних артерий.

Этот процесс выглядит следующим образом. Вначале происходит модификация ЛПНП путем их окисления, затем их фагоцитоз макрофагами, которые превращаются за счет очень высокого содержания холестерина эфиров в так называемые пенистые клетки с их последующим накоплением в субэндотелиальном пространстве [17]. Для поглощения липидов у макрофагов имеются специальные рецепторы, такие как рецептор-мусорщик класса А (SR-A) и молекулы CD36, опосредующие интернализацию окисленных ЛПНП, что и приводит к отложению холестерина в клетках [17]. Описанные процессы уравниваются наличием в макрофагальных клетках обратных транспортеров холестерина, включая SR-BI, АТФ-связывающие транспортеры А1 и G1 (ABCA1 и ABCG1), ответственных за выведение холестерина [18]. Защитную противоатерогенную функцию по выводу свободного холестерина могут выполнять липопротеины высокой плотности (ЛПВП) и их главные компоненты – аполипопротеины А1 и Е, которые влияют на процессы окислительной модификации ЛПНП [16].

В случае неблагоприятного развития событий в стенке сосудов происходит непрерывный рост жировых инфильтратов, богатых воспалительными лейкоцитами, которые макроскопически принимают вид атеросклеротических бляшек [19]. Во время прогрессирования атеросклероза эндотелиальные клетки, макрофаги и гладкомышечные клетки сосудистой стенки погибают в результате апоптоза или некроза. Распад пенистых и потеря гладкомышечных клеток могут иметь пагубные последствия, приводя к образованию богатого липидами ядра и хрупкого склонного к разрыву фиброзного колпачка [20]. Богатое липидами ядро бляшки представляет собой аваскулярную, гипоцеллю-

лярную, мягкую кашицу, полностью лишенную поддерживающего коллагена [19]. Клеточный апоптоз вносит значительный вклад в высокую активность тканевого фактора и тромбогенность атероматозного ядра [21]. Термин «разрыв бляшки» используют для обозначения бляшки с глубоким повреждением и реальным дефектом в фиброзном колпачке, который отделяет богатое липидами атероматозное ядро от текущей крови, обнажая тромбогенное ядро бляшки с последующим тромбозом артерий – причиной инвалидности или летального исхода [22].

К настоящему времени многие представления об этиопатогенезе атеросклероза дополнились новыми сведениями, и уже с середины 2000-х гг. атеросклероз стали рассматривать как хроническое воспалительное заболевание [10]. Дело в том, что окислительные модификации, которым подвергаются ЛПНП в интима сосудов, способствующие поглощению их макрофагами, происходят под действием активных форм кислорода, накапливаемых вследствие окислительного стресса [23]. Кроме того, окисленные фосфолипиды сами по себе вызывают воспаление артериальной стенки, связываясь с Toll-подобными рецепторами (TLRs), которые опосредуют провоспалительные сигналы [24]. Клинически важным следствием холестериневой нагрузки макрофагов с образованием пенистых клеток является формирование внутриклеточных холестеринных микрокристаллов, активирующих инфламмасому – молекулярный комплекс, состоящий из цитозольно-нуклеотид-связывающих доменов – продуктов повторяющихся генов (NLRP3), превращающих про-интерлейкин(ИЛ)-1 $\beta$  в его биологически активную форму, которая, обладая провоспалительными свойствами, усиливает экспрессию многих других провоспалительных цитокинов [25].

По мере накопления в очаге поражения сосудистой стенки клеток миелоидного ряда происходит инфильтрация тканей клетками адаптивного иммунного ответа – В- и Т-лимфоцитами [26]. Примечательно, что рост в бляшке миелоидных клеток и лимфоцитов коррелирует с клиническими осложнениями и может predispose к будущим тромбозам, вызванным крупными клеточными инфильтратами с тонким фиброзным колпачком («нестабильная бляшка») [27]. Наличие Т- и В-лимфоцитов в составе нестабильных бляшек привело к появлению гипотезы о том, что атеросклероз включает аутоиммунный ответ [19].

Из всех кандидатов на роль аутоантигенов наиболее признаны в настоящее время ЛПНП и их основной белок аполипопротеин В, которые демонстрируют самую сильную клиническую и причинно-следственную связь с атеросклерозом у человека. Аутоиммунное значение этих субстанций подтверждено и в эксперименте, при этом показано, что направленный на них аутоиммунный ответ выполняет атеропротекторную функцию [19]. Помимо ЛПНП/аполипопротеина В, иммунные реакции, сопутствующие атероскле-

розу, могут вызывать собственные белки теплового шока [28], а также целый ряд чужеродных инфекционных агентов [29].

Что касается категорий лимфоцитов, играющих наиболее значимую роль в иммунном ответе, в настоящее время подчеркивается, что атеросклероз – это Th1-зависимая болезнь, т. е. основными иммунопатогенетически значимыми клетками являются Т-хелперы 1-го типа (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), которые продуцируют в атеросклеротической бляшке такие цитокины, как ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-3, фактор некроза опухолей  $\alpha$  и лимфотоксин, могут активировать макрофаги, Т-клетки и другие компоненты бляшки, тем самым усугублять воспалительный ответ данной локализации [30]. Контроль количественно содержания Th1-клеток обычно осуществляют регуляторные Т-клетки (Трег, CD3<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), но в случае атеросклероза обычно отмечают нестабильность этой субпопуляции [31], обусловленную повышенным метилированием локуса *FOXP3* [32]. В результате в атеросклеротической бляшке нарастают реакции продуктивного воспаления по типу Th1-обусловленной гиперчувствительности замедленного типа на фоне сниженной способности подавлять активность этих реакций. С одной стороны, это приводит к деградации аутоантигенов липопротеиновой природы, играющих ведущую роль в формировании атеросклеротической бляшки, а с другой – ослабление контроля этого процесса со стороны Трег может способствовать разрыву атеросклеротической бляшки со всеми нежелательными последствиями.

Роль В-лимфоцитов при атеросклерозе также неоднозначна. Дело в том, что в составе атеросклеротических бляшек обнаруживают как В1-, так и В2-субпопуляции этих клеток. В1 характеризуются полиспецифичностью и продуцируют преимущественно IgM, взаимодействующие при атеросклерозе со специфичными к окислению неозэпитопами на ЛПНП, что придает им атеропротекторные функции. IgG-антитела против аполипротеина В, продуцируемые В2-лимфоцитами, наоборот, проявляют преимущественно проатерогенный эффект [19], возможно, связанный с активацией макрофагальных функций.

Таким образом, процессы, протекающие при атеросклерозе в стенке крупных и средних сосудов и проявляющиеся формированием атеросклеротических бляшек, тесно связаны с изменениями липидного метаболизма при особой патогенетической роли макрофагов и лимфоцитов. Однако в контексте данного обзора отдельного внимания заслуживают пусковые факторы атеросклеротических сдвигов и вопросы предрасположенности к ним с позиций взаимосвязи заболеваний пародонта и атеросклероза.

Как для сердечно-сосудистых заболеваний, так и для пародонтита широко признается наличие генетической предрасположенности. Более того, имеются данные об общем генетическом фоне для атеросклероза и пародонтита [33]. В частности, оба заболевания могут быть связаны генетически обусловленным гиперреак-

тивным воспалительным признаком или генетически обусловленным отсутствием надлежащего контроля иммунных реакций в отношении бактерий или их компонентов, таких как эндотоксин (липополисахарид, ЛПС). Используя биоинформационный подход, К.М. Hettne и соавт. [1] доказали существование подобной взаимосвязи, а это, в свою очередь, делает актуальным вопрос об особой роли грам-отрицательных микроорганизмов в пусковых механизмах обоих заболеваний. И если этиологическая роль последних при заболеваниях пародонта инфекционно-воспалительной природы сомнений не вызывает, то при атеросклерозе возможность участия пародонтопатогенных бактерий в качестве триггера атеросклеротического процесса нуждается в особом обсуждении.

### Бактерии-персистеры и микрoэкологические проблемы развития атеросклероза

По мере изучения атеросклероза у исследователей укреплялось мнение, что, помимо традиционных факторов риска, включающих гиперлипидемию, курение, ожирение и диабет, формированию заболевания способствуют хронические инфекции [34]. Одними из первых возбудителей хронических инфекционных процессов в этом качестве были описаны респираторный патоген *Chlamydia pneumoniae* и пародонтальный патоген *Porphyromonas gingivalis*. Оба микроорганизма были обнаружены в атеросклеротических бляшках, и оба они способствовали развитию атеросклероза в моделях заболевания на мышах, оба индуцировали образование пенных клеток из макрофагов *in vitro*, хотя и значительно отличались друг от друга по свойствам и биологической нише [35–37]. Помимо указанных микроорганизмов, кандидатами на присутствие в атеросклеротических бляшках и запуск атеросклеротического процесса считают *Helicobacter pylori*, еще один пародонтопатоген *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и некоторые другие бактерии, а также вирусы [38]. Все эти возбудители могут влиять на прогрессирование атеросклеротической бляшки либо путем ее колонизации, либо опосредованным путем, провоцируя воспалительные реакции в стенках сосудов, предрасполагая к разрыву бляшек и образованию тромба.

Остается открытым вопрос о механизмах включения в первую очередь грам-отрицательных бактерий в атеросклеротический процесс. С этой точки зрения особого внимания заслуживает привлекающее в последние годы исследователей учение о бактериях-персистерах. Персистеры первоначально были описаны J.W. Bigger [39] в 1944 г., но детальное исследование клеточно-молекулярных механизмов их формирования произошло только в последнее десятилетие.

Установлено, что все патогенные микроорганизмы производят небольшую субпопуляцию спящих персистирующих клеток, которые обладают временной высокой устойчивостью к уничтожению антибиотиками. Как только концентрация антибиотика падает, выжившие персистеры восстанавливают популяцию, вызывая

рецидив хронической инфекции. Следует подчеркнуть, что персистеры – это дремлющие фенотипические варианты обычных бактериальных клеток, а не мутанты. Персистеры особенно важны в условиях, когда патоген защищен от иммунной системы биопленками, или в местах, где влияние иммунных компонентов ограничено – в нервной системе, желудке или внутри макрофагов [40, 41]. Исследование персистеров на примере кишечной палочки показало, что в этих случаях формируется транскриптом, который указывает на дремлющий фенотип и характеризуется понижением регуляции энергопроизводящих и биосинтетических функций. При этом основной механизм образования персистеров включает формирование токсин-антитоксиновых модулей. Токсины вызывают спячку бактериальной клетки, например, путем расщепления мРНК. Токсин HrpA ингибирует трансляцию путем фосфорилирования фактора удлинения Ef-Tu [41]. Одной из причин перехода бактерий в состояние персистера является также их стрессовая реакция (SOS), в частности на факторы, повреждающие ДНК, – ультрафиолетовые лучи, химические агенты, ДНК-повреждающие антибиотики. В этих случаях при участии SOS-генов образуется особый мембранный токсин TisB, который снижает электрический потенциал мембран и уровень АТФ в клетке. В результате формируются «спящий» фенотип бактерий с временной множественной лекарственной устойчивостью [42].

Сочетание таких свойств персистеров, как их образование в составе биопленки или внутри макрофагов позволяет высказать предположение, что это и есть тот механизм, который способствует формированию бактерий-персистеров из состава пародонтопатогенной микрофлоры, которые выйдя из состава биопленки зубодесневой борозды и распространяясь по организму внутри макрофагов, приводят к различным системным патологическим процессам, в том числе к атеросклерозу.

### Пародонтопатогенные бактерии как связующее звено заболеваний пародонта и атеросклероза

Среди многочисленных патогенов пародонта, участвующих в возникновении и/или развитии сердечно-сосудистых заболеваний, особая роль принадлежит *Porphyromonas gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans*. К настоящему времени только эти два пародонтопатогена обнаружены в атеросклеротических бляшках на уровне присутствия их молекулярных компонентов, а в жизнеспособном виде [43].

В контексте избранного нами подхода к проблеме особого интереса заслуживает связь между заболеваниями пародонта, этиологически обусловленными *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans*, и сложными механизмами формирования атеросклеротических бляшек с участием метаболических инфекционно-воспалительных и аутоиммунных процессов.

Участие грам-отрицательного анаэроба *P. gingivalis* в развитии и прогрессировании атеросклероза у человека подтверждено на животных. Во многих исследованиях, изучающих механизмы, ответственные за развитие атеросклероза в условиях питания с высоким содержанием жиров или инфекции *P. gingivalis*, использовались мыши, дефицитные по аполипопротеину E (ApoE<sup>-/-</sup>), у которых гиперхолестеринемия в пять раз выше, чем у штамм-совместимых контрольных животных, и спонтанно развивается умеренная степень атеросклероза в аорте при отсутствии дополнительных стимулов. Формирование атеросклеротических бляшек значительно увеличивается у ApoE<sup>-/-</sup>-мышей при развитии инфекционного поражения полости рта с участием *P. gingivalis* [44].

Было показано, что *P. gingivalis*, помимо этиологической роли в развитии пародонтита, с участием своего липополисахарида (ЛПС) способен оказывать также ряд атерогенных эффектов при сердечно-сосудистых заболеваниях. Например, ЛПС *P. gingivalis* запускает секрецию воспалительных цитокинов и способствует адгезии мононуклеарных клеток к эндотелию сосудов [45]. С одной стороны, многие исследования показали, что ЛПС, выделенные из *P. gingivalis*, активируют макрофаги и способствуют их превращению в пенистые клетки, а с другой – механизм образования пенистых клеток макрофагального происхождения с участием *P. gingivalis* вызывает еще очень много вопросов, и только единичные исследования демонстрируют попытку продвинуться в этом направлении. Например, L. Lei и соавт. [46] сообщили, что ЛПС-индуцированное образование пенистых клеток с участием *P. gingivalis* может быть опосредовано усиленной активацией сигнальных путей ядерного фактора-кВ (NF-кВ) и окислительной модификацией ЛПНП. X.Y. Li и соавт. [47] показали способность ЛПС *P. gingivalis* усиливать экспрессию CD36 и ослаблять транспорт холестерина из клетки с участием молекул ABCA1. Этот процесс осуществляется с участием фермента гем-оксигеназы-1, т. е. тесно связан с участием гемина, влияющего на преобладание различных по своей биологической активности изоформ ЛПС у *P. gingivalis*.

Описан и генетический механизм ЛПС-зависимой связи между пародонтитом и атеросклерозом. Речь идет об особом семействе ферментов – параоксоназах (PON), обладающих широкой специфичностью и каталитической универсальностью. В настоящее время открыты три представителя семейства – PON1, PON2, PON3. PON1 связаны с ЛПВП и циркулируют в плазме крови. Их основные функции – предотвращение окисления липопротеинов, уменьшение образования липидных пероксидов и снижение риска развития атеросклероза [48]. Обнаружено, что развитие заболеваний пародонта может быть связано с генетическими полиморфизмами в гене *PON1*, что приводит к повышению уровня окисленных ЛПНП, а впоследствии способствует образованию пенистых клеток и атеросклеротических бляшек на стенках сосудов. Более того,

К.М. Hettne и соавт. [1] показали, что PON1 может связывать пародонтит с атеросклерозом преимущественно ЛПС-зависимым образом.

Определенная роль в механизмах атеросклеротических изменений, индуцированных *P. gingivalis*, принадлежит гингипаинам этих бактерий. Было показано, что протеолитическая активность, обусловленная гингипаинами, способствует продукции агрегированных форм ЛПНП, приводящих к образованию пенистых клеток-макрофагов в процессе формирования атеросклеротической бляшки [49].

Огромное значение в реализации системных эффектов *P. gingivalis* придается их свойству длительного внутриклеточного выживания в макрофагах. Способность *P. gingivalis* к опосредованному липидным рафтом поглощению и внутриклеточной персистенции рассматривается в настоящее время в контексте эпидемиологической и механистической связи между пародонтитом и системными заболеваниями в целом и атеросклерозом в частности [50]. Вполне возможно, что присутствие жизнеспособного *P. gingivalis* внутри макрофагов может быть достаточным для того, чтобы позволить этому микроорганизму использовать миграционный потенциал макрофагов, способствуя перемещению в другие ткани и инфицированию других клеток, менее устойчивых к инвазии (например, эндотелиальных клеток) [51].

Наличие аутоиммунного компонента при атеросклерозе, индуцированном *P. gingivalis*, также подтверждает наличие связи между бактериальной инфекционной нагрузкой и атерогенезом, модулируемой с помощью естественного IgM, направленного против кросс-реактивных эпитопов бактерий и модифицированных ЛПНП [52].

Роль *A. actinomycetemcomitans*, этиологически связанного с воспалением пародонта в развитии атеросклеротических изменений, также подтверждена в эксперименте: эта бактерия индуцирует развитие атеросклероза у мышей с дефицитом аполипопротеина E. Полученные результаты свидетельствуют о том, что *A. actinomycetemcomitans* способствует нарушению липопротеинового профиля, воспалительной реакции и ремоделированию матрикса, которые, как известно, способствуют развитию атеросклероза [53]. Другая экспериментальная модель подтвердила, что системная инфекция *A. actinomycetemcomitans* активирует связанные с воспалением биологические пути и модулирует клеточный липидный гомеостаз, а неблагоприятные изменения в жировой ткани при хронической инфекции могут способствовать развитию атеросклероза [54]. Было показано, что ЛПС *A. actinomycetemcomitans* играет важную роль в формировании пенистых клеток стимулированными ЛПНП макрофагами [55]. Что касается проатерогенного потенциала *A. actinomycetemcomitans* в целом, то он очень тесно связан с ЛПС этих бактерий, может зависеть от инфицирующего штамма и коррелировать с пародонтопатогенным потенциалом возбудителя [56].

Изучалась инвазивная способность *Fusobacterium nucleatum* в инициации и прогрессировании атеросклероза с использованием модели хронической десневой инфекции ApoE-дефицитных мышей (ApoE<sup>-/-</sup>). Было установлено, что *F. nucleatum* колонизирует ротовую полость мыши, распространяется гематогенно и модулирует местный иммунный ответ в аорте. Однако *F. nucleatum* не вызывает сильной воспалительной реакции или развития атеросклеротического поражения, а скорее регулирует системные изменения в организме-хозяине, приводящие к позднему снижению прогрессирования бляшки [57].

В одном из экспериментальных исследований удалось выделить жизнеспособные *T. denticola* и *F. nucleatum* из сердец и аорт мышей через 2 нед после окончания пародонтальной инфекции, что указывает на то, что бактерии долго выживали у мышей, хотя нельзя сказать, были ли бактерии внутри ткани сосуда, прилипли к стенкам сосуда или переносились с током крови, попавшей в органы при их извлечении [58].

Отмечена проатерогенная роль и такого пародонтопатогена как *Tannerella forsythia*, хотя его прямое участие в формировании атеросклеротических бляшек пока не подтверждено. Было показано только, что в эксперименте эти бактерии с помощью их адгезионных молекул VspA способствуют образованию пенистых клеток и способны ускорять прогрессирование атеросклеротических поражений у мышей с генотипом ApoE<sup>-/-</sup> через влияние на липидный метаболизм [59]. S.S. Chukralli и соавт. [60] показали, что, несмотря на повышенные факторы риска прогрессирования атеросклероза, моноинфекция *T. forsythia* не увеличивала рост бляшек в аорте мышей ApoE<sup>-/-</sup>. Авторы предполагают, что в составе микробного сообщества биопленок *T. forsythia* является более патогенной и только в этом случае может способствовать развитию атеросклеротических бляшек, при этом у человека роль *T. forsythia* или любого отдельного вида бактерий полости рта в атерогенезе может быть менее важной, чем его вклад в патогенез в составе микробного сообщества.

Таким образом, пародонтопатогенная микрофлора, вне всякого сомнения, принимает участие в формировании атеросклеротических изменений в сосудистой стенке. Роль представителей отдельных видов бактерий из группы пародонтопатогенов в проатеросклеротических эффектах неравнозначна, тем не менее, наличие последних доказывает несомненную связь между заболеваниями пародонта и атеросклерозом.

## Заключение

Стоматологические заболевания на протяжении многих десятилетий и даже столетий считались совершенно отдельной областью медицины, мало связанной с соматической патологией. Однако современные научные достижения в этой области показали, что заболевания ротовой полости и других систем организма характеризуются неразрывной общностью этиопатогенетических взаимосвязей, что лишней раз показывают данные

этого обзора на примере анализа соответствия между заболеваниями пародонта и системным атеросклеротическим процессом. Эта категория взаимосвязей чрезвычайно многогранна, она касается сдвигов липидного обмена и иммунологических изменений, сопутствующих механизмам развития таких, на первый взгляд, далеких по своему патогенезу заболеваний. Однако главный связывающий компонент – это этиологический фактор, представленный пародонтопатогенными бактериями, совершающими путь от биопленки зубодесневой борозды и местного внутриклеточного проникновения в макрофаги при пародонтите до циркуляторного русла и системного поражения сосудов атеросклеротическим процессом. Многие механизмы подобной персистенции

еще неясны, но их наличие сомнений уже не вызывает, что открывает путь для разработки новых способов борьбы с системной патологией, столь значительно влияющей на здоровье и продолжительность жизни населения нашей планеты.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Балмасова И.П., Царев В.Н., Ющук Е.Н., Арутюнов С.Д.; сбор и обработка материала – Доровских А.С., Малова Е.С., Караков К.Г., Эльбекьян К.С.; написание текста – Балмасова И.П., Царев В.Н.; редактирование – Арутюнов С.Д., Ющук Е.Н.

### Литература

- Hettne K.M., Weeber M., Laine M.L., Cate H., Boyer S., Kors J.A., Loos B.G. Automatic mining of the literature to generate new hypotheses for the possible link between periodontitis and atherosclerosis: Lipopolysaccharide as a case study. *J. Clin. Periodontol.* 2007; 34 (12): 1016–24. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01152.x>
- Spahr A., Klein E., Khuseyinova N., Boeckh C., Muche R., Kunze M., Rothenbacher D., Pezeshki G., Hoffmeister A., Koenig W. Periodontal infections and coronary heart disease: role of periodontal bacteria and importance of total pathogen burden in the Coronary Event and Periodontal Disease (CORODONT) study. *Arch. Intern. Med.* 2006; 166 (5): 554–9. DOI: <https://doi.org/10.1001/archinte.166.5.554>
- Николаева Е.Н., Царёв В.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии – индикаторы риска возникновения и развития пародонтита (часть 2). *Стоматология для всех.* 2011; (4): 4–7.
- Царев В.Н. Микробиология, вирусология, иммунология. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. С. 34–45.
- Balmasova I.P., Tsarev V.N., Arutyunov S.D., Babayev E.A., Gabibov A.G. Filifactor alocis as an etiotropic agent in periodontal diseases. *Acta Sci. Med. Sci.* 2019; 3 (5): 6–12.
- Локтионов А.Л., Коноплин А.И., Лунев М.А., Караулов А.В. Имунные и окислительные нарушения в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта. *Иммунология.* 2015; 36 (5): 319–28.
- Костригина Е.Д., Зюлькина Л.А., Иванов П.В. Современный взгляд на этиопатогенез пародонтита (обзор литературы). *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.* 2017; 3 (43): 118–28. DOI: <https://doi.org/10.21685/2072-3032-2017-3-13>
- Cekici A., Kantarci A., Hasturk H., Van Dyke T.E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000.* 2014; 64 (1): 57–80. DOI: <https://doi.org/10.1111/prd.12002>
- Цепов Л.М., Николаев А.И., Цепова Е.Л., Цепов А.Л. Патология пародонта при системных заболеваниях. *Маэстро стоматологии.* 2009; (1): 64–7.
- Shaik-Dasthagirisaheb Y.B., Mekasha S., He X., Gibson D.C., III, Ingalls R.R. Signaling events in pathogen-induced macrophage foam cell formation. *Pathog. Dis.* 2016; 74 (6): ftw074. DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw074>
- Аронов Д.М., Лупанов В.П. Некоторые аспекты патогенеза атеросклероза. *Атеросклероз и дислипидемии.* 2011; 1 (2): 48–56.
- Loos B.G., John R.P., Laine M.L. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J. Clin. Periodontol.* 2005; 32 (6): 159–79. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00806.x>
- Fiehn N.E., Larsen T., Christiansen N., Holmstrup P., Schroeder T.V. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J. Periodontol.* 2005; 76 (5): 731–6. DOI: <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.5.731>
- Tabrizi F., Buhlin K., Gustafsson A., Klinge B. Oral health of monozygotic twins with and without coronary heart disease: a pilot study. *J. Clin. Periodontol.* 2007; 34 (3): 220–5. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.01041.x>
- Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352 (16): 1685–95. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra043430>
- Чумакова Г.А., Гриценко О.В., Веселовская Н.Г., Вахромеева Е.В., Козаренко А.А. Клиническое значение аполипопротеинов А и В. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2011; (6): 105–11.
- Li A.C., Glass C.K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat. Med.* 2002; 8 (11): 1235–42. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm1102-1235>
- Cheng L.C., Su K.H., Kou Y.R., Shyue S.K., Ching L.C., Yu Y.B., Wu Y.L., Pan C.C., Lee T.S.  $\alpha$ -Lipoic acid ameliorates foam cell formation via liver X receptor  $\alpha$ -dependent upregulation of ATP-binding cassette transporters A1 and G1. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50 (1): 47–54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.706>
- Wolf D., Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis. *Circ. Res.* 2019; 124 (2): 315–27. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313591>
- Geng Y.J., Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler. Thromb. Biol.* 2002; 22 (9): 1370–80. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000031341.84618.a4>
- Tedgui A., Mallat Z. Apoptosis as a determinant of atherothrombosis. *Thromb. Haemostasis.* 2001; 86 (1): 420–6.
- Schaar J.A., Muller J.E., Falk E., Virmani R., Fuster V., Seruys P.W., Colombo A., Stefanadis C., Casscells S.W., Moreno P.R., Maseri A., van der Steen A.F.W. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. *Eur. Heart J.* 2004; 25 (12): 1077–82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ehj.2004.01.002>
- Ley K., Miller Y.I., Hedrick C.C. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31 (7): 1506–16. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221127>
- Curtiss L.K., Tobias P.S. Emerging role of toll-like receptors in atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 2009; 50 (suppl): 340–5. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.R800056-JLR200>
- Duewell P., Kono H., Rayner K.J., Sirois C.M., Vladimer G., Bauernfeind F.G., Abela G.S., Franchi L., Nuñez G., Schnurr M., Espevik T., Lien E., Fitzgerald K.A., Rock K.L., Moore K.J., Wright S.D., Hornung V., Latz E. Nlrp3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* 2010; 464 (7293): 1357–61. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08938>
- Winkels H., Ehinger E., Vassallo M., Buscher K., Dinh H.Q., Kobiyama K., Hamers A.A.J., Cochain C., Vafadarnejad E., Saliba A.E., Zernecke A., Pramod A.B., Ghosh A.K., Anto Michel N., Hoppe N., Hilgendorf I., Zirluk A., Hedrick C.C., Ley K., Wolf D. Atlas of the immune cell repertoire in mouse atherosclerosis defined by single-cell rna-sequencing and mass cytometry. *Circ. Res.* 2018; 122 (12): 1675–88. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312513>

27. Finn A.V., Nakano M., Narula J., Kolodgie F.D., Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30 (7): 1282–92. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179739>
28. Wick G., Jakic B., Buszko M., Wick M.C., Grundtman C. The role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 2014; 11 (9): 516–29. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.91>
29. Pothineni N.V.K., Subramany S., Kuriakose K., Shirazi L.F., Romeo F., Shah P.K., Mehta J.L. Infections, atherosclerosis, and coronary heart disease. *Eur. Heart J.* 2017; 38 (43): 3195–201. DOI: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx362>
30. Robertson A.K., Hansson G.K. T cells in atherogenesis: For better or for worse? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26 (11): 2421–32. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000245830.29764.84>
31. Пылаева Е.А., Потехина А.В., Балахонина Т.В., Рулева Н.Ю., Масенко В.П., Ноева Е.А., Красникова Т.Л., Арефьева Т.И. Эффекторная и регуляторная субпопуляция лимфоцитов крови у пациентов с атеросклерозом сонных артерий. *Иммунология.* 2015; 36 (1): 38–44.
32. Jia L., Zhu L., Wang J.Z., Wang X.J., Chen J.Z., Song L., Wu Y.J., Sun K., Yuan Y.Z., Hui R. Methylation of foxp3 in regulatory T cells is related to the severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2013; 228 (2): 346–52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.027>
33. Mattila K.J., Pussinen P.J., Paju S. Dental infections and cardiovascular diseases: a review. *J Periodontol.* 2005; 76 (11 suppl): 2085–8. DOI: <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.11-S.2085>
34. Elkind M.S. Infectious burden: a new risk factor and treatment target for atherosclerosis. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2010; 10 (2): 84–90. DOI: <https://doi.org/10.2174/187152610790963519>
35. Maekawa T., Takahashi N., Tabeta K., Aoki Y., Miyashita H., Miyauchi S., Nakajima T., Yamazaki K. Chronic oral infection with *Porphyromonas gingivalis* accelerates atheroma formation by shifting the lipid profile. *PLoS One.* 2011; 6 (5): e20240. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020240>
36. Di Pietro M., Filardo S., De Santis F., Sessa R. Chlamydia pneumoniae infection in atherosclerotic lesion development through oxidative stress: a brief overview. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14 (7): 15 105–20. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms140715105>
37. Qi M., Miyakawa H., Kuramitsu H.K. *Porphyromonas gingivalis* induces murine macrophage foam cell formation. *Microb. Pathog.* 2003; 35 (6): 259–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2003.07.002>
38. Rosenfeld M.E., Campbell L.A. Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 2011; 106 (5): 858–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.05.006>
39. Bigger J.W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet.* 1944; 244 (6320): 497–500.
40. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017; 15 (8): 453–64. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
41. Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012; 211: 12133. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4_8)
42. Dorr T., Vulic M., Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* 2010; 8 (2): e1000317. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000317>
43. Kozarov E.V., Dorn B.R., Shelburne C.E., Dunn W.A. Jr, Progulsk-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25 (3): 17–8. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000155018.67835.1a>
44. Hayashi C., Viereck J., Hua N., Phinikaridou A., Madrigal A.G., Gibson F.C. 3rd, Hamilton J.A., Genco C.A. *Porphyromonas gingivalis* accelerates inflammatory atherosclerosis in the innominate artery of ApoE deficient mice. *Atherosclerosis.* 2011; 215 (1): 52–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.009>
45. Nakamura N., Yoshida M., Umeda M., Huang Y., Kitajima S., Inoue Y., Ishikawa I., Iwai T. Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from *Porphyromonas gingivalis* facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via Toll-like receptor-2 dependent mechanism. *Atherosclerosis.* 2008; 196 (1): 59–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.01.039>
46. Lei L., Li H., Yan F., Li Y., Xiao Y. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide alters atherosclerosis-related gene expression in oxidized low-density-lipoprotein-induced macrophages and foam cells. *J. Periodontol Res.* 2011; 46 (4): 427–37. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01356.x>
47. Li X.Y., Wang C., Xiang X.R., Chen F.C., Yang C.M., Wu J. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide increases lipid accumulation by affecting CD36 and ATP-binding cassette transporter A1 in macrophages. *Oncol. Rep.* 2013; 30 (3): 1329–36. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2013.2600>
48. Боровкова Е.И., Антипова Н.В., Корнеев Т.В., Шапранов М.И., Боровков И.М. Параоксоназа: универсальный фактор антиоксидантной защиты организма человека. *Вестник РАМН.* 2017; 72 (1): 5–10. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn764>
49. Lonn J., Ljunggren S., Klastrom-Engstrom K., Demirel L., Bengtsson T., Karlsson H. Lipoprotein modifications by gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontol Res.* 2018; 53 (3): 403–13. DOI: <https://doi.org/10.1111/jre.12527>
50. Gibson F.C. 3rd, Hong C., Chou H.H., Yumoto H., Chen J., Lien E., Wong J., Genco C.A. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2004; 109 (22): 2801–6. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129769.17895.F0>
51. Li L., Michel R., Cohen J., Decarlo A., Kozarov E. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 26–36. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-26>
52. Turunen S.P., Kumm O., Wang C., Harila K., Mattila R., Sahlman M., Pussinen P.J., Horkko S. Immunization with malondialdehyde-modified low-density lipoprotein (LDL) reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice challenged with *Porphyromonas gingivalis*. *Innate Immun.* 2015; 21 (4): 370–85. DOI: <https://doi.org/10.1177/1753425914542444>
53. Tuomainen A.M., Jauhiainen M., Kovanen P.T., Metso J., Paju S., Pussinen P.J. Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces MMP-9 expression and proatherogenic lipoprotein profile in apoE-deficient mice. *Microb. Pathog.* 2008; 44 (2): 111–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.08.011>
54. Hyvarinen K., Tuomainen A.M., Laitinen S., Alfthan G., Salminen I., Leinonen M., Saikku P., Kovanen P.T., Jauhiainen M., Pussinen P.J. The effect of proatherogenic pathogens on adipose tissue transcriptome and fatty acid distribution in apolipoprotein E-deficient mice. *BMC Genomics.* 2013; 14: 709–22. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-709>
55. Morishita M., Ariyoshi W., Okinaga T., Usui M., Nakashima K., Nishihara T. A. *actinomycetemcomitans* LPS enhances foam cell formation induced by LDL. *J. Dent. Res.* 2013; 92 (3): 241–6. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034512473309>
56. Lakio L., Lehto M., Tuomainen A.M., Jauhiainen M., Malle E., Asikainen S., Pussinen P.J. Pro-atherogenic properties of lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Endotoxin Res.* 2006; 12 (1): 57–64. DOI: <https://doi.org/10.1179/096805106X89099>
57. Velsko I.M., Chukkapalli S.S., Rivera-Kweh M.F., Chen H., Zheng D., Bhattacharyya I., Gangula P.R., Lucas A.R., Kesavalu L. *Fusobacterium nucleatum* alters atherosclerosis risk factors and enhances inflammatory markers with an atheroprotective immune response in ApoE<sup>null</sup> mice. *PLoS One.* 2015; 10 (6): e0129795. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129795>
58. Chukkapalli S.S., Velsko I.M., Rivera-Kweh M.F., Zheng D., Lucas A.R., Kesavalu L. Polymicrobial oral infection with four periodontal bacteria orchestrates a distinct inflammatory response and atherosclerosis in ApoE<sup>null</sup> mice. *PLoS One.* 2015; 10 (11): e0143291. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143291>
59. Lee H.R., Jun H.K., Choi B.K. *Tannerella forsythia* BspA increases the risk factors for atherosclerosis in ApoE(-/-) mice. *Oral Dis.* 2014; 20 (8): 803–808. DOI: <https://doi.org/10.1111/odi.12214>
60. Chukkapalli S.S., Rivera-Kweh M.F., Velsko I.M., Chen H., Zheng D., Bhattacharyya I., Gangula P.R., Lucas A.R., Kesavalu L. Chronic oral infection with major periodontal bacteria *Tannerella forsythia* modulates systemic atherosclerosis risk factors and inflammatory markers. *Pathog. Dis.* 2015; 73 (3): ftv009. DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv009>

## ■ References

- Hettne K.M., Weeber M., Laine M.L., Cate H., Boyer S., Kors J.A., Loos B.G. Automatic mining of the literature to generate new hypotheses for the possible link between periodontitis and atherosclerosis: Lipopolysaccharide as a case study. *J. Clin. Periodontol.* 2007; 34 (12): 1016–24. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01152.x>
- Spahr A., Klein E., Khuseyinova N., Boeckh C., Muche R., Kunze M., Rothenbacher D., Pezeshki G., Hoffmeister A., Koenig W. Periodontal infections and coronary heart disease: role of periodontal bacteria and importance of total pathogen burden in the Coronary Event and Periodontal Disease (CORODONT) study. *Arch. Intern. Med.* 2006; 166 (5): 554–9. DOI: <https://doi.org/10.1001/archinte.166.5.554>
- Nikolayeva E.N., Tsarev V.N., Ippolitov E.V. Periodontopathogenic bacteria as indicators of risk of occurrence and development of periodontitis (part 2). *Stomatologiya dlya vsekh.* 2011; (4): 4–7. (in Russian)
- Tsarev V.N. Microbiology, virology, immunology. Moscow: GEOTAR-Media, 2013: 34–45. (in Russian)
- Balmasova I.P., Tsarev V.N., Arutyunov S.D., Babayev E.A., Gabibov A.G. Filifactor aloicis as an etiologic agent in periodontal diseases. *Acta Sci. Med. Sci.* 2019; 3 (5): 6–12.
- Loktionov A.L., Konoplya A.I., Lunev M.A., Karaulov A.V. Immune and oxidative disorders in the pathogenesis of inflammatory periodontal disease. *Immunologiya.* 2015; 36 (5): 319–28. (in Russian)
- Kostrigina E.D., Zyl'kina L.A., Ivanov P.V. A modern view of the etiopathogenesis of periodontitis (a review of literature). *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki.* 2017; 3 (43): 118–28. DOI: <https://doi.org/10.21685/2072-3032-2017-3-13> (in Russian)
- Cekici A., Kantarci A., Hasturk H., Van Dyke T.E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000.* 2014; 64 (1): 57–80. DOI: <https://doi.org/10.1111/prd.12002>
- Tsepov L.M., Nikolaev A.I., Tsepova E.L., Tsepov A.L. Periodontal pathology in systemic diseases. *Maestro stomatologii.* 2009; (1): 64–7. (in Russian)
- Shaik-Dasthagirisahab Y.B., Mekasha S., He X., Gibson D.C., III, Ingalls R.R. Signaling events in pathogen-induced macrophage foam cell formation. *Pathog. Dis.* 2016; 74 (6): ftw074. DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw074>
- Aronov D.M., Lupanov V.P. Atherosclerosis and coronary heart disease: some aspects of pathogenesis. *Atherosclerosis i dyslipidemii.* 2011; 1 (2): 48–56. (in Russian)
- Loos B.G., John R.P., Laine M.L. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J. Clin. Periodontol.* 2005; 32 (6): 159–79. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00806.x>
- Fiehn N.E., Larsen T., Christiansen N., Holmstrup P., Schroeder T.V. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J. Periodontol.* 2005; 76 (5): 731–6. DOI: <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.5.731>
- Tabrizi F., Buhlin K., Gustafsson A., Klinge B. Oral health of monozygotic twins with and without coronary heart disease: a pilot study. *J. Clin. Periodontol.* 2007; 34 (3): 220–5. DOI: [10.1111/j.1600-051X.2006.01041.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2006.01041.x)
- Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352 (16): 1685–95. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra043430>
- Chumakova G.A., Gritsenko O.V., Veselovskaya N.G., Vakhromeeva E.V., Kozarenko A.A. Clinical role of apolipoproteins A and B. *Cardiovascularnaya terapiya i profilaktika.* 2011; (6): 105–111. (in Russian)
- Li A.C., Glass C.K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat. Med.* 2002; 8 (11): 1235–42. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm1102-1235>
- Cheng L.C., Su K.H., Kou Y.R., Shyue S.K., Ching L.C., Yu Y.B., Wu Y.L., Pan C.C., Lee T.S.  $\alpha$ -Lipoic acid ameliorates foam cell formation via liver X receptor  $\alpha$ -dependent upregulation of ATP-binding cassette transporters A1 and G1. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50 (1): 47–54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.706>
- Wolf D., Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis. *Circ. Res.* 2019; 124 (2): 315–27. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313591>
- Geng Y.J., Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22 (9): 1370–80. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000031341.84618.a4>
- Tedgui A., Mallat Z. Apoptosis as a determinant of atherothrombosis. *Thromb. Haemost.* 2001; 86 (1): 420–6.
- Schaar J.A., Muller J.E., Falk E., Virmani R., Fuster V., Seruys P.W., Colombo A., Stefanadis C., Casscells S.W., Moreno P.R., Maseri A., van der Steen A.F.W. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. *Eur. Heart J.* 2004; 25 (12): 1077–82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ehj.2004.01.002>
- Ley K., Miller Y.I., Hedrick C.C. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31 (7): 1506–16. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221127>
- Curtiss L.K., Tobias P.S. Emerging role of toll-like receptors in atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 2009; 50 (suppl): 340–5. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.R800056-JLR200>
- Duwell P., Kono H., Rayner K.J., Sirois C.M., Vladimer G., Bauernfeind F.G., Abela G.S., Franchi L., Nuñez G., Schnurr M., Espevik T., Lien E., Fitzgerald K.A., Rock K.L., Moore K.J., Wright S.D., Hornung V., Latz E. Nlrp3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* 2010; 464 (7293): 1357–61. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08938>
- Winkels H., Ehinger E., Vassallo M., Buscher K., Dinh H.Q., Kobiyama K., Hamers A.A.J., Cochain C., Vafadarnejad E., Saliba A.E., Zernecke A., Pramod A.B., Ghosh A.K., Anto Michel N., Hoppe N., Hilgendorf I., Zirikli A., Hedrick C.C., Ley K., Wolf D. Atlas of the immune cell repertoire in mouse atherosclerosis defined by single-cell rna-sequencing and mass cytometry. *Circ. Res.* 2018; 122 (12): 1675–88. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312513>
- Finn A.V., Nakano M., Narula J., Kolodgie F.D., Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30 (7): 1282–92. DOI: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179739>
- Wick G., Jacik B., Buszko M., Wick M.C., Grundtman C. The role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 2014; 11 (9): 516–29. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.91>
- Pothinini N.V.K., Subramany S., Kuriakose K., Shirazi L.F., Romeo F., Shah P.K., Mehta J.L. Infections, atherosclerosis, and coronary heart disease. *Eur. Heart J.* 2017; 38 (43): 3195–201. DOI: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx362>
- Robertson A.K., Hansson G.K. T cells in atherogenesis: For better or for worse? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26 (11): 2421–32. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000245830.29764.84>
- Pilayeva E.A., Potekhina A.V., Balakhonova T.V., Ruleva N.Yu., Masenko V.P., Noeva E.A., Krasnikova T.L., Aref'eva T.I. Effector and regulatory subpopulation of blood lymphocytes in patients with atherosclerosis of carotid arteries. *Immunologiya.* 2015; 36 (1): 38–44. (in Russian)
- Jia L., Zhu L., Wang J.Z., Wang X.J., Chen J.Z., Song L., Wu Y.J., Sun K., Yuan Y.Z., Hui R. Methylation of foxp3 in regulatory t cells is related to the severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2013; 228 (2): 346–52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.027>
- Mattila K.J., Pussinen P.J., Paju S. Dental infections and cardiovascular diseases: a review. *J. Periodontol.* 2005; 76 (11 suppl): 2085–8. DOI: <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.11-S.2085>
- Elkind M.S. Infectious burden: a new risk factor and treatment target for atherosclerosis. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2010; 10 (2): 84–90. DOI: <https://doi.org/10.2174/187152610790963519>
- Maekawa T., Takahashi N., Tabeta K., Aoki Y., Miyashita H., Miyauchi S., Nakajima T., Yamazaki K. Chronic oral infection with *Porphyromonas gingivalis* accelerates atheroma formation by shifting the lipid profile. *PLoS One.* 2011; 6 (5): e20240. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020240>
- Di Pietro M., Filardo S., De Santis F., Sessa R. Chlamydia pneumoniae infection in atherosclerotic lesion development through oxidative stress: a brief overview. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14 (7): 15 105–20. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms140715105>
- Qi M., Miyakawa H., Kuramitsu H.K. *Porphyromonas gingivalis* induces murine macrophage foam cell formation. *Microb. Pathog.* 2003; 35 (6): 259–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2003.07.002>
- Rosenfeld M.E., Campbell L.A. Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 2011; 106 (5): 858–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.05.006>

39. Bigger J.W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*. 1944; 244 (6320): 497–500.
40. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017; 15 (8): 453–64. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
41. Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012; 211: 12133. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4_8)
42. Dorr T., Vulic M., Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* 2010; 8 (2): e1000317. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000317>
43. Kozarov E.V., Dorn B.R., Shelburne C.E., Dunn W.A. Jr, Progulsk-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25 (3): 17–8. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000155018.67835.1a>
44. Hayashi C., Viereck J., Hua N., Phinikaridou A., Madrigal A.G., Gibson F.C. 3rd, Hamilton J.A., Genco C.A. *Porphyromonas gingivalis* accelerates inflammatory atherosclerosis in the innominate artery of ApoE deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011; 215 (1): 52–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.009>
45. Nakamura N., Yoshida M., Umeda M., Huang Y., Kitajima S., Inoue Y., Ishikawa I., Iwai T. Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from *Porphyromonas gingivalis* facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via Toll-like receptor-2 dependent mechanism. *Atherosclerosis*. 2008; 196 (1): 59–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.01.039>
46. Lei L., Li H., Yan F., Li Y., Xiao Y. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide alters atherosclerotic-related gene expression in oxidized low-density-lipoprotein-induced macrophages and foam cells. *J. Periodontal Res.* 2011; 46 (4): 427–37. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01356.x>
47. Li X.Y., Wang C., Xiang X.R., Chen F.C., Yang C.M., Wu J. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide increases lipid accumulation by affecting CD36 and ATP-binding cassette transporter A1 in macrophages. *Oncol. Rep.* 2013; 30 (3): 1329–36. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2013.2600>
48. Borovkova E.I., Antipova N.V., Korneenko T.V., Shakharonov M.I., Borovkov I.M. Paraoxonase: The universal factor of antioxidant defense in human body. *Vestnik RAMN.* 2017; 72 (1): 5–10. DOI: <https://doi.org/10.15690/vramn764> (in Russian)
49. Lonn J., Ljunggren S., Klastrom-Engstrom K., Demirel L., Bengtsson T., Karlsson H. Lipoprotein modifications by gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Res.* 2018; 53 (3): 403–13. DOI: <https://doi.org/10.1111/jre.12527>
50. Gibson F.C. 3rd, Hong C., Chou H.H., Yumoto H., Chen J., Lien E., Wong J., Genco C.A. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004; 109 (22): 2801–6. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129769.17895.F0>
51. Li L., Michel R., Cohen J., Decarlo A., Kozarov E. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 26–36. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-26>
52. Turunen S.P., Kummu O., Wang C., Harila K., Mattila R., Sahlman M., Pussinen P.J., Horkko S. Immunization with malondialdehyde-modified low-density lipoprotein (LDL) reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice challenged with *Porphyromonas gingivalis*. *Innate Immun.* 2015; 21 (4): 370–85. DOI: <https://doi.org/10.1177/1753425914542444>
53. Tuomainen A.M., Jauhiainen M., Kovanen P.T., Metso J., Paju S., Pussinen P.J. Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces MMP-9 expression and proatherogenic lipoprotein profile in apoE-deficient mice. *Microb. Pathog.* 2008; 44 (2): 111–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.08.011>
54. Hyvarinen K., Tuomainen A.M., Laitinen S., Alfthan G., Salminen I., Leinonen M., Saikku P., Kovanen P.T., Jauhiainen M., Pussinen P.J. The effect of proatherogenic pathogens on adipose tissue transcriptome and fatty acid distribution in apolipoprotein E-deficient mice. *BMC Genomics*. 2013; 14: 709–22. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-709>
55. Morishita M., Ariyoshi W., Okinaga T., Usui M., Nakashima K., Nishihara T. A. actinomycetemcomitans LPS enhances foam cell formation induced by LDL. *J. Dent. Res.* 2013; 92 (3): 241–6. DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034512473309>
56. Lakio L., Lehto M., Tuomainen A.M., Jauhiainen M., Malle E., Asikainen S., Pussinen P.J. Pro-atherogenic properties of lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Endotoxin Res.* 2006; 12 (1): 57–64. DOI: <https://doi.org/10.1179/096805106X890999>
57. Velsko I.M., Chukkapalli S.S., Rivera-Kweh M.F., Chen H., Zheng D., Bhattacharyya I., Gangula P.R., Lucas A.R., Kesavalu L. Fusobacterium nucleatum alters atherosclerosis risk factors and enhances inflammatory markers with an atheroprotective immune response in ApoE<sup>null</sup> mice. *PLoS One*. 2015; 10 (6): e0129795. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129795>
58. Chukkapalli S.S., Velsko I.M., Rivera-Kweh M.F., Zheng D., Lucas A.R., Kesavalu L. Polymicrobial oral infection with four periodontal bacteria orchestrates a distinct inflammatory response and atherosclerosis in ApoE<sup>null</sup> mice. *PLoS One*. 2015; 10 (11): e0143291. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143291>
59. Lee H.R., Jun H.K., Choi B.K. *Tannerella forsythia* BspA increases the risk factors for atherosclerosis in ApoE(-/-) mice. *Oral Dis.* 2014; 20 (8): 803–808. DOI: <https://doi.org/10.1111/odi.12214>
60. Chukkapalli S.S., Rivera-Kweh M.F., Velsko I.M., Chen H., Zheng D., Bhattacharyya I., Gangula P.R., Lucas A.R., Kesavalu L. Chronic oral infection with major periodontal bacteria *Tannerella forsythia* modulates systemic atherosclerosis risk factors and inflammatory markers. *Pathog. Dis.* 2015; 73 (3): fiv009. DOI: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv009>

## Сведения об авторах

**Балмасова Ирина Петровна** – д.м.н., проф., зав. лабораторией патогенеза и методов лечения инфекционных заболеваний НИМСИ ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, проф. кафедры аллергологии и иммунологии ФНМО Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [iri.balm@mail.ru](mailto:iri.balm@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

**Царев Виктор Николаевич** – д.м.н., проф., заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [nikola777@rambler.ru](mailto:nikola777@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

**Юшук Елена Николаевна** – д.м.н., проф., заведующая кафедрой клинической функциональной диагностики лечебного факультета ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [ndlena@mail.ru](mailto:ndlena@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-0065-5624>

## Authors' information

**Irina P. Balmasova** – MD, Prof., Head of Pathogenesis and Treatment Methods of Infectious Diseases Laboratory of MDRI, A.I. Evdokimov MSMSU MOH Russia; Prof. of Department of Allergology and Immunology of Medical Institute FCME, RUDN University of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [iri.balm@mail.ru](mailto:iri.balm@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0001-8194-2419>

**Victor N. Tsarev** – MD, Prof., Head of the Microbiology, Virology and Immunology Department, A.I. Evdokimov MSMSU of the MOH of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [nikola777@rambler.ru](mailto:nikola777@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

**Elena N. Yushchuk** – MD, Prof., Head of the Department of Clinical Functional Diagnostics of the Medical Faculty of A.I. Evdokimov MSMSU of the MOH of Russia; Moscow, Russian Federation; e-mail: [ndlena@mail.ru](mailto:ndlena@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0003-0065-5624>

**Доровских Анна Сергеевна** – ассистент кафедры клинической функциональной диагностики лечебного факультета ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: kas2511@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0209-4093>

**Малова Елена Сергеевна** – д.м.н., доцент, проф., кафедры аллергологии и иммунологии ФНМО Мединститута РУДН, Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация; e-mail: alenamalova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5710-3076>

**Караков Карен Григорьевич** – д.м.н., проф., заведующий кафедрой терапевтической стоматологии стоматологического факультета ФГБОУ ВО СГГМУ Минздрава России, Ставрополь, Российская Федерация; e-mail: karakov.kg@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9012-4784>

**Эльбекьян Карина Сергеевна** – д.б.н., доцент, заведующая кафедрой общей и биологической химии ФГБОУ ВО СГГМУ Минздрава России, Ставрополь, Российская Федерация; e-mail: karinasgma@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2403-86-63>

**Арутюнов Сергей Дарчоевич** – д.м.н., проф., заведующий кафедрой пропедевтики стоматологических заболеваний стоматологического факультета ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Российская Федерация; e-mail: sd.arutyunov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6512-872>

**Anna S. Dorovskikh** – Assistant of the Clinical Functional Diagnostics Department of the Medical Faculty of A.I. Evdokimov MSMSU of the MOH of Russia; Moscow, Russian Federation; e-mail: kas2511@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0209-4093>

**Elena S. Malova** – MD, Associate Prof., Prof. of Allergology and Immunology Department of Medical Institute FCME, RUDN University of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: alenamalova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5710-3076>

**Karen G. Karakov** – MD, Prof., Head of the Therapeutic Dentistry Department of the Dental Faculty of StSMU of the MOH of Russia, Stavropol, Russian Federation; e-mail: karakov.kg@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9012-4784>

**Karina S. Elbekyan** – Dr.Sci, Associate Prof., Head of the General and Biological Chemistry Department of StSMU of the MOH of Russia, Stavropol, Russian Federation; e-mail: karinasgma@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2403-86-63>

**Sergey D. Arutyunov** – MD, Prof., Head of the Dental Diseases Propedeutics Department of the Dental Faculty of A.I. Evdokimov MSMSU of the MOH of Russia; Moscow, Russian Federation; e-mail: sd.arutyunov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6512-872>

© Коллектив авторов, 2020

Соломай Т.В.<sup>1,2</sup>, Семенов Т.А.<sup>3,4</sup>, Филатов Н.Н.<sup>2,4</sup>, Костинов М.П.<sup>2,4</sup>,  
Ильина Н.И.<sup>5</sup>

## Вирус Эпштейна–Барр: разработка вакцин

<sup>1</sup> Межрегиональное управление № 1 Федерального медико-биологического агентства, 123182, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Министерства высшего образования и науки Российской Федерации, 105064, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, г. Москва, Российская Федерация

<sup>4</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

<sup>5</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

### Резюме

**Введение.** Вакцинация – один из наиболее эффективных способов снижения заболеваемости. Инфекция, вызванная вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), при отсутствии вакцинации представляет серьезную проблему здравоохранения.

**Целью** систематического обзора стало изучение разработки средств специфической иммунопрофилактики ВЭБ-инфекции.

**Материал и методы.** Поиск осуществлялся в базах eLibrary, Cyberleninka, The Cochrane Library, PubMed, clinicaltrials.gov и на сайте Researchgate в соответствии с разработанной стратегией с учетом критериев включения и невключения. Глубина поиска составила 20 лет. Период поиска 04.05.2020–19.05.2020. Окончательный список публикаций включал 10 исследований.

**Результаты.** Из 10 отобранных работ семь отображали результаты испытаний кандидатных вакцин, нацеленных на предотвращение инфицирования ВЭБ, три – описывали кандидатные вакцины для иммунизации инфицированных ВЭБ индивидуумов для экстренной профилактики развития инфекции или лечения ВЭБ-ассоциированных опухолей. Клинические испытания (I фаза) были проведены для двух кандидатных вакцин, одна из которых в последующем прошла II фазу. Однако полученные результаты не позволили продолжить испытания данной кандидатной вакцины.

**Заключение.** Ни одна из кандидатных вакцин на настоящий момент не прошла все фазы клинических испытаний.

**Ключевые слова:** вакцинация; вакцины; вирус Эпштейна–Барр

Статья поступила 10.06.2020. Принята в печать 16.07.2020.

**Для цитирования:** Соломай Т.В., Семенов Т.А., Филатов Н.Н., Костинов М.П., Ильина Н.И. Вирус Эпштейна–Барр: разработка вакцин. Иммунология. 2020; 41 (4): 381–390. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-381-390>

**Финансирование.** Исследование не имело финансовой поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции  
Соломай Татьяна Валерьевна –  
кандидат медицинских наук,  
заместитель руководителя  
Межрегионального управления  
№ 1 ФМБА России, старший  
научный сотрудник лаборатории  
эпидемиологического анализа  
и мониторинга инфекционных  
заболеваний ФГБНУ «Научно-  
исследовательский институт вакцин  
и сывороток им. И.И. Мечникова»  
Минобрнауки России, Москва,  
Российская Федерация  
E-mail: [solomay@rambler.ru](mailto:solomay@rambler.ru)  
<https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>

Solomay T.V.<sup>1,2</sup>, Semenenko T.A.<sup>3,4</sup>, Filatov N.N.<sup>2,4</sup>, Kostinov M.P.<sup>2,4</sup>, Pina N.I.<sup>5</sup>

## Epstein–Barr virus: vaccine development

<sup>1</sup> Interregional Department No 1 of the Federal Medico-biological Agency, 123182, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera of the Ministry of High Education and Science of the Russian Federation, 105064, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup> Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119048, Moscow, Russian Federation

<sup>5</sup> National Research Center Institute of Immunology of the Federal Medico-biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

**Abstract**

**Introduction.** Vaccination is one of the most effective ways to reduce morbidity. Infection caused by the Epstein-Barr virus (EBV), in the absence of vaccination, is a serious health problem.

**The aim** of the systematic review was to study the problem of developing means of specific immunoprophylaxis of EBV infection.

**Material and methods.** The search was carried out in the databases eLibrary, Cyberleninka, The Cochrane Library, PubMed, clinicaltrials.gov and on the Researchgate website in accordance with the developed strategy, taking into account the criteria for inclusion and non-inclusion. The search depth was 20 years. The search period was 04.05.2020–19.05.2020. The final list of publications included 10 studies.

**Results.** Of the 10 selected articles, 7 displayed the results of candidate vaccines trials aimed at preventing EBV infection, and 3 described candidate vaccines for immunizing EBV-infected individuals for emergency prevention of infection or treatment of EBV-associated tumors. Clinical trials (phase 1) were conducted for two candidate vaccines, one of which subsequently passed phase 2. However, the results obtained did not allow further trials of this candidate vaccine.

**Conclusion.** None of the candidate vaccines had yet passed all phases of clinical trials.

**Keywords:** vaccination; vaccines; Epstein-Barr virus

**Received** 10.06.2020. **Accepted** 16.07.2020.

**For citation:** Solomay T.V., Semenenko T.A., Filatov N.N., Kostinov M.P., Ilina N.I. Epstein-Barr virus: vaccine development. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 381–90. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-3-381-390> (in Russian)

**Funding.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

**For correspondence**

Tatiana V. Solomay –  
PhD, Deputy Head  
of Interregional Department № 1  
of the Federal Medical and  
Biological Agency;  
Senior Researcher of Laboratory  
of Epidemiological Analysis  
and Monitoring of Infectious Diseases,  
I.I. Mechnikov Research Institute  
of Vaccines and Sera  
of the Ministry  
of High Education and Science  
of the Russian Federation,  
Moscow, Russian Federation  
E-mail: [solomay@rambler.ru](mailto:solomay@rambler.ru)  
<https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>

**Введение**

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) рассматривают в качестве этиологического агента таких заболеваний, как инфекционный мононуклеоз, лимфома Беркитта, назофарингеальная карцинома, рассеянный склероз и др. Каждая из этих нозологий имеет социальную и медицинскую значимость, поскольку наносит не только экономический ущерб, но и влечет за собой утрату работоспособности и даже жизни большого числа людей во всем мире [1–3].

Вакцинация является высокоэффективным методом специфической профилактики, позволяющим существенно снизить бремя инфекционных болезней, заболеваемость и смертность [4–7]. В настоящее время в мире отсутствуют вакцины против инфекции, вызванной ВЭБ, но разработка средств специфической иммунопрофилактики ВЭБ-инфекции представляет значимый интерес. Идея о необходимости создания вакцины против данной инфекции была высказана еще в середине XX в. [8], однако до сих пор ученым не удалось получить эффективный и одновременно безопасный препарат для иммунизации.

Изучение структуры вируса позволило выявить особенности его строения и дало толчок исследованиям по разработке вакцин. Геном ВЭБ представлен двуцепочечной ДНК и заключен в икосаэдрический капсид. Вокруг капсида находится тегумент, содержащий белки, способствующие вирусной репликации и уклонению от иммунного ответа с ингибированием передачи сигналов. Тегумент заполняет пространство между капсидом

и наружной мембраной, сформированной из белков и липидов клетки хозяина и вирусных гликопротеинов [9]. При этом поверхностные гликопротеины играют роль рецепторов вируса, к которым при развитии иммунного ответа вырабатываются нейтрализующие антитела. Наиболее подробно изучены пять гликопротеинов ВЭБ, участвующих в проникновении вируса в клетку – gp350, gp42, gH, gL и gB [10–14]. Отдельно следует отметить белки EA (ранний антиген), EBNA (ядерный антиген), VCA (капсидный антиген), LMP (латентный мембранный белок), определение антител к которым дает возможность дифференцировать стадию инфекции [15].

Вирусная ДНК кодирует более 85 генов, причем одни отвечают за латенцию вируса, а другие – за литическую репликацию. В ходе считывания генетической информации с ДНК происходит синтез не только структурных белков, но и микроРНК (мкРНК) вируса [10, 16]. На настоящий момент известно 44 синтезируемых ВЭБ мкРНК. Часть из них ассоциирована с геном *BHRF1* и отвечает за угнетение апоптоза В-клеток, способствуя их первичной трансформации. Другая часть сопряжена с транскриптом *BART* и обнаруживается во всех опухолях, ассоциированных с ВЭБ [17]. Кроме того, выделяют мкРНК *EBER1* и *EBER2*, которые при латентной инфекции накапливаются в ядре клетки-хозяина. Их роль на настоящий момент до конца не изучена [18].

Установлено, что большинство генов ВЭБ подвержены изменчивости, которая, однако, не превышает 5 %. Исключение составляет ген *EBNA2*, который опре-

деляет наличие двух известных в настоящее время генотипов вируса, сходство которых по данному гену составляет всего 54 % [19]. Исследование других вариантов изменчивости ВЭБ в настоящий момент продолжается. Так, например, в зависимости от изменчивости гена, кодирующего латентный мембранный белок LMP1 (который считается единственным онкогеном ВЭБ), выделяют семь вариантов вируса: дикий В95-8; Аляска (Ala), Китай (Ch1) и (Ch2), Средиземноморье (Med+) и (Med-), Северная Каролина (NC). Все они, за исключением В95-8, относительно которого происходило ранжирование, названы по месту их обнаружения, однако встречаются и в других регионах [20].

Жизненный цикл ВЭБ в организме человека включает две фазы: латентную и литическую. В латентной фазе ВЭБ-инфекции вирусный геном находится внутри ядра зараженной клетки как в виде круговых эписом (ковалентно замкнутая кольцевая форма ДНК вируса), так и в интегрированном виде – встроенным в хромосомную ДНК клетки [21]. Это позволяет вирусу в латентную фазу экспрессировать отдельные вирусные белки и мкРНК [21, 22].

В соответствии с классификацией D.G. van Zyl и соавт. [11] выделяют несколько стадий латенции, которые ВЭБ проходит в течение одного инфекционного цикла:

- стадия прелатенции – вирион ВЭБ, попадая в ротоглотку, инфицирует В-клетки, находящиеся в лимфоидной ткани, которые экспрессируют несколько латентных (EBNA2, EBNA-LP) и литических вирусных белков (BZLF1, BRFL1, BMRF1, BcRF1, BHRF1);
- стадия латенции III – набор экспрессируемых вирусных белков изменяется в пользу латентных (EBNA2, EBNA-LP, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA1, LMP1, LMP2A, LMP2B), из литических белков остается только BHRF1; происходит антигенная стимуляция В-клеток с последующей их дифференциацией в плазматические клетки и В-клетки памяти;
- стадия латенции II – количество экспрессируемых клеткой белков ВЭБ постепенно уменьшается (осуществляется экспрессия только латентных белков EBNA-LP, EBNA1, LMP1, LMP2A, LMP2B), эта стадия соотносится с такими патологическими состояниями, как лимфома Ходжкина и назофарингеальная карцинома;
- стадия латенции I – при делении В-клетки происходит экспрессия латентного белка EBNA1, данная стадия соотносится с ВЭБ-ассоциированной лимфомой Беркитта;
- стадия латенции 0 – экспрессия вирусных белков в В-клетках полностью прекращается.

За латентной фазой следует фаза литической репликации вируса, сопровождающаяся синтезом новых вирусных частиц и выходом их из инфицированных клеток.

Исследователи выдвигают несколько предположений, касающихся факторов, заставляющих ВЭБ переходить из состояния латенции к литической репликации.

Большинство этих предположений сводится к наличию внешнего чужеродного агента, такого как иной биологический патоген, воздействию на организм химических или физических факторов [23–25]. К факторам макроорганизма относят различные иммунодефицитные состояния [26]. Действие одного или нескольких таких факторов приводит к активации гена *BZLF1* (другие названия гена – *Zta*, или *ZEBRA*), который является своего рода переключателем между фазой латенции и литической репликации [22]. Именно этот ген запускает процесс образования новых копий вирусной ДНК и синтез всех вирусных белков [27]. Выход вирусов из клеток сопровождается обнаружением ВЭБ как в крови, так и в слюне [28]. Затем вирусы находят новые клетки-мишени и внедряются в них. Цикл замыкается. При этом происходит передача возбудителя как от клетки к клетке внутри одного организма, так и горизонтальная передача от одного организма другому. Ряд исследователей не исключают наличие вертикальной передачи ВЭБ от матери плоду [29].

Понимание структуры и жизненного цикла вируса – необходимое условие для разработки эффективных способов профилактики ассоциированных с ним заболеваний [30, 31]. Одним из наиболее действенных и доминирующих способов снижения заболеваемости является иммунизация населения с помощью вакцин. В этой связи важно проанализировать результаты завершенных экспериментов и предварительные результаты незаконченных на данный момент исследований, посвященных иммунопрофилактике ВЭБ-инфекции. Это позволит привлечь внимание к данной проблеме не только научной общественности, но и практикующих специалистов, создать дополнительную базу для изучения и последующего внедрения кандидатных вакцинных препаратов.

Целью систематического обзора стало изучение проблемы разработки средств специфической иммунопрофилактики ВЭБ-инфекции.

## Материал и методы

Для подготовки обзора проводили отбор публикаций, в которых оценивали результаты разработки и испытаний кандидатных вакцин для профилактики и лечения ВЭБ-инфекции и заболеваний, ассоциированных с ВЭБ.

Стратегия поиска представлена в табл. 1. Глубина поиска составила 20 лет. Поиск литературы осуществлялся по поисковым запросам «вакцинация/вакцины от ВЭБ-инфекции», «клинические испытания вакцин против ВЭБ-инфекции» в библиографических электронных базах данных eLibrary, Cyberleninka, The Cochrane Library, PubMed, базе клинических исследований clinicaltrials.gov и на сайте Researchgate. Все результаты поиска проходили независимую оценку тремя авторами на соответствие цели исследования, после чего производился поиск полнотекстовых статей по выходным данным в библиографических базах данных eLibrary, Cyberleninka, The Cochrane Library, PubMed, базе клинических исследований clinicaltrials.gov и на

**Таблица 1.** Стратегия поиска данных о кандидатах вакцин против ВЭБ-инфекции (период поиска: 04.05.2020–19.05.2020)

I этап	Поиск резюме по поисковым запросам в библиографических базах данных eLibrary; Cyberleninka; The Cochrane Library; PubMed; базе клинических исследований clinicaltrials.gov	
	Поисковые запросы «Вакцинация/вакцины от ВЭБ-инфекции», «клинические испытания вакцин против ВЭБ-инфекции»	Количество находок 3145
II этап	Отбор исследований – независимая оценка резюме тремя авторами	
	Отсеяно по причине:	
	повторов	1015
	несоответствия цели исследования	2116
	отсутствия уникальной информации о кандидатной вакцине	4
	отобрано	14
III этап	Поиск полнотекстовых статей по выходным данным в библиографических базах eLibrary, Cyberleninka, The Cochrane Library, PubMed, базе клинических исследований clinicaltrials.gov и на сайте Researchgate и их оценка по критериям	
	<b>Критерии включения</b>	<b>Критерии невключения</b>
	Наличие полнотекстовой публикации, отвечающей цели исследования	Отсутствие полнотекстовой публикации, отвечающей цели исследования
	Выход публикации попадает в промежуток 2000–2020 гг.	Выход публикации до 2000 г.
	Наличие информации об антигенах, использованных для разработки кандидатной вакцины	Отсутствие информации об антигенах, использованных для разработки кандидатной вакцины
	Наличие информации о характере иммунного ответа	Отсутствие информации о характере иммунного ответа
	Наличие информации о фазе испытаний кандидатной вакцины	Отсутствие информации об испытаниях кандидатной вакцины
	Включены в исследование 10 статей	Исключены 4 статьи
IV этап	Извлечение информации (сбор данных) из статей, включенных в исследование, по параметрам: фамилия и инициалы первого автора исследования, страна, ссылка; год публикации; использованные антигены, характеристика и фаза испытаний, результат	

сайте Researchgate. Дополнительно осуществляли поиск по спискам литературы полнотекстовых статей с последующим поиском источников на перечисленных электронных ресурсах. В исследование включали полнотекстовые статьи, отвечающие цели исследования, год публикации которых попадал в промежуток 2000–2020 гг. Обязательными критериями включения являлись наличие информации об антигенах, использованных для разработки кандидатной вакцины; о характере иммунного ответа и о фазе испытаний. Таким образом, окончательный наиболее полный на момент проведения исследования список включал 10 публикаций, из которых извлекали информацию (сбор данных) по параметрам: фамилия и инициалы первого автора исследования; ссылка; год публикации; антигены, использованные для разработки кандидатной вакцины; характер иммунного ответа; фаза испытаний.

### Разработка средств специфической иммунопрофилактики ВЭБ-инфекции

В табл. 2 представлены характеристики исследований, включенных в анализ.

Гликопротеины, присутствующие на поверхности вирусов и инфицированных вирусом клеток, как правило, являются основными кандидатами на разработку вакцин для предотвращения инфекции и/или

заболевания. В течение нескольких десятилетий ВЭБ-гликопротеин gp350, участвующий в проникновении вируса в В-клетки, рассматривался в качестве перспективной вакцинной мишени [32, 33].

В 2007 г. опубликованы результаты клинических исследований рекомбинантной субъединичной вакцины, разработанной компанией GlaxoSmithKline Biologicals (Rixensart, Бельгия), каждая доза которой содержала 50 мкг gp350 и адьювантную систему в объеме 0,5 мл. I фаза исследований, проведенная с участием 148 здоровых взрослых добровольцев (двойное слепое рандомизированное контролируемое исследование), показала, что препарат хорошо переносится и обладает иммуногенными свойствами, сопряженными с выработкой нейтрализующих антител против gp350 [34]. II фаза исследования, посвященная изучению иммуногенности, безопасности и оценке эффективности профилактики инфекционного мононуклеоза у здоровых молодых людей, проведена в 2001–2003 гг. в пяти территориальных образованиях Бельгии. В исследовании принял участие 181 серонегативный здоровый доброволец в возрасте 16–25 лет. Добровольцы были рандомизированы двойным слепым способом на равные группы. Им внутримышечно по схеме 0, 1 и 5 мес вводили 3 дозы вакцины или плацебо. Перед вакцинацией, а также на 1, 5, 6 и 19-й месяцы оценивали серологический статус, включающий определение IgM и IgG к капсидному

**Таблица 2.** Характеристики исследований, включенных в анализ

Фамилия и инициалы первого автора, страна, ссылка	Год публикации	Использованные антигены	Характеристика и фаза испытаний	Результат
Кандидатные вакцины для иммунизации лиц, инфицированных вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ)				
Moutschen M. et al., Бельгия [34]	2007	Рекомбинантная субъединица поверхностного гликопротеина gp350	Клиническое испытание, I фаза (148 здоровых взрослых добровольцев)	Безопасность: отсутствие нежелательных последствий. Иммуногенность: наличие выработки нейтрализующих антител против gp350
Sokal E.M. et al., Бельгия [35]			Клиническое испытание, II фаза (181 ВЭБ-серонегативный взрослый доброволец)	Безопасность: отсутствие нежелательных последствий. Иммуногенность: наличие выработки нейтрализующих антител против gp350 в высоких титрах у 98,7 % добровольцев. Эффективность: защита от развития инфекционного мононуклеоза, но не от бессимптомной ВЭБ-инфекции и сопряженных с ней заболеваний
Ruiss R. et al., Германия [37]	2011	Вирусоподобные частицы, имеющие все структурные белки ВЭБ, но лишенные вирусной ДНК	Докиническое испытание <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (мышь)	Гуморальный и клеточный ответ на множественные антигены вируса, показана высокая иммуногенность за счет гуморальных и клеточных реакций
Cui X. et al., США [38]	2016	Рекомбинантные субъединицы поверхностных гликопротеинов gH/gL, gB	Докиническое испытание <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (кролики)	Предотвращает проникновение ВЭБ в В-клетки и клетки лимфомы Беркитта
Perez E.M. et al., США [40]	2017	Три типа вирусоподобных частиц со встроенными белками ВЭБ: gH/gL-EBNA1; gB-LMP2 и gp350	Докиническое испытание <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (мышь)	Вирус-нейтрализующая активность сыворок мышей, иммунизированных gH/gL-EBNA1 и сочетанием gH/gL-EBNA1 с gp350
Vu W. et al., США, Япония, Малайзия [41]	2019	Два типа наночастиц, содержащих gH/gL и gH/gL/gp42	Докиническое испытание <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (мышь, обезьяны)	Выработка вирус-нейтрализующих антител, препятствующих проникновению ВЭБ в В-клетки и эпителициты
Escalante G.M. et al., США, Кения [42]	2020	Вирусоподобные частицы с пятью встроенными поверхностными гликопротеинами ВЭБ (gp350, gB, gp42, gH/gL)	Докиническое испытание <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (новозеландские белые кролики)	Выработка вирус-нейтрализующих антител, препятствующих проникновению ВЭБ в В-клетки и эпителициты
Кандидатные вакцины для иммунизации лиц, инфицированных вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ)				
Brooks J.M. et al., Великобритания, Нидерланды [43]	2016	Пептидные пулы EBNA2	Докиническое испытание <i>in vitro</i>	CD8 <sup>+</sup> -Т-клеточный ответ, сопряженный с уничтожением В-клеток на ранних стадиях трансформации, индуцированной вирусом
Taylor G.S. et al., Великобритания [44]	2014	Латентные белки LMP-2 и EBNA1-рекомбинантная модифицированная вакцина Vaccinia Ankara	Клиническое испытание I фаза (16 пациентов с ВЭБ-положительной карциномой носоглотки)	Безопасность: отсутствие нежелательных последствий. Иммуногенность: CD8 <sup>+</sup> -Т-клеточный ответ на EBNA1 и LMP2. Эффективность: у 2 пациентов отмечена стабилизация заболевания; у 2 – отсутствие клинического эффекта; у остальных результатов нельзя расценить однозначно.
Rühl J. et al., Швеция, Великобритания, Германия, Австралия [45]	2019	Аденовирус, кодирующий EBNA1, усиленный модифицированным вектором на основе вируса осповакцины	Докиническое испытание <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (мышь)	CD4 <sup>+</sup> - и CD8 <sup>+</sup> -Т-клеточный ответ, сопряженный с уничтожением EBNA1-положительных опухолевых клеток

антигену EBV – VCA (невакцинные антитела) и нейтрализующих антител к gp350. Эффективность вакцинации оценивали в течение 18 мес наблюдения после введения второй инъекции (до 19-го месяца исследования) методом анкетирования на наличие симптомов инфекционного мононуклеоза с последующим медицинским осмотром и лабораторным обследованием. Через месяц после завершения вакцинации 98,7 % вакцинированных добровольцев имели антитела к gp350 (среднее геометрическое титра 356,23 ЕД). В группе реципиентов плацебо данные показатели составили 69,86 % (2,83 ЕД). Частота развития нежелательных явлений (местная боль, покраснение, отек, головная боль, усталость) была сопоставима в обеих группах, достоверные различия отсутствовали. Эффективность вакцинации составила 78 %. Вероятность развития инфекционного мононуклеоза была в 4,8 раза выше в группе реципиентов плацебо, нежели в группе вакцинированных (9 против 2 случаев заболевания соответственно). Однако разница между частотой бессимптомных форм ВЭБ-инфекции в сравниваемых группах (11 случаев в группе вакцинированных против 9 в группе реципиентов плацебо), не имела статистической значимости. Это позволило сделать вывод о том, что кандидатный препарат защищает от развития инфекционного мононуклеоза, но не от бессимптомной ВЭБ-инфекции и сопряженных с ней заболеваний [35].

Позже было установлено, что помимо В-клеток, ВЭБ обладает тропностью также к эпителиальным клеткам и, возможно, к Т-лимфоцитам, при этом нейтрализующие антитела против gp350 не препятствуют проникновению вируса в иные клетки-мишени [12, 36].

Для преодоления ранее выявленных проблем учеными из Германии был предложен кандидатный вакцинный препарат на основе вирусоподобных частиц, имитирующих структуру родительского вируса, из которого удалена вирусная ДНК, но сохранены все структурные белки ВЭБ. Введение препарата мышам было сопряжено с развитием у них вирус-нейтрализующих гуморальных и клеточных иммунных реакций [37]. Однако в дальнейшем клинические испытания данного вакцинного кандидата не проводились.

В результате целого ряда последовательных исследований новыми кандидатами для разработки вакцин против ВЭБ стали поверхностные вирусные белки gH, gL, gB и gp42. Необходимо отметить, что гликопротеины gp350 и gp42 являются уникальными для ВЭБ [38], в то время как gH/gL и gB имеются у всех герпес-вирусов и участвуют в их слиянии с клетками [39]. В 2016 г. американские ученые сопоставили результаты иммунизации лабораторных животных комплексом рекомбинантных белков gH/gL, gB и gp350. У кроликов, иммунизированных gH/gL, gB, была отмечена выработка высоких титров вирус-нейтрализующих антител, которые блокировали проникновение ВЭБ в клетки лимфомы Беркитта и в В-клетки человека, в то время как введение gp350 предотвращало только заражение В-клеток [38].

В 2017 г. другая группа ученых из США [40] сообщила о результатах испытаний на животных кандидатных вакцинных препаратов, представляющих собой вирусоподобные частицы со встроенными белками ВЭБ. Всего было создано три типа комбинаций: gH/gL-EBNA1, gB-LMP2 и вирусоподобная частица, содержащая только gp350. Животных иммунизировали как отдельно взятыми комбинациями, так и их сочетаниями. Препараты вводили лабораторным мышам, после чего оценивали титры вирус-нейтрализующих антител и Т-клеточные реакции. Было показано, что сыворотка мышей, иммунизированных gH/gL-EBNA1, более эффективно нейтрализует ВЭБ, поскольку препятствует его проникновению как в эпителиальные, так и в В-клетки, в то время как иммунизация gp350 препятствует заражению исключительно В-клеток. Комбинация из вирусоподобных частиц, содержащих gH/gL-EBNA1 и gp350, привела к аддитивному эффекту, в то время как иные сочетания (gp350 с gB-LMP2 или gB-LMP2, gp350 и gH/gL-EBNA1) не обеспечили лучшего результата нейтрализации по сравнению с одиночными иммуногенами. Сочетания gH/gL-EBNA1 и gB-LMP2, напротив, поддерживали, а не блокировали инфекцию эпителиальных клеток [40].

В 2019 г. исследовательский коллектив из США, Японии и Малайзии сопоставил вирус-нейтрализующую активность человеческих антител к gp350, gH/gL и gp42. Было установлено, что в отношении инфекции В-клеток антитела к gp350 составляют от 50 % до 60 % от общей нейтрализующей активности, в то время как вклад антител к gH/gL и gp42 составляет только 15–20 %. Антитела к gp350 и gp42 никак не влияли на проникновение вируса в эпителиальные клетки. Напротив, антитела к gH/gL являлись основным компонентом нейтрализации эпителиоцитов, обеспечивая около 75 % от общей нейтрализующей активности. На основе этих данных было сконструировано два типа наночастиц, содержащих gH/gL и gH/gL/gp42, которые трехкратно вводили мышам. В течение 3,5 мес после вакцинации у животных обнаруживали высокие титры нейтрализующих антител, препятствующих проникновению ВЭБ в В-клетки и эпителиоциты. Аналогичные исследования, проведенные на макаках, показали, что вакцины на основе наночастиц, содержащих gH/gL и gH/gL/gp42, были высокоиммуногенными и вызывали выработку вирус-нейтрализующих антител, которые сохранялись в течение не менее 3 мес после вакцинации [41].

Еще один вакцинный кандидат, разработанный совместно учеными из США и Кении, объединил в себе сразу пять поверхностных гликопротеинов, встроенных в вирусоподобные частицы (gp350, gB, gp42, gH и gL). Новозеландских белых кроликов вакцинировали трехкратно, затем методом иммуноферментного анализа идентифицировали специфические антитела к каждому из гликопротеинов. Результатом вакцинации стала выработка антител, способных нейтрализовать ВЭБ *in vitro* как в В-клетках, так и в эпителиальных клетках. Результаты данного исследования опубликованы в 2020 г. [42].

Параллельно с разработкой профилактических вакцин идут исследования по созданию вакцин для иммунизации уже инфицированных ВЭБ лиц (терапевтических вакцин). Такие вакцины могут быть в дальнейшем использованы для экстренной иммунопрофилактики или лечения сопряженных с ВЭБ патологий [11, 36].

Индукция иммунного ответа на белки ВЭБ, которые экспрессируются вирусами уже через 12 ч после проникновения в клетку, позволит уничтожить любые вновь инфицированные клетки хозяина. В своих экспериментах J.M. Brooks и соавт. изучили Т-клеточные реакции на три белка (EBNA2, EBNA-LP и BHRF1), которые экспрессируются в течение первых 24–48 ч после проникновения вируса в В-клетки. В лабораторных условиях мононуклеарные клетки периферической крови стимулировали пептидными пулами этих белков и культивировали в среде в течение 7 дней до получения поликлональных популяций Т-клеток. Скрининг на распознавание Т-клетками пептидных субпопуляций проводился методом иммуноферментного анализа и показал, что только EBNA2 вызывает сильный CD8<sup>+</sup>-Т-клеточный ответ, что позволяет распознавать и убивать недавно инфицированные В-клетки на самых ранних стадиях индуцированной вирусом трансформации [43].

При разработке вакцин для лечения пациентов с назофарингеальной карциномой, ассоциированной с ВЭБ, рассматриваются комбинации латентных и литических белков. Так, в Великобритании была разработана терапевтическая вакцина, содержащая рекомбинантный ВЭБ. Целью иммунизации стало повышение иммунитета к опухолевым антигенам EBNA1 и LMP2. Вакцину вводили 16 пациентам с ВЭБ-положительной карциномой носоглотки трехкратно с трехнедельными интервалами между прививками. До иммунизации все пациенты получали региональную лучевую терапию, химиолучевую или адьювантную химиотерапию. У двух пациентов была отмечена явная стабилизация заболевания после вакцинации. Еще у двух пациентов вакцинация не имела клинического эффекта. В остальных случаях результат нельзя расценить однозначно. Тем не менее в ходе I фазы клинических испытаний авторы оценили безопасность и иммуногенность вакцинного препарата и предложили расширить когорту для клинических испытаний. Результаты исследования опубликованы в 2014 г. [44].

## ■ Литература

1. Соломай Т.В., Семененко Т.А., Иванова М.Ю. Роль Эпштейна–Барр вирусной инфекции и гепатитов В и С в патологии печени. Вопросы вирусологии. 2019; 64 (5): 215–20. DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220>
2. Соломай Т.В. Многолетняя динамика заболеваемости и территориальное распространение инфекционного мононуклеоза. Здравоохранение Российской Федерации. 2019; 63 (4): 186–92. DOI: <http://doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192>
3. Соломай Т.В., Семененко Т.А. Вирусные гепатиты В, С и инфекционный мононуклеоз: эпидемиологическое сходство и различия. Вопросы вирусологии. 2020; 65 (1): 27–34. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-27-34>

В 2019 г. группой ученых из Швейцарии, Великобритании, Германии и Австралии описаны результаты доклинических испытаний нескольких кандидатных вакцин, нацеленных на уничтожение опухолевых клеток Т-лимфоцитами. Поскольку CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клетки человека распознают EBNA1, именно этот белок был взят за основу. Наилучший результат показал препарат на основе аденовирусов, кодирующих EBNA1, усиленных модифицированным вектором на основе вируса осповакцины. В результате вакцинации мышей, которым предварительно были привиты опухоли, имеющие сходство с В-клеточной лимфомой Беркитта, был получен мощный CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеточный иммунный ответ, обеспечивающий защиту от Т- и В-клеточных лимфом, экспрессирующих антиген ВЭБ [45].

## Заключение

Результаты систематического обзора показали, что в настоящее время за рубежом ведется работа по созданию кандидатных вакцин против ВЭБ-инфекции, при этом отечественные исследования, посвященные разработке вакцин против данной инфекции, в литературе, отобранной в соответствии с заявленной стратегией поиска, отсутствуют.

На момент окончания поиска публикаций в соответствии с заявленной стратегией всего было найдено 10 работ, семь из них отображали результаты доклинических и клинических испытаний вакцин, нацеленных на предотвращение инфицирования ВЭБ. Еще три работы описывали кандидатные вакцины для иммунизации инфицированных ВЭБ индивидуумов для экстренной профилактики развития инфекции или лечения ВЭБ-ассоциированных опухолей.

Ни один из кандидатных вакцинных препаратов к настоящему времени не прошел все фазы клинических испытаний. Клинические испытания (I фаза) были проведены для двух кандидатных вакцин, одна из которых в последующем прошла II фазу. Однако полученные результаты не позволили продолжить испытания данной кандидатной вакцины.

**Вклад авторов.** Концепция и дизайн исследования – Соломай Т.В., Семененко Т.А., сбор и обработка материала – Соломай Т.В., Семененко Т.А., Филатов Н.Н.; написание текста – Соломай Т.В., Семененко Т.А.; редактирование – Костинов М.П., Ильина Н.И.

4. Ахматова Н.К., Калиниченко Е.О., Курбатова Е.А., Михайлова Н.А. Иммуногенность и протективная активность рекомбинантной вакцины против синегнойной инфекции. Иммунология. 2019; 40 (4): 23–8.
5. Гудима Г.О., Сидорович И.Г., Карамов Э.В., Хаитов Р.М. Современные стратегии биомедицинской профилактики ВИЧ-инфекции/СПИДа. Часть I. Анти-ВИЧ/СПИД-вакцины и антиретровирусная терапия. Иммунология. 2013, 34 (1): 4–9.
6. Гудима Г.О., Хаитов Р.М. Перспективы применения микроРНК и малых интерферирующих РНК для терапии ВИЧ-инфекции. Иммунология. 2018, 39 (2-3): 137–42.

7. Гудима Г.О., Хаитов Р.М. Молекулярно-биологические подходы к терапии ВИЧ-инфекции. перспективы применения технологий редактирования генома для элиминации ДНК ВИЧ-1 из инфицированных клеток. *Иммунология*. 2019, 40 (1): 44–51.
8. Finerty S., Tarlton J., Macket M. et al. Protective immunization against Epstein-Barr virus-induced disease in cottontop tamaris using the virus envelope glycoprotein gp340 produced from a bovin papillomavirus expression vector. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 449–53.
9. Johannsen E., Luftig M., Chase M.R., Weicksel S., Cahir-McFarland E., Illanes D., Sarracino D., Kieff E. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101 (46): 16 286–91. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0407320101>
10. Smatti M.K., Al-Sadeq D.W., Ali N.H., Pintus G., Abou-Saleh H., Nasrallah G.K. Epstein-Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population: an update. *Front. Oncol.* 2018; 8: 211. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00211>
11. van Zyl D.G., Mautner J., Delecluse H.J. Progress in EBV vaccines. *Front. Oncol.* 2019; 9: 104. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00104>
12. Lindsey M., Hutt-Fletcher. Epstein-Barr virus entry. *J. Virol.* 2007; 81 (15): 7825–32. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00445-07>
13. Hutt-Fletcher L. Epstein-Barr Virus Glycoproteins and their Roles in Virus Entry and Egress. In: Holzenburg A., Bogner E. (eds). *Structure-Function Relationships of Human Pathogenic Viruses*. Boston, MA : Springer, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1007/0-306-47650-9\\_1](https://doi.org/10.1007/0-306-47650-9_1)
14. Лебедева Е.С., Атауллаханов Р.И., Хаитов Р.М. Вакцины для лечения злокачественных новообразований. *Иммунология*. 2019; 40 (4): 64–76.
15. Moss D.J., Lutzky V.P. EBV-specific immune response: early research and personal reminiscences. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 390 (pt 1): 23–42. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_3)
16. Santpere G., Darre F., Blanco S., Alcami A., Villoslada P., Mar Albà M. et al. Genome-wide analysis of wild-type Epstein-Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1,000 genomes project. *Genome Biol. Evol.* 2014; 6 (4): 846–60. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evu054>
17. Klinke O., Feederle R., Delecluse H.J. Genetics of Epstein-Barr virus microRNAs. *Semin. Cancer Biol.* 2014; 26: 52–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.02.002>
18. Pimienta G., Fok V., Haslip M., Nagy M., Takyar S., Steitz J.A. Proteomics and transcriptomics of BJAB cells expressing the Epstein-Barr virus noncoding RNAs EBER1 and EBER2. *PLoS One*. 2015; 10 (6): e0124638. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124638>
19. Münz C. (ed.). *Epstein-Barr Virus. Vol. 1 – One Herpes Virus: Many Diseases*. Switzerland : Springer, 2015.
20. Tzellos S., Farrell P.J. Epstein-Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens*. 2012; 1 (2): 156–74. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens1020156>
21. Delecluse H.J., Bartnikze S., Hammerschmidt W., Bullerdiek J., Bornkamm G.W. Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J. Virol.* 1993; 67 (3): 1292–9.
22. Kempkes B., Robertson E.S. Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives. *Curr. Opin. Virol.* 2015; 14: 138–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.007>
23. Mawanda O.W. Aspects of epidemiological and clinical features of patients with central nervous system Burkitt's lymphoma in Kenya. *East Afr. Med. J.* 2004; 8: 97–103.
24. Mawanda O.W. Clinical characteristics of Burkitt's lymphoma seen in Kenyan patients. *East Afr. Med. J.* 2004; 8: 78–89.
25. Mehta S.K., Bloom D.C., Plante I., Stowe R., Feiveson A.H., Renner A., Dhummakupt A., Markan D., Zhang Y., Wu H., Scoles B., Cohen J.I., Crucian B., Pierson D.L. Reactivation of latent Epstein-Barr virus: a comparison after exposure to gamma, proton, carbon, and iron radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19 (10): E2961. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19102961>
26. Koning M.T., Brik T., Hagenbeek R., van den Wijngaard I.A. A case of fulminant Epstein-Barr virus encephalitis in an immunocompetent adult. *J. Neurovirol.* 2019; 25 (3): 422–5. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13365-018-0718-1>
27. Buschle A., Hammerschmidt W. Epigenetic lifestyle of Epstein-Barr virus. *Semin. Immunopathol.* 2020; 42 (2): 131–42. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00792-2>
28. Fagin U., Nerbas L., Vogl B., Jabs W.J. Analysis of BZLF1 mRNA detection in saliva as a marker for active replication of Epstein-Barr virus. *J. Virol. Methods*. 2017; 244: 11–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.02.016>
29. Kim Y., Kim H.S., Park J.S., Kim C.J., Kim W.H. Identification of Epstein-Barr virus in the human placenta and its pathologic characteristics. *J. Korean Med. Sci.* 2017; 32 (12): 1959–66. DOI: <https://doi.org/10.3346/jkms.2017.32.12.1959>
30. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Гудима Г.О., Кофиади И.А. Аллельные варианты генов человека, затрагивающие внутриклеточный жизненный цикл ВИЧ и регулирующие иммунный ответ на ВИЧ-инфекцию. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019, 18 (1): 119–30.
31. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Кофиади И.А., Гудима Г.О. Генетические факторы, влияющие на проникновение ВИЧ в клетку-мишень. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18(1): 131–41.
32. Hoffman G.J., Lazarowitz S.G., Hayward S.D. Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1980; 77: 2979–83.
33. Rühl J., Leung C.S., Münz C. Vaccination against the Epstein-Barr virus. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020 May 4. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03538-3>
34. Moutschen M., Léonard P., Sokal E.M., Smets F., Haumont M., Mazzu P., Bollen A., Denamur F., Peeters P., Dubin G., Denis M. Phase I/II studies to evaluate safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein-Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine*. 2007; 25 (24): 4697–705.
35. Sokal E.M., Hoppenbrouwers K., Vandermeulen C., Moutschen M., Léonard Ph., Moreels A., Haumont M., Bollen A., Smets F., Denis M. Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* 2007; 196 (12): 1749–53. DOI: <https://doi.org/10.1086/523813>
36. Cohen J.I. Vaccine development for Epstein-Barr virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018; 1045: 477–93. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7\\_22](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_22)
37. Ruiss R., Jochum S., Wanner G., Reisbach G., Hammerschmidt W., Zeidler R.A. Virus-like particle-based Epstein-Barr virus vaccine. *J. Virol.* 2011; 85 (24): 13 105–13. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.05598-11>
38. Cui X., Cao Z., Chen Q., Arjunaraja S., Snow A.L., Snapper C.M. Rabbits immunized with Epstein-Barr virus gH/gL or gB recombinant proteins elicit higher serum virus neutralizing activity than gp350. *Vaccine*. 2016; 34 (34): 4050–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.021>
39. Cohen J.I. Epstein-Barr virus vaccines. *Clin. Transl. Immunol.* 2015; 4: e32.
40. Perez E.M., Foley J., Tison T., Silva R., Ogembo J.G. Novel Epstein-Barr virus-like particles incorporating gH/gL-EBNA1 or gB-LMP2 induce high neutralizing antibody titers and EBV-specific T-cell responses in immunized mice. *Oncotarget*. 2017; 8 (12): 19 255–73. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13770>
41. Bu W., Joyce M.G., Nguyen H., Banh D.V., Aguilar F., Tariq Z., Yap M.L., Tsujimura Y., Gillespie R.A., Tsybovsky Y., Andrews S.F., Narpala S.R., McDermott A.B., Rossmann M.G., Yasutomi Y., Nabel G.J., Kanekiyo M., Cohen J.I. Immunization with components of the viral fusion apparatus elicits antibodies that neutralize Epstein-Barr virus in B cells and epithelial cells. *Immunity*. 2019; 50 (5): 1305–16. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.010>
42. Escalante G.M., Foley J., Mutsunguma L.Z., Rodriguez E., Mulama D.H., Muniraju M., Ye P., Barasa A.K., Ogembo J.G. A pentavalent Epstein-Barr virus-like particle vaccine elicits high titers of neutralizing antibodies against Epstein-Barr virus infection in immunized rabbits. *Vaccines*. 2020; 8(169): 1–18. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines8020169>
43. Brooks J.M., Long H.M., Tierney R.J., Shannon-Lowe C., Leese A.M., Fitzpatrick M., Taylor G.S., Rickinson A.B. Early T cell recognition of B cells following Epstein-Barr virus infection: identifying potential targets for prophylactic vaccination. *PLoS Pathog.* 2016; 12 (4): e1005549. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005549>
44. Taylor G.S., Jia H., Harrington K., Lee L.W., Turner J., Laddell K., Price D.A., Tanday M., Matthews J., Roberts C., Edwards C., McGuigan L., Hartley A., Wilson S., Hui E.P., Chan A.T.C., Rickin-

son A.B., Steven N.M. A recombinant modified vaccinia Ankara vaccine encoding Epstein-Barr virus (EBV) target antigens: a phase I trial in UK patients with EBV-positive cancer. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20 (19): 5009–22. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1122-T>

## References

- Solomay T.V., Semenenko T.A., Ivanova M.Yu. The role of Epstein-Barr viral infection and hepatitis B and C in liver pathology. *Voprosy virusologii.* 2019; 64 (5): 215–20. DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220> (in Russian)
- Solomay T.V. Dynamics of morbidity and territorial spread of infectious mononucleosis. *Zdravookhranenie Rossiiskoy Federatsii.* 2019; 63 (4): 186–92. DOI: <http://doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192> (in Russian)
- Solomay T.V., Semenenko T.A. Viral hepatitis B, C and infectious mononucleosis: epidemiological similarities and differences. *Voprosy virusologii.* 2020; 65 (1): 27–34. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-27-34> (in Russian)
- Ahmatova N.K., Kalinichenko E.O., Kurbatova E.A., Mihaylova N.A. Immunogenicity and protective activity of recombinant vaccine against *Pseudomonas* infection. *Immunologiya.* 2019; 40 (4): 23–8. (in Russian)
- Gudima G.O., Sidorovich I.G., Karamov E.V., Khaitov R.M. Modern strategies of biomedical HIV/AIDS prevention. Part I. HIV/AIDS vaccines and antiretroviral therapy. *Immunologiya.* 2013; 34 (1): 4–9. (in Russian)
- Gudima G.O., Khaitov R.M. Perspectives of microRNA and small interfering RNA usage for HIV infection therapy. *Immunologiya.* 2018; 39 (2-3): 137–42 (in Russian)
- Gudima G.O., Khaitov R.M. Molecular biological approaches to HIV infection therapy. perspectives of usage of genome editing technologies for HIV DNA elimination from infected cells. *Immunologiya.* 2019; 40 (1): 44–51. (in Russian)
- Finerty S., Tarlton J. Macket M., et al. Protective immunization against Epstein-Barr virus-induced disease in cotton-top tamarisk using the virus envelope glycoprotein gp340 produced from a bovine papillomavirus expression vector. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 449–53.
- Johannsen E., Luftig M., Chase M.R., Weicksel S., Cahir-McFarland E., Illanes D., Sarracino D., Kieff E. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004; 101 (46): 16 286–91. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0407320101>
- Smatti M.K., Al-Sadeq D.W., Ali N.H., Pintus G., Abou-Saleh H., Nasrallah G.K. Epstein-Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population: an update. *Front. Oncol.* 2018; 8: 211. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00211>
- van Zyl D.G., Mautner J., Delecluse H.J. Progress in EBV vaccines. *Front. Oncol.* 2019; 9: 104. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00104>
- Lindsey M. Hutt-Fletcher. Epstein-Barr virus entry. *J. Virol.* 2007; 81 (15): 7825–32. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00445-07>
- Hutt-Fletcher L. Epstein-Barr Virus Glycoproteins and their Roles in Virus Entry and Egress. In: Holzenburg A., Bogner E. (eds). *Structure-Function Relationships of Human Pathogenic Viruses.* Boston, MA: Springer, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1007/0-306-47650-9\\_1](https://doi.org/10.1007/0-306-47650-9_1)
- Lebedeva E.S., Ataullakhanov R.I., Khaitov R.M. Vaccines for the treatment of malignant neoplasms. *Immunologiya.* 2019; 40 (4): 64–76
- Moss D.J., Lutzky V.P. EBV-specific immune response: early research and personal reminiscences. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 390 (pt 1): 23–42. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_3)
- Santpere G., Darre F., Blanco S., Alcami A., Villoslada P., Mar Albà M., et al. Genome-wide analysis of wild-type Epstein-Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1,000 genomes project. *Genome Biol. Evol.* 2014; 6 (4): 846–60. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evu054>
- Klinke O., Feederle R., Delecluse H.J. Genetics of Epstein-Barr virus microRNAs. *Semin. Cancer Biol.* 2014; 26: 52–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.02.002>
- Pimienta G., Fok V., Haslip M., Nagy M., Takyar S., Steitz J.A. Proteomics and transcriptomics of BJAB cells expressing the Epstein-Barr virus noncoding RNAs EBER1 and EBER2. *PLoS*

45. Rühl J., Citterio C., Engelmann C., Haigh T., Dzionek A., Dreyer J., Khanna R., Taylor G.S., Wilson J.B., Leung C.S., Münz C. Heterologous prime-boost vaccination protects against EBV antigen-expressing lymphomas. *J. Clin. Invest.* 2019; 129 (5): 2071–87. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI125364>

- 2015; 10 (6): e0124638. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124638>
- Münz C. (ed.). *Epstein-Barr Virus. Vol. 1 – One Herpes Virus: Many Diseases.* Switzerland: Springer, 2015.
- Tzellos S., Farrell P.J. Epstein-Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens.* 2012; 1 (2): 156–74. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens1020156>
- Delecluse H.J., Bartnikze S., Hammerschmidt W., Bullerdiek J., Bornkamm G.W. Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J. Virol.* 1993; 67 (3): 1292–9.
- Kempkes B., Robertson E.S. Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives. *Curr. Opin. Virol.* 2015; 14: 138–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.007>
- Mawanda O.W. Aspects of epidemiological and clinical features of patients with central nervous system Burkitt's lymphoma in Kenya. *East Afr. Med. J.* 2004; 8: 97–103.
- Mawanda O.W. Clinical characteristics of Burkitt's lymphoma seen in Kenyan patients. *East Afr. Med. J.* 2004; 8: 78–89.
- Mehta S.K., Bloom D.C., Plante I., Stowe R., Feiveson A.H., Renner A., Dhummakupt A., Markan D., Zhang Y., Wu H., Scoles B., Cohen J.I., Crucian B., Pierson D.L. Reactivation of latent Epstein-Barr virus: a comparison after exposure to gamma, proton, carbon, and iron radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19 (10): E2961. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19102961>
- Koning M.T., Brik T., Hagenbeek R., van den Wijngaard I.A. A case of fulminant Epstein-Barr virus encephalitis in an immune-competent adult. *J. Neurovirol.* 2019; 25 (3): 422–5. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13365-018-0718-1>
- Buschle A., Hammerschmidt W. Epigenetic lifestyle of Epstein-Barr virus. *Semin. Immunopathol.* 2020; 42 (2): 131–42. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00792-2>
- Fagin U., Nerbas L., Vogl B., Jabs W.J. Analysis of BZLF1 mRNA detection in saliva as a marker for active replication of Epstein-Barr virus. *J. Virol. Methods.* 2017; 244: 11–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.02.016>
- Kim Y., Kim H.S., Park J.S., Kim C.J., Kim W.H. Identification of Epstein-Barr virus in the human placenta and its pathologic characteristics. *J. Korean Med. Sci.* 2017; 32 (12): 1959–66. DOI: <https://doi.org/10.3346/jkms.2017.32.12.1959>
- Khaitov R.M., Alexeev L.P., Gudima G.O., Kofiadi I.A. Allelic variants of human genes affecting HIV intracellular life cycle and regulating immune response to HIV infection. *Byulleten' sibirskoy meditsiny.* 2019; 18 (1): 119–30. (in Russian)
- Khaitov R.M., Alexeev L.P., Gudima G.O., Kofiadi I.A. Genetic factors influencing HIV entry into target cells. *Byulleten' sibirskoy meditsiny.* 2019; 18 (1): 131–41. (in Russian)
- Hoffman G.J., Lazarowitz S.G., Hayward S.D. Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1980; 77: 2979–83.
- Rühl J., Leung C.S., Münz C. Vaccination against the Epstein-Barr virus. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020 May 4. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03538-3>
- Moutschen M., Léonard P., Sokal E.M., Smets F., Haumont M., Mazzu P., Bollen A., Denamur F., Peeters P., Dubin G., Denis M. Phase I/II studies to evaluate safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein-Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine.* 2007; 25 (24): 4697–705.
- Sokal E.M., Hoppenbrouwers K., Vandermeulen C., Moutschen M., Léonard Ph., Moreels A., Haumont M., Bollen A., Smets F., Denis M. Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* 2007; 196 (12): 1749–53. DOI: <https://doi.org/10.1086/523813>
- Cohen J.I. Vaccine development for Epstein-Barr virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018; 1045: 477–93. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7\\_22](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_22)

37. Ruiss R., Jochum S., Wanner G., Reisbach G., Hammer-schmidt W., Zeidler R.A. Virus-like particle-based Epstein-Barr virus vaccine. *J. Virol.* 2011; 85 (24): 13 105–13. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.05598-11>

38. Cui X., Cao Z., Chen Q., Arjunaraja S., Snow A.L., Snapper C.M. Rabbits immunized with Epstein-Barr virus gH/gL or gB recombinant proteins elicit higher serum virus neutralizing activity than gp350. *Vaccine.* 2016; 34 (34): 4050–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.06.021>

39. Cohen J.I. Epstein-Barr virus vaccines. *Clin. Transl. Immunol.* 2015; 4: e32.

40. Perez E.M., Foley J., Tison T., Silva R., Ogembo J.G. Novel Epstein-Barr virus-like particles incorporating gH/gL-EBNA1 or gB-LMP2 induce high neutralizing antibody titers and EBV-specific T-cell responses in immunized mice. *Oncotarget.* 2017; 8 (12): 19 255–73. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13770>

41. Bu W., Joyce M.G., Nguyen H., Banh D.V., Aguilar F., Tariq Z., Yap M.L., Tsujimura Y., Gillespie R.A., Tsybovsky Y., Andrews S.F., Narpala S.R., McDermott A.B., Rossmann M.G., Yasutomi Y., Nabel G.J., Kanekiyo M., Cohen J.I. Immunization with components of the viral fusion apparatus elicits antibodies that neutralize Epstein-Barr virus in B cells and epithelial cells. *Immunity.* 2019; 50 (5): 1305–16. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.010>

42. Escalante G.M., Foley J., Mutsunguma L.Z., Rodriguez E., Mulama D.H., Muniraju M., Ye P., Barasa A.K., Ogembo J.G. A pentavalent Epstein-Barr virus-like particle vaccine elicits high titers of neutralizing antibodies against Epstein-Barr virus infection in immunized rabbits. *Vaccines.* 2020; 8(169): 1–18. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines8020169>

43. Brooks J.M., Long H.M., Tierney R.J., Shannon-Lowe C., Leese A.M., Fitzpatrick M., Taylor G.S., Rickinson A.B. Early T cell recognition of B cells following Epstein-Barr virus infection: identifying potential targets for prophylactic vaccination. *PLoS Pathog.* 2016; 12 (4): e1005549. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005549>

44. Taylor G.S., Jia H., Harrington K., Lee L.W., Turner J., Ladell K., Price D.A., Tandy M., Matthews J., Roberts C., Edwards C., McGuigan L., Hartley A., Wilson S., Hui E.P., Chan A.T.C., Rickinson A.B., Steven N.M. A recombinant modified vaccinia Ankara vaccine encoding Epstein-Barr virus (EBV) target antigens: a phase I trial in UK patients with EBV-positive cancer. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20 (19): 5009–22. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1122-T>

45. Rühl J., Citterio C., Engelmann C., Haigh T., Dzionek A., Dreyer J., Khanna R., Taylor G.S., Wilson J.B., Leung C.S., Münz C. Heterologous prime-boost vaccination protects against EBV antigen-expressing lymphomas. *J. Clin. Invest.* 2019; 129 (5): 2071–87. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI125364>

## Сведения об авторах

**Соломай Татьяна Валерьевна** – к.м.н., заместитель руководителя Межрегионального управления № 1 ФМБА России; старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» Минобрнауки России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [solomay@rambler.ru](mailto:solomay@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>

**Семенов Татьяна Анатольевна** – д.м.н., проф., руководитель отдела эпидемиологии ФГБУ НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России; проф. кафедры инфектологии и вирусологии ИПО ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация; e-mail: [semenenko@gamaleya.org](mailto:semenenko@gamaleya.org), <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

**Филатов Николай Николаевич** – д.м.н., проф., член-корр. РАН, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» Минобрнауки России; заведующий кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация; e-mail: [n.n.filatov@yandex.ru](mailto:n.n.filatov@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0003-4857-9624>

**Костин Михаил Петрович** – д.м.н., проф., заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» Минобрнауки России; проф. кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация; e-mail: [monolit.96@mail.ru](mailto:monolit.96@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1382-9403>

**Ильина Наталья Ивановна** – д.м.н., проф., заместитель директора по клинической работе ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: [instimmun@yandex.ru](mailto:instimmun@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3556-966X>

## Authors' information

**Tatiana V. Solomay** – PhD, Deputy Head of Interregional Department No 1 of the FMBA of Russia; Senior researcher of Laboratory of Epidemiological Analysis and Monitoring of Infectious Diseases, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera of the MSHE of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [solomay@rambler.ru](mailto:solomay@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>

**Tatiana A. Semenenko** – MD, Prof., Head of the Department of Epidemiology, N.F. Gamaleya FRCEM of the MOH of Russia; Prof. of the Department of Infectology and Virology of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University MOH of Russia (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; e-mail: [semenenko@gamaleya.org](mailto:semenenko@gamaleya.org), <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

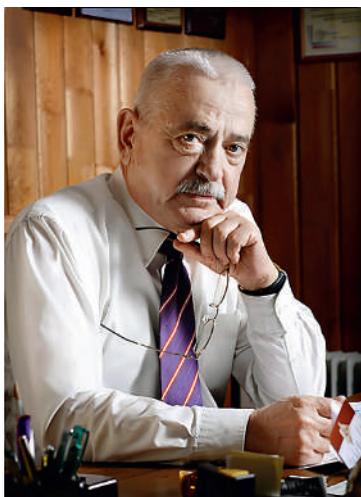
**Nikolay N. Filatov** – MD, Prof., corr. member of RAS, Deputy Director for Research of I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera of the MSHE of Russia; Head of the Department of Epidemiology and Modern Technologies of Vaccination of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University MOH of Russia (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; e-mail: [n.n.filatov@yandex.ru](mailto:n.n.filatov@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0003-4857-9624>

**Mihail P. Kostinov** – MD, Prof., Head of Laboratory of Vaccination and Immunotherapy of I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera of the MSHE of Russia; Prof. of the Department of Epidemiology and Modern Technologies of Vaccination of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University MOH of Russia (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; e-mail: [monolit.96@mail.ru](mailto:monolit.96@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1382-9403>

**Natalia I. Iina** – MD, Prof., Deputy Director for clinical work, NRC – Institute of Immunology of the FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: [instimmun@yandex.ru](mailto:instimmun@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3556-966X>

## Владимир Александрович КОЗЛОВ

### К 80-летию со дня рождения



20 июля 2020 г. исполнилось 80 лет со дня рождения **Владимира Александровича Козлова** – одного из крупнейших советских и российских иммунологов, академика Российской академии наук, профессора, доктора медицинских наук, заведующего кафедрой клинической иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета, научного руководителя НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ), заведующего лабораторией клинической иммунопатологии этого же института.

В.А. Козлов родился в Новосибирске. В 1963 г. Владимир Александрович окончил Новосибирский государственный медицинский институт. С 1963 г. он последовательно прошел путь ординатора, аспиранта, младшего и старшего научного сотрудника, заведующего лабораторией, заместителя директора по научной работе, директора института, заместителя председателя Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.

В 1969 г. Владимир Александрович защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по теме «Постэмбриональные и пострадиационные сдвиги в иммунокомпетентной ткани животных разных генотипов», в 1981 г. им была защищена докторская диссертация на тему «Гуморально-клеточные уровни регуляции основных этапов антителогенеза». В 1986 г. ему было присвоено ученое звание «профессор» по специальности «Аллергология и иммунология». В 1994 г. В.А. Козлов был избран членом-корреспондентом РАМН по специальности «Иммунология», в 2002 г. – действительным членом (академиком) Российской академии медицинских наук по специальности «Иммунология». В настоящее время В.А. Козлов – академик Российской академии наук.

С именем В.А. Козлова связано развитие фундаментальных исследований в области регуляции иммунного гомеостаза во взаимодействии с нервной, эндокринной и кроветворной системами в норме и патологии.

В.А. Козлов внес большой вклад в развитие экспериментальной иммунологии. Им были выявлены разнонаправленные конкурентные механизмы регуляции, пролиферации и дифференцировки стволовых кроветворных клеток, а также впервые в мире выдвинута и обоснована гипотеза об участии полипотентных стволовых кроветворных клеток в формировании иммунного ответа.

Впервые в мире В.А. Козловым с сотрудниками описаны иммунорегуляторные функции эритроидных клеток. По результатам этих исследований в 1990 г. Госкомитетом СССР по делам изобретений зарегистрировано открытие «Явление регуляции гуморального иммунного ответа гетерогенной популяцией клеток эритроидного ряда». Впоследствии из эритробластов был выделен иммунодепрессивный фактор, обладающий ингибирующим эффектом на пролиферацию В-лимфоцитов.

Под руководством В.А. Козлова разработан новый иммуноактивный препарат, не имеющий аналогов в России и за рубежом, Нб $\beta$  (цепь гемоглобина) – со свойствами модулятора эритро- и иммунопоеза. Также обоснована возможность применения нового ингибитора пролиферации стволовых кроветворных клеток (Нб $\beta$ , а также входящего в его состав пептида PN951) в качестве химиопротекторного средства.

В настоящее время под руководством В.А. Козлова инициированы и успешно ведутся работы по созданию принципиально нового класса препаратов для лечения основных заболеваний человека на основе биомедицинских клеточных продуктов. В этом направлении разрабатываются подходы к использованию в качестве клеточных продуктов не только стволовых клеток, но и различных популяций клеток иммунной системы (дендритно-клеточные и Т-клеточные вакцины, цитотоксические Т-клетки, М2-макрофаги и др.).

В.А. Козловым создана школа высококвалифицированных специалистов в области иммунологии. Им

подготовлены более 70 докторов и кандидатов наук. В течение ряда лет В.А. Козлов является председателем диссертационного совета Д.001.01.01 при НИИФКИ, главным редактором научных журналов «Клеточная трансплантология и тканевая инженерия» и «Традиционная медицина. Восток и Запад», заместителем главного редактора журналов «Цитокины и воспаление» и «Российский иммунологический журнал», членом редакционных коллегий и советов журналов «Сибирский научный медицинский журнал», «Медицинская иммунология», «Аллергология и иммунология», «Клеточные технологии в биологии и медицине», «Иммунология».

В.А. Козлов является почетным вице-президентом Российского научного общества иммунологов, вице-президентом Education Instruction Committee of World Federation of Chinese Medicine Societies, почетным членом The World Immunopathology Organization (WIPO), приглашенным профессором в Тяньцзинском университете традиционной китайской медицины.

Огромны заслуги В.А. Козлова в преподавании иммунологии и усилиях выделить иммунологию в самостоятельную научную дисциплину. Он является

заведующим кафедрой клинической иммунологии в Новосибирском государственном медицинском университете и инициатором создания курсов «Иммунология и клеточные технологии» в этом же университете.

В.А. Козлов – автор и соавтор более 1200 научных публикаций, в том числе 14 монографий, 5 руководств и учебников. Им получено 34 патента, 9 авторских свидетельств, 1 диплом на открытие.

Владимир Александрович удостоен премии РАМН им. Н.И. Пирогова и Государственной премии Правительства Российской Федерации в области образования, награжден почетным знаком им. акад. В.И. Йоффе и золотой медалью Российского научного общества иммунологов, является кавалером золотого почетного знака «Общественное признание», имеет почетное звание «Заслуженный ветеран Сибирского отделения РАН», отмечен знаками отличия «За заслуги перед Новосибирской областью» и «Отличник здравоохранения».

*Редакция журнала «Иммунология» поздравляет академика В.А. Козлова с юбилеем и желает ему творческого долголетия и активной работы на благо развития фундаментальной и клинической иммунологии!*