

**КГМА – ФИЛИАЛ ФГБОУ ДПО РМАНПО МИНЗДРАВА РОССИИ  
KSMA – BRANCH CAMPUS OF THE FSBEI FPE RMACPE MOH RUSSIA**



**СБОРНИК ТРУДОВ  
VIII Международной научно-практической конференции  
«НОВЫЕ КОНЦЕПЦИИ МЕХАНИЗМОВ ВОСПАЛЕНИЯ,  
АУТОИММУНИТЕТА И ИНФЕКЦИЙ»  
Казань, Татарстан  
31 мая 2022 г.**

**The VIIIth International Meeting  
"NEW CONCEPTS ON THE MECHANISMS  
OF INFLAMMATION, AUTOIMMUNITY AND INFECTION"  
Kazan, Tatarstan, Russia  
May, 31, 2022**

Казань, 2022  
Kazan, 2022

**УДК 616-002(082)**  
**ББК 53.01**  
**В 78**

**Главный редактор:**  
Д.м.н., член-корр., профессор **Р.Ш. Хасанов**

**Редакционный совет:**  
к.м.н. **Г.М. Ахмедова,**  
к.б.н. **К.С. Хаертынов,**  
к.м.н. **М.И. Арлеевская,**  
к.б.н. **А.Г. Габдулхакова**  
к.б.н. **А.В. Валеева**  
к.в.н. **Э.А. Шуралев**

**Рецензенты:**  
д.б.н. **А.А. Набатов,**  
д.б.н. **М.Н. Мукминов**

**Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунитета инфекций:**  
Сборник трудов VIII международной науч.-практ. конф.  
(Казань, 31 мая 2022 г.). – Казань: Редакционно-издательский отдел, 2022. – 108 с.

В сборник включены материалы по итогам научной работы научных, научно-педагогических работников, аспирантов, соискателей, молодых ученых. Адресован специалистам в области фундаментальной и клинической медицины, биологии, биотехнологии, фармации, ветеринарии, физиологии.

ISBN 978-5-9500386-9-3

© КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО  
Минздрава России

## СОДЕРЖАНИЕ

ФАКТОРЫ РИСКА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ ТУБЕРКУЛЕЗА (RISK FACTORS ASSOCIATED WITH DRUG-RESISTANT TB) <i>Абильбаева А.А., Тарабаева А.С., Охас И.М., Куашова Д.К., Абубакиров А.Я., Шуралев Э.А.</i>	7
ФАКТОРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С УДЛИНЕНИЕМ СРОКОВ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ БОЛЬНЫХ COVID-19 (FACTORS ASSOCIATED WITH PROLONGED HOSPITALIZATION OF COVID-19 PATIENTS) <i>Абильбаева А.А., Тарабаева А.С., Идрисова Г.М., Дуйсенова А.К., Егембердиева Р.А.</i>	13
IDENTIFICATION OF MOLECULAR AND GENETIC PREDICTORS OF POLYP FORMATION IN PATIENTS WITH CHRONIC RHINOSINUSITIS <i>Ashchina L.A., Baranova N.I.</i>	18
ВЫЯВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛИПОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ РИНОСИНУСИТОМ <i>Ащина Л.А., Баранова Н.И.</i>	19
ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И ИСХОД COVID-19 У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ, ПОЛУЧАВШИХ ТОЦИЛИЗУМАБ <i>Бижигитова Б.Б., Ахметова Ж.С., Битанова Э.Ж.</i>	22
ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ-РЕГУЛЯТОРОВ АУТОФАГИИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ДЕКСАМЕТАЗОНА В ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЫ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ <i>Богомазова А.А., Ибрагимов Б.Р., Скибо Ю. В., Абрамова З.И.</i>	26
THE ROLE OF CYTOKINE IMBALANCE AND PHAGOCYTE KILLING DEFECT AS PREDICTORS OF SEVERE COVID-19 <i>Bolgova A.I., Lesina O.N., Baranova N.I., Ashchina L.A.</i>	27
РОЛЬ ДИСБАЛАНСА ЦИТОКИНОВ И ДЕФЕКТА КИЛЛИНГА ФАГОЦИТОВ КАК ПРЕДИКТОРОВ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ COVID-19 <i>Болгова А.И., Лесина О.Н., Баранова Н.И., Ащина Л.А.</i>	29
ОСОБЕННОСТИ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ Т-ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ТИРЕОИДИТОМ <i>Бурцева А. В., Абрамова З. И.</i>	31
CLINICAL LABORATORY PARAMETERS OF ACUTE SARS-COV-19 INFECTION - PREDICTORS OF THE DEVELOPMENT OF THE ARTICULAR SYNDROME IN THE POST-COVID PERIOD. <i>Byvaltsev K., Larionova R., Takha E., Petrov S., Kazarian G., Valeeva A., Shuralev E., Mukminov M., Renaudineau Y., Arleevskaya M.</i>	33

КЛИНИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОСТРОЙ SARS-COV-19 ИНФЕКЦИИ – ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ СУСТАВНОГО СИНДРОМА В ПОСТКОВИДНЫЙ ПЕРИОД <i>Бывальцев К.А., Ларионова Р.В., Таха Е.А., Петров С.В., Казарян Г.Г., Валеева А.Р., Шуралёв Э.А., Мукминов М.Н., Ренадино И., Арлеевская М.И.</i>	33
АНАЛИЗ МИКРОБИОМА СЛИЗИСТОЙ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ СРЕДИ ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ <i>Дисюк Е. А., Лисовская С.А., Каюмов А. Р.</i>	36
ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМ СИНДРОМОМ <i>Жаранкова Ю.С., Скибо Ю.В., Гурьянова И.Е., Полякова Е. А., Абрамова З.И., Белевцев М.В.</i>	39
ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЕЙ ПИЩЕВЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССОВ G И E У РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ КАТЕГОРИЙ <i>Камальдинова Д.Р., Сынбулатова Г.Э., Сенина А.М., Решетник О.А., Григорьева Т.В.</i>	40
СТРЕСС КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА <i>Капитонова Н.В. , Коровина М.О., Арлеевская М.И.</i>	45
BACTERIAL BIOFILMS: INFLUENCE OF BIOCHEMICAL COMPOSITION OF THE EXTRACELLULAR MATRIX IN INTERACTION WITH ANTIBIOTICS <i>Karimova A. V., Trizna E.Y.</i>	47
БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ: ЗНАЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В СПЕЦИФИКЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С АНТИМИКРОБНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ <i>Каримова А. В., Тризна Е.Ю.</i>	48
POLYMORPHISMS IN THE GENES OF PATTERN-RECOGNITION TOLL-LIKE RECEPTORS AFFECTED THE SUSCEPTIBILITY TO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS <i>Korovina M.O., Khaertynov K.S., Gabdulkhakova A.G.</i>	49
ПОИСК ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ПАТТЕРН-РАСПОЗНАЮЩИХ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ВОСПРИИМЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА К МИКОБАКТЕРИИ ТУБЕРКУЛЕЗА <i>Коровина М. О., Хаертынов К.С., Габдулхакова А.Г.</i>	50
HETEROGENEITY OF GENOME-WIDE RNA EXPRESSION PROFILES IN PRIMATE SKELETAL MUSCLES <i>Larionova A.M., Devyatiyarov R.M., Shagimardanova E.I., Gusev O.A.</i>	57
ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ РНК В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ПРИМАТОВ <i>Ларионова А.М., Десятяров Р.М., Шагимарданова Е.И., Гусев О.А.</i>	58

PATHOGENETIC AND CLINICAL RELATIONSHIP BETWEEN IL-1B AND IL-8 IN MELANOMA <i>Malkova A., Orlova R., Zhukova N., Kaledina E., Demchenkova A., Naimushina P., Sharoyko V.</i>	59
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ IL-1B И IL-8 ПРИ МЕЛАНОМЕ <i>Малкова А., Орлова Р., Жукова Н., Каледина Е., Демченкова А., Наймушина П., Шаройко В.</i>	62
ОЦЕНКА СИНЕРГИЗМА НОВОГО БАКТЕРИОФАГА Ka1 ИЗ СЕМЕЙСТВА PODOVIRIDAE С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ В ОТНОШЕНИИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA В СОСТАВЕ БИОПЛЁНОК <i>Палагина В.Г., Гатина А.Э., Каюмов А. Р., Семёнова В.Н., Горшкова А.С., Дрюккер В.В.</i>	66
DIFFERENTIAL EFFECT OF SMALL AND LARGE IMMUNE COMPLEXES CONTAINING HSV-1 AND 2 ANTIGENS ON NEUTROPHILS AND MONOCYTES <i>Poghosyan David, Margaryan Sona, Larionova Regina, Arleevskaya Marina, Manukyan Gayane</i>	68
ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ НОВОГО БАКТЕРИОФАГА Ka2 ИЗ СЕМЕЙСТВА MYOVIRIDAE В ОТНОШЕНИИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA В СОСТАВЕ БИОПЛЁНОК <i>Семёнова В.Н., Гатина А.Э., Палагина В.Г., Горшкова А.С., Дрюккер В.В., Каюмов А.Р.</i>	69
FEATURES OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNOPATOLOGICAL MECHANISMS OF PSYCHIATRIC DISORDERS ASSOCIATED WITH HASHIMOTO THYROIDITIS <i>Sobolevskaia P.A., Kudryavtsev I.V., Churilov L.P.</i>	70
ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНЫХ И ГУМОРАЛЬНЫХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ТИРОИДИТОМ ХАСИМОТО <i>Соболевская П.А., Кудрявцев И.В., Чурилов Л.П.</i>	74
FEATURES OF ANTIGEN-SPECIFIC IL-2 PRODUCTS FOR DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS <i>Tarabayeva A.S., Abilbayeva A.A., Prasanna W.P., Dilip G. M., Anilkumar M.S.</i>	79
ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ АТМОСФЕРНЫХ ВЫБРОСОВ В ПРОВОКАЦИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА (ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ) <i>Таха Е.А., Ларионова Р.В., Петров С.В., Казарян Г.Г., Валева А.Р., Коровина М.О., Шамаев Н.Д., Пипченко А.П., Макаму С.А., Таишулатов Б.М., Латыпова Э.Г., Селиванова Д.С., Ренадино И., Кравцова О.А., Хаммадов Н.И., Хаертынов К.С., Бадрутдинов О.Р., Мукминов М.Н., Шуралев Э.А., Арлеевская М.И.</i>	85

POSSIBLE ROLE OF ATMOSPHERIC EMISSIONS IN PROVOCATION OF RHEUMATOID ARTHRITIS (PRELIMINARY DATA)	86
<i>Takha E.A., Larionova R.V., Petrov S.V., Kazarian G.G., Valeeva A.R., Korovina M.O., Shamaev N.D., Pipchenko A.P., Macamo S.A., Tashpulatov B.M., Latipova E.G., Selivanova D.S., Renaudineau Y., Kravtsova O.A., Khammatov N.I., Khaertynov K.S., Badrutdinov O.R., Mukminov M.N., Shuralev E.A., Arleevskaya M.I.</i>	
NEXT-GENERATION SEQUENCING AS A TOOL FOR GENETIC CHARACTERIZATION OF LARGE VIRUS COLLECTIONS ON THE EXAMPLE OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS STRAINS FROM WESTERN SIBERIA	89
<i>Tkachev S.E., Shaikhutdinov N.M., Shigapova L.Kh., Chicherina G.S., Zinkina A.S., Yakimenko V.V., Shagimardanova E.I.</i>	
ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬШИХ КОЛЛЕКЦИЙ ВИРУСОВ НА ПРИМЕРЕ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ИЗ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ	92
<i>Ткачев С.Е., Шайхутдинов Н.М., Шигапова Л.Х., Чичерина Г.С., Зинкина А.С., Якименко В.В., Шагимарданова Е.И.</i>	
НОВЫЙ ПОДХОД ПОДГОТОВКИ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАТ MYCOBACTERIUM BOVIS (A NOVEL APPROACH TO THE PREPARATION OF MATERIAL FOR OBTAINING ANTIGENIC DETERMINANTS OF MYCOBACTERIUM BOVIS)	94
<i>Третьякова А.Б., Валеева А.Р., Хаертынов К.С., Мукминов М.Н.</i>	
ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ АНТИМИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS	97
<i>Федорова М.С., Миронова А.В., Тризна Е.Ю., Каюмов А.Р.</i>	
THE ROLE OF NLRP3 IN TAMOXIFEN INSENSITIVITY IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER	98
<i>Hamza S., Tezcan G., Garanina E., Alsaadi M., Rizvanov A. and Khaiboullina S.</i>	
DEMONSTRATING SARS-COV-2 S PROTEIN EPITOPES INVOLVED IN THE INDUCTION OF AN IMMUNE RESPONSE	100
<i>Hamza S., Martynova E., Garanina E., Markelova M., Shakirova V., Rizvanov A., Khaiboullina S.</i>	
DEVELOPMENT OF A HIGHLY POTENT MODULATOR OF STING AS A NEW LUPUS THERAPEUTIC	101
<i>Anna Kharitonova, Rainer Metcalf, Robert Sparks, William Lawless, Kenyon Daniel, Wesley Brooks, Niketa Patel, Wayne Guida</i>	
МАРКЕРЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ НЕЙРОИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ	102
<i>Шеметов А.В.</i>	

## ФАКТОРЫ РИСКА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ ТУБЕРКУЛЕЗА

*Абильбаева А.А.<sup>1</sup>, Тарабаева А.С.<sup>1</sup>, Охас И.М.<sup>1</sup>,  
Куашова Д.К.<sup>1</sup>, Абубакиров А.Я.<sup>1</sup>, Шуралев Э.А.<sup>2,3,4</sup>*

*1 – НАО «Казахский национальный медицинский университет  
им.С.Д. Асфендиярова», Алматы, Казахстан*

*2 - Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

*3 – Казанская государственная медицинская академия –  
филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО, Казань, Россия*

*4 - ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э.  
Баумана», Казань, Россия*

## RISK FACTORS ASSOCIATED WITH DRUG-RESISTANT TB

### **Purpose of the study:**

Identify factors associated with drug-resistant TB.

### **Materials and methods of research:**

Clinical and laboratory data of 208 TB patients treated at the National Scientific Center of Phthisiopulmonology of the Health Ministry of the Republic of Kazakhstan were analyzed. To assess the significance of differences in groups, the Pearson Chi-Square test was used. To determine the factors associated with of the MDR/XDR TB, a multiple binary logistic regression analysis with forward stepwise selection with  $p < 0.05$  for entry of variables and  $p > 0.05$  for removal of a variable was carried out.

### **Research results:**

We found that age  $\leq 40$  years (OR = 2.211, 95% CI: 1.2189-4.0105), a history of contact with a TB patient (OR = 4.3288, 95% CI: 1.4603-12.8326), TB relapse (OR = 5.9246, 95% CI: 2.8013-12.5304) and pulmonary TB (OR = 11.913, 95% CI: 4.2303 – 33.5483) were significantly associated with MDR/XDR-TB in univariable analysis. Multivariable analysis confirmed age  $\leq 40$  years (OR=2,637 95% CI: 1,306-5,323), TB relapse (OR=5.057 95% CI: 2.240-11.416) and pulmonary TB (OR= 5,64695% CI: 2,026-15,729) as factors associated with MDR/XDR TB

### **Conclusion:**

Age  $\leq 40$  years, TB relapse and pulmonary TB as factors associated with MDR/XDR TB. Further identification of risk factors associated with the MDR-TB will contribute to the development of a strategy for screening TB patients, preventive measures, and control of ongoing therapy.

**Key words:** tuberculosis, MDR TB, risk factors

*arailym2686@gmail.com*

Туберкулез остается одной из ведущих причин смерти от инфекционных заболеваний. Только в 2020 году туберкулез (ТБ) стал причиной 9,9 миллионов случаев заболевания во всем мире и привел к 1,3 миллионам смертей [1]. Следует отметить, что несмотря на тот факт, что за последние два десятилетия,

заболеваемость, смертность от ТБ значительно снизились благодаря глобальным усилиям по борьбе с ТБ, появление туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ/ШЛУ) ставит под угрозу этот прогресс и остается серьезным препятствием на пути к ликвидации глобальной эпидемии туберкулеза [2.3]. Так, например, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2020 г. МЛУ-ТБ и устойчивый к рифампицину туберкулез вместе стали причиной 150 359 случаев заболевания [1].

К настоящему моменту показано, что рецидив ТБ, ВИЧ-инфекция, контакт с больным туберкулезом, более двух курсов лечения, кавитации в легких являются факторами риска МЛУ/ШЛУ ТБ [4]. В то же время, необходим более широкий анализ социально – демографических и клинических факторов риска лекарственно-устойчивого ТБ.

**Цель исследования:** Выявить факторы, ассоциированные с развитием лекарственно-устойчивых форм ТБ.

#### **Материалы и методы исследования:**

##### **Группа исследования:**

Были проанализированы клиничко-лабораторные данные 208 больных туберкулезом, находившихся на лечении в Национальном научном центре фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения Республики Казахстан. Диагноз туберкулеза был подтвержден молекулярно-генетическими (GeneXpert/Hain-test) и/или бактериологическими (ВАСТЕС) методами.

##### **Методы исследования:**

Полученные данные были проанализированы с использованием программного пакета MicrosoftSPSS 23.0. Для оценки значимости различий в группах использовали критерий Хи-квадрат Пирсона (Pearson Chi-Square). Для определения факторов, ассоциированных с лекарственно-устойчивыми формами ТБ, был проведен логистический регрессионный анализ в двумерной и многомерной моделях. Были рассчитаны нескорректированные и скорректированные отношения шансов(OR), а также 95% доверительные интервалы. В многомерную модель были включены переменные, показавшие связь в двумерном анализе.

#### **Результаты исследования**

##### **1. Сравнительная характеристика между больными с лекарственно-резистентной и лекарственно-чувствительной формой туберкулеза**

Результаты сравнительного анализа между больными с лекарственно-резистентной и лекарственно-чувствительной формами туберкулеза представлены в таблице 1.



**Таблица 1. Базовые характеристики пациентов с лекарственно-резистентной и лекарственно-чувствительной формами туберкулеза**

Параметры	Лекарственно-резистентный ТБ (n=142)	Лекарственно-чувствительный ТБ (n=66)	P
<b>Демографические показатели</b>			
<b>Возраст (лет)</b>			
До 40 лет	94 (66,1%)	31 (46,9%)	<b>0.008382</b>
Старше 40 лет	48 (33,8%)	35 (53%)	
<b>Пол, n (%)</b>			
Женщина	51 (35,9%)	31 (46,9)	0.128544
Мужчина	91 (64%)	35 (53%)	
<b>ИМТ, n (%)</b>			
Нормальный	84 (59,1%)	44 (66,6%)	0.617075
Избыточный	30 (21,1%)	13 (19,6%)	
Недостаточный	28 (19,7%)	9 (13,6%)	
<b>Проживание, n (%)</b>			
Город	93 (65,4%)	40 (60,6%)	0.492987
Село	49 (34,5%)	26 (39,3%)	
<b>Социально-экономические показатели</b>			
<b>Социальный статус, n (%)</b>			
Рабочий	31 (21,8%)	17 (25,7%)	0.532299
Безработный	111 (78,1%)	49 (74,2%)	
<b>Доход, n (%)</b>			
Выше ПМ	94 (66,1%)	38 (57,7%)	0.230139
Ниже ПМ	48 (33,8%)	28 (42,4%)	
<b>ТБ контакт</b>			
Есть	31 (21,8%)	4 (6%)	<b>0.004652</b>
Нет	111 (78,1%)	62 (93,9%)	
<b>Тип ТБ</b>			
Новый случай	69 (48,5%)	56 (84,8%)	<b>&lt;.0001</b>
Рецидив	73 (51,4%)	10 (15,1%)	
<b>Микроскопия</b>			
Положительный	51 (35,9%)	15 (22,7%)	0.057089
Отрицательный	91 (64%)	51 (77,2%)	
<b>Формы ТБ</b>			
Легочный	137 (96,4%)	46 (69,6%)	<b>&lt;.0001</b>
Внелегочный	5 (3,5%)	20 (30,3%)	
<b>Сопутствующие заболевания*</b>			
Есть	94 (66,1%)	51 (77,2%)	0.105524
Нет	48 (33,8%)	15 (22,7%)	

\*Сопутствующие заболевания включали следующие болезни: аллергический дерматит, гепатиты, анемия, бронхиальная астма, сахарный диабет, хронический алкоголизм, хронический холецистит, хроническая обструктивная болезнь легких, хронический пиелонефрит, болезнь Крона, ишемическая болезнь сердца, тугоухость, сальпингоофорит, склеродермия, ревматоидный артрит

Достоверные отличия ( $p \leq 0,05$ ) в группах с лекарственно чувствительным (ЛЧ) и лекарственно резистентным (ЛР) ТБ были выявлены в группах до 40 и старше 40 лет. Так, в группе до 40 лет больных ЛР ТБ было почти в 2 раза больше по сравнению с группой старше 40 лет (66,1% против 33,8%). При этом, в группе до 40 лет больных ЛР ТБ было в 1,4 раза больше по сравнению с ЛЧ ТБ (66,1% и 46,9% соответственно), в то время как, в группе старше 40 лет таких больных было в 1,6 раза меньше (33,8% и 53% соответственно). Лиц, указавших наличие ТБ контакта, было в 3,6 раза больше в группе ЛР ТБ по сравнению с ЛЧ ТБ (21,8% против 6%). Среди больных с рецидивом ТБ количество больных ЛР ТБ было в 3,4 раза больше по сравнению с ЛЧ ТБ (51,4% и 15,1% соответственно). При анализе числа случаев ЛР ТБ при легочном и внелегочном ТБ было выявлено, что при внелегочном ТБ число больных ЛР ТБ в 8,6 раза было ниже по сравнению с ЛЧ ТБ (3,5% против 30,3%).

## 2. Факторы, ассоциированные с развитием лекарственно-резистентных форм туберкулеза

Факторы, показавшие достоверные отличия при сравнительном анализе были включены в регрессионный анализ в двумерной и многомерной моделях.

Результаты регрессионного анализа представлены в таблице 2.

**Таблица 2. Регрессионный анализ по факторам риска у больных с лекарственно-резистентной формы туберкулеза**

№	Факторы	Нескорректированное отношение шансов		Скорректированное отношение шансов	
		Предварительный OR	p	Уточненный OR	p
1	<b>Возраст</b>				
	Старше 40 лет	референс		референс	
	До 40 лет	2.211 (1.2189-4.0105)	<b>0.008</b>	2,637 (1,306-5,323)	<b>0.007</b>
2	<b>ТБ контакт</b>				
	Нет	Референс		Референс	
	Есть	4.3288 (1.4603-12.8326)	<b>0.004652</b>	2,693 (0,846-8,571)	0.094
3	<b>Тип ТБ</b>				
	Новый случай	референс		референс	
	Рецидив	5.9246 (2.8013-12.5304)	<b>&lt;0.0001</b>	5.057 (2.240-11.416)	<b>&lt;0.0001</b>
4	<b>Формы ТБ</b>				
	Внелегочный	референс		референс	
	Легочный	11,913 (4,2303 – 33,5483)	<b>&lt;0.0001</b>	5,646 (2,026-15,729)	<b>0.001</b>

Двумерная регрессия с оценкой нескорректированного отношения шансов показала, что молодой возраст до 40 лет (OR = 2.211, 95% ДИ: 1.2189-4.0105, p - 0.008), контакт с больным туберкулезом (OR = 4.3288, 95% ДИ: 1.4603-

12.8326,  $p < 0.004652$ ), рецидив ТБ (OR = 5.9246, 95% ДИ: 2,8013-12,5304,  $p < 0,0001$ ) и легочная форма туберкулеза (OR = 11,913, 95% ДИ: 4,2303 – 33,5483,  $p < 0,0001$ ) были в связаны с лекарственно-резистентной формой.

Мы также протестировали факторы риска, выявленные в двумерной логистической регрессии, в многомерной модели регрессии. Многофакторный логистический регрессионный анализ подтвердил, что молодой возраст до 40 лет (OR = 2,637, 95% ДИ: 1,306-5,323,  $p = 0.007$ ), рецидив туберкулеза (OR = 5.057, 95% ДИ: 2.240-11.416,  $p < 0.0001$ ) и легочная форма туберкулеза (OR = 5,646, 95% ДИ: 2,026-15,729,  $p < 0.0001$ ) были в достоверно связаны с лекарственно-резистентной формой туберкулеза.

**Заключение:** молодой возраст до 40 лет, рецидив ТБ и легочная форма туберкулеза являются факторами риска развития лекарственно-резистентной формы туберкулеза.

### **Обсуждение**

Наши результаты показали, что пациенты в возрасте до 40 лет являются фактором, ассоциированным с развитием МЛУ/ШЛУ-ТБ. Аналогичная ассоциация наблюдалась в нескольких исследованиях в африканских и азиатских регионах [4,5,6]. Авторами сделан вывод о том, что при скрининге больных ТБ, в первую очередь, должен уделить внимание этой группе населения, в то время как пожилые люди должны быть обследованы на инфекции нетуберкулезных микобактерий (НТМ).

Рецидив заболевания, также был определен как фактор, ассоциированный с развитием лекарственно-резистентной формы ТБ. Наши выводы согласуются с наблюдениями других исследователей [5,6,7,8,9]. Предполагается, что пациенты, получающие противотуберкулезную терапию препаратами первого ряда, могут неправильно принимать лекарства (доза, время и меры предосторожности), что способствует появлению лекарственно-устойчивых штаммов.

Интересным является результат нашего исследования, показавший связь легочного ТБ с МЛУ формами ТБ. Наши результаты исследование подтверждают результаты двух европейских исследований [10,11] показавших более редкую встречаемость МЛУ-ТБ среди случаев внелегочного ТБ. Предполагается, что это может быть связано с низким числом ранее леченных случаев внелегочного туберкулеза.

**Резюме:** Выявление факторов риска, ассоциированных с развитием МЛУ ТБ, будет способствовать разработке стратегии скрининга ТБ больных, мер профилактики, контроля проводимой терапии. В то же время, необходимо продолжение исследований в данном направлении.

### **Литература:**

1. *Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021* (<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>).

2. Gandhi N.R., Nunn P, Dheda K., Schaaf H.S., Zignol M., Van Soolingen D., et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet*. 2010;375:1830–43.doi:10.1016/S0140-6736(10)60410-2.
3. Li B.Y., Shi W.P., Zhou, C.M. et al. Rising challenge of multidrug-resistant tuberculosis in China: a predictive study using Markov modeling. *Infect Dis Poverty* 9, 65 (2020). doi: 10.1186/s40249-020-00682-7.
4. Abdulhalik Workicho, Wondwosen Kassahun, Fessahaye Alemseged. Risk factors for multidrug-resistant tuberculosis among tuberculosis patients: a case-control study. *Infect Drug Resist* 2017;10:91–6.doi:10.2147/IDR.S126274.
5. Baya B., Achenbach C.J., Kone B., et al. Clinical risk factors associated with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) in Mali. *Int J Infect Dis*. 2019;81:149-155. doi:10.1016/j.ijid.2019.02.004.
6. Chuchottaworn C., Thanachartwet V., Sangsayunh P., Than TZM, Sahassananda D., Surabotsophon M., et al. Risk factors for multidrug-resistant tuberculosis among patients with pulmonary tuberculosis at the central chest institute of Thailand. *PLoS One* 2015;10(10)e0139986. doi: 10.1371/journal.pone.0139986.
7. Mulisa G., Workneh T., Hordofa N., Suaudi M., Abebe G., Jarso G., et al. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and associated risk factors in Oromia Region of Ethiopia. *Int J Infect Dis* 2015;39:57–61. doi:10.1016/j.ijid.2015.08.013.
8. Gao J., Ma Y., Du J., Zhu G., Tan S., Fu Y., et al. Later emergence of acquired drug resistance and its effect on treatment outcome in patients treated with Standard Short-Course Chemotherapy for tuberculosis. *BMC Pulmon Med* 2016;16:26.doi:10.1186/s12890-016-0187-3.
9. Dessalegn M., Daniel E., Behailu S., Wagnew M., Nyagero J. Predictors of multidrug-resistant tuberculosis among adult patients at Saint Peter Hospital Addis Ababa, Ethiopia. *Pan. Afr. Med. J*. 2016;25(Suppl. 2):5. doi:10.11604/pamj.supp.2016.25.2.9203.
10. Sandgren A., Hollo V., van der Werf M.J. Extrapulmonary tuberculosis in the European Union and European Economic Area, 2002 to 2011. [accessed on February 18, 2014];*Euro Surveill*. 2013 18 pii: 20431.
11. Kruijshaar M.E., Abubakar I. Increase in extrapulmonary tuberculosis in England and Wales 1999-2006. *Thorax*. 2009;64:1090–5.doi:10.1136/thx.2009.118133.

## ФАКТОРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С УДЛИНЕНИЕМ СРОКОВ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ БОЛЬНЫХ COVID-19

*Абильбаева А.А., Тарабаева А.С., Идрисова Г.М.,  
Дуйсенова А.К., Егембердиева Р.А.  
НАО «Казахский национальный медицинский университет  
им.С.Д. Асфендиярова», Алматы, Казахстан*

## FACTORS ASSOCIATED WITH PROLONGED HOSPITALIZATION OF COVID-19 PATIENTS

**Purpose of the study:** To determine the clinical and laboratory factors associated with lengthening of hospital stay in patients with COVID-19.

### **Materials and methods of research:**

We retrospectively analyzed the clinical and laboratory data of 424 patients with COVID-19 who were treated at the City Clinical Infectious Diseases Hospital in Almaty. The diagnosis of COVID-19 was confirmed by PCR.

Multiple binary logistic regression analysis was performed to determine factors associated with treatment prolongation. Unadjusted and adjusted odds ratios (OR) and 95% confidence intervals were calculated.

### **Research results:**

Univariable analysis with an unadjusted odds ratio showed that the age is over 65 years (OR = 3,4467, 95% CI: 1,8847-6,3032,  $p < 0.0001$ ), the presence of diabetes mellitus (OR = 1,903, 95% CI: 1,1214-3,2293,  $p = 0.016$ ), blood glucose level at the time of admission more than 6,1 mmol/l (OR=1,4929, 95% CI: 1,0061-2,2153,  $p = 0.046$ ), history of arterial hypertension (OR=2,2081, 95% CI: 1,496-3,2591,  $p < 0.0001$ ), the level of systolic blood pressure at the time of admission is above 140 mm/Hg (OR = 2,5094, 95% CI: 1,23-5,1196,  $p = 0,0096$ ), as well as lung damage at admission from 26 to 49% (OR = 2,2815, 95% CI: 0,9905-5,2549,  $p = 0,048$ ) and above 50% (OR = 2,8519, 95% CI: 1,1635-6,9903,  $p = 0,019$ ) are risk factors for prolongation of the treatment period for patients with COVID-19.

Multivariate logistic regression analysis confirmed that only age over 65 years (OR=2,225, 95% CI: 1,075–4,606.  $p = 0,031$ ) and systolic BP above 140 mm/Hg at admission (OR = 2,390, 95% CI: 1,131-5,053,  $p = 0,023$ ) are factors associated with prolongation of treatment.

### **Conclusion:**

Age over 65 years and systolic BP above 140 mm/Hg at admission are factors associated with prolongation of COVID-19 patients' treatment. Further identification of factors related to length of hospital stay is needed to determine treatment strategy.

**Key words:** COVID-19, risk factors, hospitalization

*arailym2686@gmail.com*

## **ВВЕДЕНИЕ**

Начиная с декабря 2019 года коронавирус, получивший обозначение SARS-CoV-2, вызвал международную вспышку респираторного заболевания, получившего название COVID-19 [1]. Пандемия COVID-19 легла тяжелейшим бременем на органы здравоохранения всех стран мира. SARS-CoV-2 вызывает острое респираторное заболевание с общими признаками инфекции, такими как респираторные симптомы, лихорадка, кашель и затрудненное дыхание. В более тяжелых случаях инфекция вызывает пневмонию, легочную недостаточность, септический шок, недостаточность органов и риск смерти. ВОЗ сообщает, что у примерно у 80% инфицированных лиц развиваются легкие симптомы, у 14% – тяжелые симптомы и 6% – в критическом состоянии. Учитывая широкий спектр клинических симптомов COVID-19, который варьирует в зависимости от множества факторов, ключевой проблемой, с которой сталкивается медицинский персонал, является расстановка приоритетов, особенно в условиях ограниченных ресурсов. Лечение пациентов с COVID-19 обходится дорого [2,3,4], поэтому при поступлении важно определить факторы, связанные с продолжительностью пребывания в больнице, и провести оценку риска для определения стратегии лечения.

### **Цель исследования:**

Определить клиничко-лабораторные факторы, ассоциированные с удлинением сроков пребывания в стационаре больных COVID-19.

### **Группа исследования:**

Ретроспективно были проанализированы клиничко-лабораторные данные 424 больных COVID-19, находившихся на лечении в городской клинической инфекционной больнице им. И.С. Жакеновой г. Алматы. Диагноз COVID-19 был подтвержден ПЦР. Все исследования были одобрены Локальным этическим комитетом Казахского национального медицинского университета.

### **Статистические методы:**

Полученные данные были проанализированы с использованием программного пакета SPSS 23.0. Была проведена бинарная логистическая регрессия в двумерной и многомерной моделях, для определения факторов, ассоциированных с пролонгацией сроков лечения. Были рассчитаны нескорректированные и скорректированные отношения шансов (OR), а также 95% доверительные интервалы.

### **Результаты исследования:**

Для оценки влияния различных факторов на продолжительность лечения была определена средняя (медианная) продолжительность лечения в стационаре. Она составила 8 дней.

Результаты регрессионного анализа представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Регрессионный анализ по факторам, ассоциированным с продолжительностью лечения ниже (n-225) и выше медианного значения (n-199)**

	Факторы	Нескорректированное отношение шансов		Скорректированное отношение шансов	
		Предварительный OR	p	Уточненный OR	p
1	<b>Возраст</b>				
	23-40 лет	референс		референс	
	41-64 лет	1,6642 (0,9265-2,989)	0,086	1,204(0,616-2,353)	0,588
	Старше 65 лет	3,4467 (1,8847-6,3032)	<b>&lt;0,0001</b>	2,225(1,075-4,606)	<b>0,031</b>
2	<b>Пол</b>				
	Мужчины	референс		референс	
	Женщины	1,1759 (0,7935-1,7427)	0,420	1,012 (0,656-1,561)	0,956
3	<b>Сроки госпитализации от дня появления симптомов</b>				
	1-3 дня	референс		референс	
	4-7 дней	0,8303 (0,4683-1,4722)	0,522	0,865 (0,463-1,616)	0,649
	более 8 дней	1,0414 (0,589-1,8412)	0,887	0,894 (0,477-1,675)	0,726
4	<b>Наличие сахарного диабета в анамнезе</b>				
	Нет	референс		референс	
	Есть	1,903 (1,1214-3,2293)	<b>0,016</b>	1,226 (0,673-2,233)	0,506
5	<b>Наличие ожирения</b>				
	Нет	референс		референс	
	Есть	1,2791 (0,6663-2,4556)	0,458	1,432 (0,706-2,906)	0,320
6	<b>Наличие артериальной гипертензии в анамнезе</b>				
	Нет	референс		референс	
	Есть	2,2081 (1,496-3,2591)	<b>&lt;0,0001</b>	1,595 (0,988-2,575)	0,056
7	<b>Объем поражения легких по результату КТ на момент поступления</b>				
	Без поражения легких	референс		референс	
	1-25%	1,735 (0,7404-4,066)	0,202	1,387 (0,560-3,434)	0,480
	26-49%	2,2815 (0,9905-5,2549)	<b>0,048</b>	1,596 (0,644-3,958)	0,313
	Более 50%	2,8519 (1,1635-6,9903)	<b>0,019</b>	2,123 (0,807-5,589)	0,127
8	<b>Уровень глюкозы на момент поступления</b>				
	4-6 ммоль/л	референс		референс	
	3,9 ммоль/л	0,5607 (0,1417-2,2195)	0,311	0,622 (0,153-2,519)	0,505
	Более 6,1 ммоль/л	1,4929 (1,0061-2,2153)	<b>0,046</b>	1,261(0,802-1,983)	0,314
9	<b>Уровень лейкоцитов на момент поступления</b>				
	4-9*10 <sup>9</sup> /л	референс		референс	
	До 3,9*10 <sup>9</sup> /л	1,1724 (0,7382-1,862)	0,502	1,131 (0,692-1,851)	0,623
	Более 9,1*10 <sup>9</sup> /л	1,1969 (0,6484-2,2091)	0,566	0,997 (0,520-1,913)	0,994
10	<b>Уровень систолического АД на момент поступления</b>				
	120-139 мм/рт.ст.	референс		референс	
	≤119 мм/рт.ст.	1,0641 (0,7036-1,6093)	0,764	1,513 (0,949-2,411)	0,082
	≥ 140 мм/рт.ст.	2,5094 (1,23-5,1196)	<b>0,0096</b>	2,390 (1,131-5,053)	<b>0,023</b>

Двумерная регрессия с оценкой нескорректированного отношения шансов показала, что возраст старше 65 лет (OR =3,4467, 95% ДИ: 1,8847-6,3032,  $p<0,0001$ ), наличие сахарного диабета (OR =1,903, 95% ДИ: 1,1214-3,2293,  $p=0,016$ ), уровень глюкозы в крови на момент поступления более 6,1 ммоль/л (OR=1,4929, 95% ДИ: 1,0061-2,2153,  $p=0,046$ ), наличие артериальной гипертензии в анамнезе (OR = 2,2081, 95% ДИ: 1,496-3,2591,  $p<0,0001$ ), уровень систолического АД на момент поступления выше 140 мм/рт.ст. (OR =2,5094, 95% ДИ: 1,23-5,1196,  $p=0,0096$ ), а также поражение легких при поступлении от 26 до 49% (OR =2,2815, 95% ДИ: 0,9905-5,2549,  $p=0,048$ ) и выше 50% (OR =2,8519, 95% ДИ: 1,1635-6,9903,  $p=0,019$ ) являются факторами риска удлинения сроков лечения больных COVID-19.

Мы также протестировали факторы риска, выявленные в двумерной логистической регрессии, в многомерной модели регрессии. Многофакторный логистический регрессионный анализ подтвердил, что только возраст старше 65 лет (OR =2,225, 95% ДИ: 1,075-4,606,  $p=0,031$ ) и уровень систолического АД выше более 140 мм/рт.ст. при поступлении (OR =2,390, 95% ДИ: 1,131-5,053,  $p=0,023$ ) являются факторами, ассоциированными с пролонгацией сроков лечения.

### **Обсуждение**

В нашем исследовании многофакторный регрессионный анализ выявил возраст старше 65 лет и уровень систолического давления при поступлении выше 140 мм/рт.ст., как факторы, ассоциированные с удлинением сроков госпитализации больных COVID-19.

Наши результаты по связи возраста с пролонгацией сроков лечения согласуются с данными других исследователей, показавших связь пожилого возраста с тяжелым течением COVID-19 [5,6,7,8,9], а также удлинением сроков их госпитализации. [10]. Предполагается, что это связано с тем, что больные пожилого возраста характеризуются большим количеством сопутствующих заболеваний, более слабой иммунной защитой и более высоким уровнем провоспалительных цитокинов. Более того, ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2), который может обеспечить защиту от острых повреждений легких, вызванных вирусной инфекцией, снижен у пожилых людей и может способствовать более высокому риску тяжести и смертности от COVID-19 [11].

Что касается связи повышенного артериального давления с удлинением сроков госпитализации, то наши данные также подтверждают полученные ранее результаты [12]. Артериальная гипертензия связана с более высоким риском тяжести и смертности от COVID-19 [13,14]. Предполагается, что пожилой возраст и большее количество сопутствующих заболеваний и осложнений, неконтролируемое артериальное давление, снижение уровня АПФ2/ангиотензин-(1-7) и повышением уровня АПФ/ангиотензин II, способствуют повышению тяжести и смертности у пациентов с артериальной гипертензией с COVID-19 [11].

**Заключение:** Возраст старше 65 лет и систолическое АД выше 140 мм рт. ст. при поступлении являются факторами, ассоциированными с пролонгацией



лечения пациентов с COVID-19. Для усовершенствования стратегии лечения необходима дальнейшая идентификация факторов, связанных с продолжительностью пребывания в стационаре.

### **Литература:**

1. *Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. World Health Organization, 2020* (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>). Дата обращения: 28 марта 2022г.
2. *Manuela Di Fusco, Kimberly M. Shea, Jay Lin, Jennifer L. Nguyen, Frederick J. Angulo, Michael Benigno, et al. Health outcomes and economic burden of hospitalized COVID-19 patients in the United States, Journal of Medical Economics, 2021, 24:1, 308-317.*
3. *Alan D. Kaye, Chikezie N. Okeagu, Alex D. Pham, Rayce A. Silva, Joshua J. Hurley, Brett L. Arron, et al. Economic impact of COVID-19 pandemic on healthcare facilities and systems: International perspectives, Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology, 2021, 35:3,293-306.*
4. *Simiao Chen, Klaus Prettnner, Michael Kuhn, David E. Bloom, The economic burden of COVID-19 in the United States: Estimates and projections under an infection-based herd immunity approach, The Journal of the Economics of Ageing, 2021, 20.*
5. *Zhang J.J., Cao Y.Y., Tan G., Dong X., Wang B.C., Lin J., et al. Clinical, radiological, and laboratory characteristics and risk factors for severity and mortality of 289 hospitalized COVID-19 patients. Allergy. 2021 Feb;76(2):533-550.*
6. *Wolff D., Nee S., Hickey N.S., Marschollek M. Risk factors for Covid-19 severity and fatality: a structured literature review. Infection. 2021 Feb;49(1):15-28.*
7. *Zhang J., Wang X., Jia X., Li J., Hu K, Chen G., et al. Risk factors for disease severity, unimprovement, and mortality in COVID-19 patients in Wuhan, China. Clin Microbiol Infect. 2020 Jun;26(6):767-772.*
8. *Ebinger J.E., Achamallah N., Ji H, Claggett B.L., Sun N., Botting P., et al. Pre-existing traits associated with Covid-19 illness severity. PLoS One. 2020 Jul 23;15(7):e0236240.*
9. *Zhou F., Yu T., Du R., et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet. 2020; 395(10229): 1054- 1062.*
10. *Thai P., Toan D., Son D., Van H., Minh L., Hung L., et al. Factors associated with the duration of hospitalisation among COVID-19 patients in Vietnam: A survival analysis. 2020, Epidemiology and Infection, 148, E114.*
11. *Gao, Y-D, Ding, M, Dong, X, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. Allergy. 2021; 76: 428– 455.*
12. *Liu X, Zhou H, Zhou Y, Wu X, Zhao Y, Lu Y, et al. Risk factors associated with disease severity and length of hospital stay in COVID-19 patients. J Infect. 2020 Jul;81(1):e95-e97.*
13. *Li R, Tian J, Yang F, Lv L, Yu J, Sun G, et al. Clinical characteristics of 225 patients with COVID-19 in a tertiary Hospital near Wuhan, China. J Clin Virol. 2020 Jun;127:104363.*
14. *Li X, Xu S, Yu M, Wang K, Tao Y, Zhou Y, et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. J Allergy Clin Immunol. 2020 Jul;146(1):110-118.*

# IDENTIFICATION OF MOLECULAR AND GENETIC PREDICTORS OF POLYP FORMATION IN PATIENTS WITH CHRONIC RHINOSINUSITIS

*Ashchina L.A., Baranova N.I.*

*Penza Institute for Further Training of Physicians – Branch Campus of the Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education*

*"Russian Medical Academy of Continuing Professional Education" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 440060, Penza, Russia.*

*E-mail: pushino2008@yandex.ru*

## **Abstract**

Chronic rhinosinusitis (CRS) is a common disease of the nose and paranasal sinuses. The most complicated form of CRS is chronic polyposis rhinosinusitis (CPRS), which is often accompanied by a number of comorbid conditions. It has been shown that abnormalities in immunogenetic parameters, in particular cytokine system, can play a key role in the development of CRS with and without polyps. Therefore, the study of molecular and genetic mechanisms of this pathology is relevant, since it will help to establish the type of inflammatory process, for personalized selection of targeted therapy for patients, which will increase treatment efficacy. Therefore we aimed to define the role of IL-4 (C-589T), IL-10 (G-1082A), IL-17 (G-197A), IL-1 $\beta$  (T-31C), TNF- $\alpha$  (G-308A) gene polymorphisms in patients with chronic rhinosinusitis with and without polyps. A total of 170 patients with CRS were examined, of whom 100 were CRS patients and 70 were CRS patients without nasal polyps. Whole venous blood was used as the material for DNA isolation. Evaluation of the studied IL-4 (C-589T), IL-10 (G-1082A), IL-17 (G-197A), IL-1 $\beta$  (T-31C), and TNF- $\alpha$  (G-308A) gene polymorphisms in isolated DNA samples was performed by real-time PCR. The genotypes of the cytokine polymorphisms studied were in agreement with the Hardy-Weinberg distribution ( $p < 0.05$ ). It was found that the most significant predictors of association with an increased risk of CPRS were: genotype 308 G/A and 308 A/A of the TNF- $\alpha$  gene and genotype 31 T/C of the IL-1 $\beta$  gene. The -197A/A genotype of the IL-17 gene and the -31C/C genotype of the IL-1 $\beta$  gene were predictors of a decreased risk of CPRS. The study of gene polymorphisms of the most important cytokines such as IL-4, IL-10, IL-17A, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  will make it possible to estimate the genetic predisposition of patients to CPRS, which will be the basis for understanding the pathogenetic mechanisms of the disease and provide a personalized approach to targeted therapy, which will increase the effectiveness of treatment.

**Key words:** chronic rhinosinusitis, polyps, cytokines, gene polymorphism, predictors.

# ВЫЯВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО - ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛИПОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ РИНОСИНУСИТОМ

*Ащина Л.А., Баранова Н.И.*

*Пензенский институт усовершенствования врачей –  
филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного  
профессионального образования» Минздрава РФ, 440060, Пенза, Россия  
Электронная почта: pushino2008@yandex.ru*

## **Резюме**

Хронический риносинусит (ХРС) является распространенным заболеванием носа и околоносовых пазух. Наиболее сложной формой ХРС является хронический полипозный риносинусит (ХПРС), который часто сопровождается рядом коморбидных состояний. Показано, что нарушения в иммуногенетических параметрах, в частности системе цитокинов, могут играть ключевую роль в развитии полипов. Поэтому, изучение молекулярно-генетических механизмов данной патологии является актуальным, так как будет способствовать установлению типа воспалительного процесса, для персонализированного подбора таргетной терапии пациентов и повысит эффективность лечения. В связи с этим, целью исследования явилось определение роли полиморфизмов генов IL-4 (C-589T), IL-10 (G-1082A), IL-17 (G-197A), IL-1 $\beta$  (T-31C), TNF- $\alpha$  (G-308A) у больных хроническим риносинуситом с полипами и без полипов. Было обследовано 170 пациентов с ХРС, из которых 100 человек составили пациенты с ХПРС и 70 пациентов с ХРС без полипов носа. В качестве материала для выделения ДНК использовали цельную венозную кровь. Оценку изучаемых полиморфизмов генов IL-4 (C-589T), IL-10 (G-1082A), IL-17 (G-197A), IL-1 $\beta$  (T-31C), TNF- $\alpha$  (G-308A) в выделенных образцах ДНК проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Генотипы исследуемых полиморфизмов цитокинов находились в соответствии с распределением Харди-Вайнберга ( $p < 0,05$ ). Было установлено, что наиболее значимыми предикторами ассоциации с повышенным риском развития ХПРС явились: генотип 308 G/A и 308 A/A гена TNF- $\alpha$  и генотипа 31 T/C гена IL-1 $\beta$ . Предикторами пониженного риска развития ХПРС явились: генотип -197A/A гена IL-17 и генотип -31C/C гена IL-1 $\beta$ . Исследование полиморфизма генов наиболее значимых цитокинов, таких как IL-4, IL-10, IL-17A, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  позволит оценить генетическую предрасположенность пациентов к ХПРС, в связи с чем, сможет послужить основой для уточнения патогенетических механизмов заболевания и подойти персонализировано к терапии пациентов, что повысит эффективность проводимого лечения.

**Ключевые слова:** хронический риносинусит, полипы, цитокины, полиморфизм генов, предикторы.

## **Введение**

Хронический риносинусит (ХРС) является распространенным заболеванием носа и околоносовых пазух, поражающее все слои населения. ХРС может быть без назальных полипов и с полипами, которые часто рецидивируют и значительно ухудшают качество жизни пациента. На настоящий момент патогенетические механизмы возникновения и рецидивирования полипов до конца не ясны [1]. Однако пристальное внимание уделяется иммуногенетическим аспектам развития ХПРС, в частности роли цитокинов. Доказана значимая роль цитокинов IL-4, IL-10, IL-17F, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  в патогенезе ХРС с полипами и без полипов, однако имеющиеся по ним данные носят противоречивый характер [2,3,4]. Считается, что такое разнообразие результатов связано со сложным течением воспалительных процессов при ХРС. К тому же, показано, что у пациентов с хроническим полипозным риносинуситом (ХПРС) при одинаковой клинической картине может иметь место различие в иммунологических механизмах заболевания [5]. Это усложняет возможность определения степени тяжести и клинического прогноза патологии, что создает трудности в разработке персонализированных протоколов лечения пациентов и способствует осложнениям. На настоящий момент имеются попытки обобщения данных о связи дефекта генов с течением ХПРС и эффективностью проводимой терапии. Однако полученные данные противоречивы и малочисленны, в связи с чем, изучение генов, которые контролируют активность наиболее значимых цитокинов является важной задачей в выявлении предрасположенности к заболеванию, а также прогнозированию эффективности лечения. Кроме того, исследование молекулярно-генетических механизмов ХРС с полипами и без полипов будет способствовать установлению типа воспалительного процесса для персонализированного подбора таргетной терапии пациентов.

**Целью исследования** явилось изучение полиморфизма генов *IL-4 (C-589T)*, *IL-10 (G-1082A)*, *IL-17 (G-197A)*, *IL-1 $\beta$  (T-31C)*, *TNF- $\alpha$  (G-308A)* у больных хроническим риносинуситом с полипами и без полипов.

**Материалы и методы исследования.** В исследование были включены 170 пациентов с ХРС, из которых 100 человек составили пациенты с ХПРС и 70 пациентов с ХРС без полипов носа (группа сравнения), в возрасте от 19 до 65 лет ( $47,6 \pm 10,5$ ). Длительность заболевания у пациентов составила от 3 до 8 лет. Клиническое обследование больных ХРС с полипами и без полипов носа включало сбор анамнеза и оториноларингологический осмотр. Диагноз ХРС ставился согласно EPOS 2020 [6]. Выделение ДНК проводили из цельной венозной крови наборами «Проба-рапид-генетика («ДНК-технология», Россия). Оценка полиморфизмов генов *IL-4 (C-589T)*, *IL-10 (G-1082A)*, *IL-17 (G-197A)*, *IL-1 $\beta$  (T-31C)*, *TNF- $\alpha$  (G-308A)* в полученных образцах ДНК проводилась методом ПЦР в режиме реального времени. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программ STATISTICA 12.0 (США). Для анализа соответствия частот генотипов равновесию Hardy–Weinberg и сравнения частот

генотипов и аллелей в группах пациентов использовали  $\chi^2$  -критерий. По отношению шансов (OR) и 95% доверительному интервалу (95% ДИ) делали вывод о взаимосвязи исследуемых генотипов с риском развития ХПРС. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Анализ полученных результатов выявил различную встречаемость генетического полиморфизма цитокинов у больных ХПРС и ХРС без назальных полипов. При изучении полиморфизма *C-589T* гена *IL-4* и полиморфизма *G-1082A* гена *IL-10* в изучаемых группах пациентов не было выявлено достоверно значимых различий. Исследование полиморфных вариантов *G-197A* гена *IL-17A* показало, что генотип *197A/A* имел достоверно более низкую встречаемость у больных ХПРС, по сравнению с группой ХРС без полипов носа ( $p=0,036$ ;  $OR=2,568$ ). В связи с чем, можно предположить, что данный генотип был ассоциирован с пониженным риском развития ХПРС. При исследовании полиморфизма *T-31C* гена *IL-1 $\beta$*  в группе пациентов с ХПРС было выявлено, что частота генотипа *T/C IL-1 $\beta$*  в группе больных ХПРС была в 2 раза выше по сравнению с группой ХРС без назальных полипов ( $p=0,023$ ;  $OR=2,235$ ), что может свидетельствовать об ассоциации с повышенным риском развития заболевания [7]. Напротив, генотип *C/C IL-1 $\beta$*  встречался достоверно ниже в 1,5 раза по сравнению с группой больных без полипоза носа ( $p=0,032$ ;  $OR=1,986$ ), тем самым, ассоциировался с пониженным риском развития заболевания. Анализ полиморфизма *G-308A* гена *TNF- $\alpha$*  показал, что наиболее часто встречающимся вариантом у больных с ХРС с полипами и без полипов был генотип *-308 G/G*, однако достоверно значимых различий по данному генотипу выявлено не было. Напротив, генотип *-308 G/A* встречался в 8,5 раза чаще в группе пациентов ХПРС по сравнению с группой больных ХРС без полипов носа ( $p=0,026$ ;  $OR=1,792$ ). При изучении генотипа *-308 A/A* было выявлено что данный вариант гена также встречался в 2 раза чаще в группе больных с полипозом носа по сравнению с группой без назальных полипов ( $p=0,017$ ;  $OR=2,875$ ), что может быть ассоциировано с повышенным риском развития данного заболевания [8]. Таким образом, исследование полиморфизма генов наиболее значимых цитокинов, таких как *IL-4*, *IL-10*, *IL-17A*, *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  позволит оценить генетическую предрасположенность пациентов к хроническому полипозному риносинуситу, в связи с чем, сможет послужить основой для понимания патогенетических механизмов заболевания и подойти персонализировано к таргетной терапии пациентов, что повысит эффективность проводимого лечения.

### **Список литературы:**

1. Левченко А.С., Мезенцева О.Ю., Бушуева О.Ю., Воробьева А.А., Фрейдин М.Б., Полоников А.В. Изучение полиморфизмов генов цитокинов *IL5*, *IL1* и *TNF $\alpha$*  в формировании предрасположенности к хроническому полипозному риносинуситу // Научные результаты биомедицинских исследований. 2018. Т.4. №4. С. 10-19. doi: 10.18413/2313-8955-2018-4-4-0-2.

2. Левченко А.С. Связь полиморфизма генов IL-4, IL-6, TNF с риском развития хронического полипозного риносинусита у людей, проживающих вблизи промышленных предприятий // *Естественные и технические науки*. 2021. Т. 158. № 7. С. 65-69.
3. Левченко А.С., Воробьева А.А., Мезенцева О.Ю., Пискунов В.С., Бушуева О.Ю., Полоников А.В. Анализ полиморфизма генов цитокинов в развитии хронического риносинусита // *Российская ринология*. 2019. Т. 27. №2. С. 77-81. doi:10.17116/rosrino20192702177.
4. Моисеева Ю.П., Пискунов Г.З. Влияние полиморфизма гена IL-33 на формирование клинических фенотипов полипозного риносинусита // *Российская ринология*. 2020. Т. 28. № 4. С. 205-210. doi: 10.17116/rosrino202028041205
5. Савлевич Е.Л., Курбачева О.М., Егоров В.И. Дынева М.Е., Шиловский И.П., Хаитов М.Р. Уровень экспрессии генов цитокинов при разных фенотипах полипозного риносинусита // *Вестник оториноларингологии*. 2019. Т. 84. № 6. С. 42-47. doi:10.17116/otorino20198406142.
6. W.J. Fokkens, V.J. Luno, C. Hopkins, P.W. Hellings, R. Kern, S. Reitsma, et al. *European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps* 2020. *Rhinology*. 2020. 20 (58):1-464. doi: 10.4193/Rhin20.600.
7. Mrowicka M., Zielinska-Blizniewska H., Milonski J., Majsterek I, Olszewski J. Association of IL1 $\beta$  and IL4 gene polymorphisms with nasal polyps in a Polish population // *Molecular Biology Reports*. 2014. Vol. 41. N. 7. P. 4653-4658. doi:10.1007/s11033-014-3336-x.
8. Bernstein J.M., Anon J.B., Rontal M., Wang C, Sucheston L. Genetic polymorphisms in chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis // *Laryngoscope*. 2009. Vol. 119. N. 7. P. 1258-1264. doi:10.1002/lary.20239.

## **ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И ИСХОД COVID-19 У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ, ПОЛУЧАВШИХ ТОЦИЛИЗУМАБ**

*Бижигитова Б.Б., Ахметова Ж.С., Битанова Э.Ж.*

*НАО Казахский Национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова  
bijigitova.b@kazntmu.kz*

**Резюме:** Проведен ретроспективный анализ применения генно-инженерного биологического препарата – тоцилизумаба у больных с ревматоидным артритом. У пациентов с ревматоидным артритом, получавших в анамнезе тоцилизумаб течение и исход COVID-19 был более благоприятным по сравнению с пациентами COVID-19, получавших тоцилизумаб в ходе основного лечения COVID-19. Применение тоцилизумаба может быть эффективным лекарством для пациентов с COVID-19.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, COVID-19, цитокины, IL-6, тоцилизумаб

**Abstract:** A retrospective analysis of the use of a genetically engineered biological drug, tocilizumab, was carried out. In patients with rheumatoid arthritis previously treated with tocilizumab, the course and outcome of COVID-19 was more favorable compared with patients with COVID-19 who received tocilizumab during the main treatment for COVID-19. The use of tocilizumab may be an effective treatment for patients with COVID-19.

**Key words:** rheumatoid arthritis, COVID-19, cytokines, IL-6, tocilizumab

**Актуальность.** Тяжелый респираторный синдром, вызванный новым SARS-COV2 быстро распространился и стал глобальной проблемой медицинского общества всего мира. Течение COVID-19 варьируется от бессимптомного до крайне тяжелых и летальных исходов. Одним из важнейших патогенетических механизмов, приводящих к летальному исходу, является прогрессирование острого респираторного дистресс-синдрома. Вместе с тем сопутствующие заболевания, такие как заболевания хронические заболевания легких, сахарный диабет и аутоиммунные ревматические заболевания, в том числе и ревматоидный артрит увеличивают риск неблагоприятных исходов COVID-19.

Исследования патогенеза, течения и исхода SARS-COV2 показало, что гуморальный иммунитет играет ведущую роль в течении и исходе заболевания. Установлены некоторые сходства в патогенетическом механизме развития COVID-19 и ревматоидного артрита (РА). Выявлен повышенный уровень IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$ , а также воспалительных хемокинов CCL2, CXCL10 и IL-8 у пациентов с COVID-19 по сравнению со здоровыми людьми, и эти цитокины также являются патогенными факторами при многих ревматических заболеваниях, включая РА. Вместе с тем, при тяжелой форме COVID-19 и у пациентов с РА наблюдается снижение количества CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов наряду с более высоким повышением уровней TNF- $\alpha$ , IL-1 и IL-6 в сыворотке крови. При COVID-19 одним из важнейших медиаторов воспаления является IL-6, поскольку его уровень коррелирует с вирусной нагрузкой SARS-CoV-2.

Известно, что цитокиновый шторм определяется неконтролируемой продукцией провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-12, CCL2, CXCL10, и IL-8. Это обстоятельство является одной из ведущих предпосылок повышенной смертности от COVID-19.

В этой связи одним из активно разрабатываемых направлений является попытка снизить выраженность цитокинового шторма посредством назначения генно-инженерных биологических препаратов. Применение моноклональных антител к отдельным эпитопам вируса также является одним перспективных направлений, который позволит достичь наиболее высокого уровня выживаемости пациентов с коронавирусной инфекцией.

**Цель исследования:** Изучить особенности течения и исхода COVID-19 у пациентов с ревматоидным артритом, получавших лечение генно-инженерным биологическим препаратом - тоцилизумабом.

**Материалы и методы исследования:**

Нами проведен ретроспективный анализ пациентов с РА подтвержденным диагнозом COVID-19, получавших тоцилизумаб в анамнезе.

В I группу исследования были включены пациенты с РА подтвержденным диагнозом COVID-19, получавших тоцилизумаб в анамнезе (26 человек);

Во II группу (25 человек) вошли пациенты с подтвержденным диагнозом COVID-19, без ревматоидного артрита, тоцилизумаб включён в ходе лечения COVID-19.

#### **Методы исследования:**

Полученные данные были проанализированы с использованием программного пакета MicrosoftSPSS 23.0. Для оценки значимости различий в группах использовали критерий Хи-квадрат Пирсона (Pearson Chi-Square).

#### **Результаты исследования и обсуждение:**

Результаты сравнительного анализа течения COVID-19 между пациентами с ревматоидным артритом и COVID-19, получавших тоцилизумаб представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Течение COVID-19 по результатам КТ грудной клетки**

<b>Поражение легких</b>	<b>РА+COVID-19+ТЦЗ (n=26)</b>	<b>COVID-19+ТЦЗ (n=25)</b>	<b>P</b>
КТ 1 (поражение до 25 %)	6	1	<b>P=0.003</b>
КТ 2 (поражение от 25 до 50%)	7	6	
КТ 3 (поражение от 50 до 75%)	2	12	
КТ 4 (поражение больше 75%)	0	6	
Без пневмонии	11	0	

Из данных таблицы 1 видно, что среди пациентов с РА, получавших тоцилизумаб в анамнезе у 11 пациентов (42%) не выявлено развитие пневмонии, а также не обнаружено поражение легких больше 75%. Напротив, во II группе, у всех пациентов выявлены патологические изменения грудной клетки разной степени поражения легких на КТ, среди которых у 6 пациентов обнаружено поражение до 75%. Также во II группе самое большое количество больных (12 и 6 случаев соответственно) с поражениями от 50 до 75% и от 25 до 50% по сравнению с аналогичными показателями I группы.

Нами был также проанализирован исход COVID-19 в исследуемых группах. Результаты анализа приведены в таблице 2.

**Таблица 2. Исход COVID-19 в исследуемых группах**

<b>Группы</b>	<b>Количество исследуемых (n)</b>	<b>Исход заболевания(летальность) (n)</b>	<b>P</b>
РА+COVID-19+ТЦЗ (I группа)	26	1	<b>P=0.0043</b>
COVID-19+ТЦЗ (II группа)	25	9	



Анализ исходов COVID-19 показал, что в группе пациентов с РА, получавших тоцилизумаб в анамнезе более благоприятный исход по сравнению с группой пациентов с COVID-19, не получавших тоцилизумаб в анамнезе (II группа). Несмотря на то, что пациентам с COVID-19 без РА в схему лечения был включен тоцилизумаб, летальность была в 9 раз выше по сравнению с группой пациентов с РА, получавших его в анамнезе.

Пациентов с аутоиммунными заболеваниями часто лечат иммунодепрессантами или антицитокиновыми препаратами, что вызывает опасения относительно вероятности развития тяжелого или даже опасного для жизни течения у пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Но данный ретроспективный анализ показывает эффективность применения тоцилизумаба в терапии COVID-19. Использование блокатора рецепторов IL-6 тоцилизумаба является потенциально блокирующей мишенью подавления воспалительного шторма, тем самым останавливает альвеолярно-капиллярную газообменную дисфункцию, фиброз легких и органную недостаточность.

Таким образом, лечение тоцилизумабом способствует более низкому риску развития тяжелых форм заболевания, тем самым эффективно снижает смертность от тяжелой формы COVID-19.

### ***Литература:***

1. Santos C.S. et al. Biological agents for rheumatic diseases in the outbreak of COVID-19: friend or foe?. *RMD Open* 2021;7:e001439. doi:10.1136/rmdopen-2020-001439
2. Binqing Fu, Xiaoling Xu, Haiming Wei. Why tocilizumab could be an effective treatment for severe COVID-19?. DOI: 10.1186/s12967-020-02339-3
3. Xiaoling Xu, Mingfeng Han, , Tiantian Li, Haiming Wei. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005615117>
4. SaikaSharmeen,AhmedElghawy, FnuZarlasht, QingpingYao. COVID-19 in rheumatic disease patients on immunosuppressive agents. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. Volume 50, Issue 4, August 2020, Pages 680-68
5. Sharmeen S., Elghawy A., Zarlasht F. et al. COVID-19 in rheumatic disease patients on immunosuppressive agents. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2020.05.010
6. Que Y., Hu C., Wan K. et al. Cytokine release syndrome in COVID-19: a major mechanism of morbidity and mortality. *International Reviews of Immunology*. DOI: 10.1080/08830185.2021.1884248
7. Malgie J., Schoones J., Pijls B. Decreased Mortality in Coronavirus Disease 2019 Patients Treated with Tocilizumab: A Rapid Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies. *Clinical Infectious Diseases*. DOI: 10.1093/cid/ciaa1445
8. Luo P., Liu Y., Qiu L. et al. Tocilizumab treatment in COVID-19: A single center experience. *Journal of Medical Virology* (2020) 92(7) 814-818. DOI: 10.1002/jmv.25801

# ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ-РЕГУЛЯТОРОВ АУТОФАГИИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ДЕКСАМЕТАЗОНА В ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМЫ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

*Богомазова А.А., Ибрагимов Б.Р., Скибо Ю. В., Абрамова З.И.  
Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, г. Казань, Россия  
arnbgmz@yandex.ru*

**Введение** Актуальность исследований программированной клеточной гибели определяется взаимосвязью нарушения регуляции процесса гибели клетки (ПКГ) с большинством заболеваний. Бронхиальная астма, характеризующаяся воспалением дыхательных путей, сопровождается инфильтрацией Т-лимфоцитов и эозинофилов, повышенной секрецией провоспалительных цитокинов и обратимой обструкцией бронхов. Новые клинические и экспериментальные данные показали, что нарушение регуляции аутофагии (ПКГ II типа) является основным механизмом, лежащим в основе патогенеза астмы. Маркеры аутофагии повышены в гранулоцитах мокроты, нейтрофилах, эозинофилах и моноцитах периферической крови пациентов с астмой. Однако они противоречивы и показывают, как негативные, так и положительные эффекты аутофагии. Несмотря на важность процесса аутофагии в развитии заболевания, влияние синтетических глюкокортикоидов на неё до сих пор не изучено.

**Целью работы** является характеристика влияния дексаметазона на экспрессию основных белков-регуляторов аутофагии в лимфоцитах больных тяжелой формой атопической бронхиальной астмы (АБА).

**Материалы и методы.** В исследование были включены 15 пациентов с диагнозом АБА персистирующего течения тяжелой степени и 15 практически здоровых добровольцев, которые составили группу контроля. Диагноз верифицировали согласно Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению бронхиальной астмы (Российское респираторное общество, 2016г.).

В качестве объекта исследования были использованы лимфоциты периферической крови. Клетки культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в течение 1 часа, 4 и 6 суток. В качестве исследуемого вещества использовали дексаметазон ( $10^{-2}$  М).

Для изучения экспрессии белков аутофагии (Bcl-2, Beclin1, Vps34 и LC3-II белок) под влиянием дексаметазона, провели вестерн-блот анализ белковых лизатов клеток. Визуализацию окрашенных аутофагосом и лизосом проводили после 6 дней культивирования на флуоресцентном микроскопе Olympus IX83.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием структурных характеристик (медианы, перцентиля), а для оценки различий между отдельными выборками применяли Т-критерий Манна - Уитни (для парных сравнений различных выборок).

**Результаты и выводы.** В процессе исследования было установлено, что при длительном культивировании наблюдается повышение содержания Bcl-2 и Beclin1 у больных АБА, что может указывать на активацию аутофагии. На начальных этапах культивирования экспрессия белка VPS34 повышается, а затем снижается, что указывает на запуск стадии элонгации. Анализ содержания LC3 белка показал, что у лиц с астмой наблюдается значительное его повышение, что указывает на активное образование аутофагосом в лимфоцитах.

Результаты конфокальной микроскопии показали высокое содержание аутофаголизосом у здоровых доноров по сравнению с больными тяжёлой формы АБА, что может указывать на нарушение аутофагии у больных АБА.

Наиболее значимые результаты были получены при изучении влияния дексаметазона на экспрессию белков аутофагии. Глюкокортикоид не оказывал влияния на начальные этапы аутофагии, но стимулировал последующие стадии, в частности усиление перехода белка LC3 во II изоформу и образование аутофаголизосом у больных АБА. Это может говорить о положительном влиянии дексаметазона на процесс аутофагии и стимулировании тех этапов процесса, в которых имеются нарушения.

## **THE ROLE OF CYTOKINE IMBALANCE AND PHAGOCYTE KILLING DEFECT AS PREDICTORS OF SEVERE COVID-19**

*Bolgova A.I., Lesina O.N., Baranova N.I., Ashchina L.A.*

*Penza Institute for Postgraduate Medical Education – branch of the federal state budgetary educational institution of additional professional education*

*"Russian Medical Academy of Continuous Professional Education"*

*of the Ministry of Health of the Russian Federation*

*State Budgetary Health Institution "Penza Regional Clinical Center for Specialized Types of Medical Care" Russian Federation*

**Abstract.** The 2019 novel coronavirus infection (COVID-19) is one of the most pressing global health concerns. Cytokine storm is an important factor leading to death in patients with COVID-19. This study is aimed at studying anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines, the killing function of phagocytes in the blood serum of patients with COVID-19, depending on the severity. As a result of the data obtained, it was concluded that severe inflammatory changes in the blood are observed in patients with severe severity in the form of a significant increase in c-reactive protein, a decrease in phagocyte killing, and an imbalance of cytokines.

**Keywords:** COVID-19; Interleukin 10; SARS-CoV-2; cytokine storm; TNF-alpha.

**E-mail:** albolgova@mail.ru

Following the 2019 novel coronavirus infection (COVID-19) outbreak in Wuhan, China, the disease has rapidly spread around the world [1]. The clinical presentation of

COVID-19 can vary from asymptomatic to severe [2]. One of the most dangerous features of coronavirus infection is the high likelihood of developing acute respiratory distress syndrome (ARDS) - acute respiratory failure induced by a strong inflammatory response of the body to virus penetration [3,4]. The cytokine storm in COVID-19 usually leads to the development of ARDS, multiple organ failure, and may be fatal [5]. Elevated levels of cytokines, including tumor necrosis factor, play an important role in the pathogenesis of COVID-19 and are associated with severe disease. In the mechanism of the immune response in patients with COVID-19, both cellular and humoral components differ from other respiratory infections and remain poorly understood.

**Purpose of the study.** To determine the relationship between the level of cytokines in the blood, the killer function of phagocytes and the severity of COVID-19.

**Materials and research methods.** 51 patients with COVID-19 (33 (64.7%) women and 18 (35.2%) men) admitted for inpatient treatment at the Penza Regional Clinical Center for Specialized Medical Care were under observation. Etiological verification was carried out by detecting RNA in a swab from the nose and throat using the polymerase chain reaction method. All patients underwent standard laboratory and instrumental studies. In each patient, the levels of pro-inflammatory (tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) and anti-inflammatory (interleukin-10 (IL-10)) cytokines, the killer function of phagocytes were determined by chemiluminescence.

**Results and discussions.** All patients were divided into three groups depending on the severity of the disease. The first group consisted of 18 (35.2%) people with mild severity of COVID-19, in group 2 19 (37.2%) patients of moderate severity, in group 3 - 14 (27.4%) people with severe and extremely severe course of coronavirus infection. When studying the level of C-reactive protein (CRP) in the blood, a significant increase in indicators was found in the 3rd group (mean value  $126.76 \pm 42.5$  mg/l), while in the 1st and 2nd groups the level of CRP was  $4.8 \pm 3.3$  mg/l and  $39.8 \pm 30.78$  mg/l, respectively. In patients, the level of tumor necrosis factor- $\alpha$  (spontaneous and induced), the level of interleukin-10 (spontaneous and induced) was studied. The indices of induced TNF- $\alpha$  in patients in group 3 were the lowest (mean value  $360.46 \pm 131.21$ ) and significantly differed from the levels of induced TNF- $\alpha$  in group 1 ( $506.72 \pm 55$ ) and group 2 ( $569.83 \pm 1.2$ ). Indicators of spontaneous TNF- $\alpha$  had no significant differences in the groups. The highest level of spontaneous IL-10 was detected in the 3rd group of patients with severe severity of the disease and amounted to  $20.4 \pm 18.3$ , and in the 1st group -  $10.8 \pm 10.2$ , in the 2nd group -  $4.9 \pm 3.8$ . Induced IL-10 had the lowest value in the 3rd group of patients -  $102.3 \pm 52.78$  (in the 1st group -  $161.28 \pm 110.28$ , in the 2nd group -  $130.22 \pm 50.58$ ). The decrease in innate immunity according to the determination of phagocyte killing was significantly lower in the 3rd group of patients and amounted to  $0.66316 \pm 0.27$  (in the 1st -  $1.2 \pm 0.5$ , in the 2nd -  $0.6 \pm 0.2$ ).

### **Conclusions.**

1) In patients with severe and extremely severe course of coronavirus infection, activation of inflammation is noted with CRP values exceeding 25 norms.

2) Severe severity of COVID-19 was accompanied by impaired innate immunity (a significant decrease in phagocyte killing) and an imbalance of cytokines that regulate the immune response (a significant decrease in induced IL-10, which may be associated with depletion of anti-inflammatory activity).

### ***Bibliography.***

1. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., et al. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579 (7798), 265–269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.

2. Z. Chen et al., Code used to simulate the cooperative binding system for: De novo design of protein logic gates, *Zenodo* (2020); <https://doi.org/10.5281/zenodo.3697264>.

3. Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M., Crawford J.M., McGinn T., Davidson K.W., et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA* 2020; 323(20): 2052–9. DOI: 10.1001/jama.2020.6775

4. Peck T.J., Hibbert K.A. Recent advances in the understanding and management of ARDS. *F1000Research* 2019; 8: F1000 Faculty Rev-1959. DOI: 10.12688/f1000research.20411.1.

5. Temporary guidelines "Prevention, diagnosis and treatment of a new coronavirus infection COVID-19" dated 08.02.2021, p. 11.

## **РОЛЬ ДИСБАЛАНСА ЦИТОКИНОВ И ДЕФЕКТА КИЛЛИНГА ФАГОЦИТОВ КАК ПРЕДИКТОРОВ ТЯЖЕЛОГО ТЕЧЕНИЯ COVID-19**

*Болгова А.И., Лесина О.Н., Баранова Н.И., Ащина Л.А.*

*Пензенский институт усовершенствования врачей – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»*

*Министерства здравоохранения РФ*

*Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Пензенский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи»*

**Резюме.** Новая коронавирусная инфекция 2019 года (COVID-19) является одной из самых острых проблем мирового здравоохранения. Цитокиновый шторм является важным фактором, приводящим к летальному исходу у пациентов с COVID-19. Данное исследование направлено на изучение противовоспалительных и провоспалительных цитокинов, киллерной функции фагоцитов в сыворотке крови у пациентов с COVID-19 в зависимости от степени тяжести.

**Ключевые слова:** COVID-19; интерлейкин-10; SARS-CoV-2; цитокиновый шторм; воспалительные цитокины, ФНО- $\alpha$ .

**E-mail:** albolgova@mail.ru

После вспышки новой коронавирусной инфекции в 2019 году (COVID-19) в г. Ухане в Китае, заболевание быстро распространилась по всему миру [1]. Клиническая картина COVID-19 может варьировать от бессимптомных форм до тяжелого течения [2]. Одной из наиболее опасных особенностей коронавирусной

инфекции является высокая вероятность развития острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) – острой дыхательной недостаточности, индуцированной сильным воспалительным ответом организма на проникновение вируса [3,4].

Цитокиновый шторм при COVID-19, как правило, приводит к развитию ОРДС, полиорганной недостаточности и может быть причиной летального исхода [5].

Повышение уровня цитокинов, включая фактор некроза опухоли, играет важную роль в патогенезе COVID-19 и связано с тяжелым течением заболевания. В механизме иммунного ответа у больных COVID-19 как клеточная, так и гуморальная составляющие отличаются от других респираторных инфекций и остаются недостаточно изученными.

**Цель исследования.** Определить взаимосвязь между уровнем цитокинов в крови, киллерной функцией фагоцитов и степенью тяжести COVID-19.

**Материалы и методы исследования.** Под наблюдением находились 51 пациент с COVID-19 (33 (64,7%) женщин и 18 (35,2%) мужчин), поступившие на стационарное лечение в ГБУЗ «Пензенский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи». Этиологическая верификация проводилась обнаружением РНК в мазке из носа и зева методом полимеразной цепной реакции. Всем больным проводились стандартные лабораторные и инструментальные исследования. У каждого пациента определялись уровни провоспалительных (фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ )) и противовоспалительных (интерлейкин-10 (ИЛ-10)) цитокинов, киллерная функция фагоцитов методом хемилюминисценции.

**Результаты и обсуждения.** Все пациенты были разделены на три группы в зависимости от тяжести заболевания. Первую группу составили 18 (35,2%) человек с легкой степенью тяжести COVID-19, во 2 группе 19 (37,2%) больных средней степени тяжести, в 3 группе – 14 (27,4%) человек с тяжелым и крайне тяжелым течением коронавирусной инфекции. При изучении уровня С-реактивного белка (СРБ) в крови обнаружено значительное повышение показателей в 3-й группе (среднее значение  $126,76 \pm 42,5$  мг/л), тогда как в 1 и 2 группе уровень СРБ был  $4,8 \pm 3,3$  мг/л и  $39,8 \pm 30,78$  мг/л соответственно. У пациентов был исследован уровень фактора некроза опухоли- $\alpha$  (спонтанный и индуцированный), уровень интерлейкина-10 (спонтанный и индуцированный). Показатели индуцированного ФНО- $\alpha$  у пациентов в 3 группе были самыми низкими (среднее значение  $360,46 \pm 131,21$ ) и достоверно отличались от уровней индуцированного ФНО- $\alpha$  в 1 группе ( $506,72 \pm 55$ ) и 2 группе ( $569,83 \pm 1,2$ ). Показатели спонтанного ФНО- $\alpha$  не имели достоверных различий в группах. Самый высокий уровень спонтанного ИЛ-10 был выявлен в 3 группе больных с тяжелой степенью тяжести заболевания и составил  $20,4 \pm 18,3$ , а в 1-й группе –  $10,8 \pm 10,2$ , во 2-й группе –  $4,9 \pm 3,8$ . Индуцированный ИЛ-10 имел самое низкое значение в 3 группе пациентов –  $102,3 \pm 52,78$  (в 1 группе –  $161,28 \pm 110,28$ , во 2

группе –  $130,22 \pm 50,58$ ). Снижение врожденного иммунитета по данным определения киллинга фагоцитов было достоверно ниже в 3-й группе пациентов и составило  $0,66316 \pm 0,27$  (в 1-й  $-1,2 \pm 0,5$ , во 2-й –  $0,6 \pm 0,2$ ).

#### **Выводы.**

1) У пациентов с тяжелым и крайне тяжелым течением коронавирусной инфекции отмечается активация воспаления с показателями СРБ, превышающими 25 норм.

2) Тяжелая степень тяжести COVID-19 сопровождалась нарушением врожденного иммунитета (достоверное снижение киллинга фагоцитов) и дисбалансом цитокинов, регулирующих иммунный ответ (достоверное снижение индуцированного ИЛ-10, что может быть связано с истощением противовоспалительной активности).

#### **Список литературы:**

1. Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., et al. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579 (7798), 265–269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.

2. Z. Chen et al., Code used to simulate the cooperative binding system for: De novo design of protein logic gates, Zenodo (2020); <https://doi.org/10.5281/zenodo.3697264>.

3. Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M., Crawford J.M., McGinn T., Davidson K.W., et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA* 2020; 323 (20): 2052–9. DOI: 10.1001/jama.2020.6775.

4. Peck T.J., Hibbert K.A. Recent advances in the understanding and management of ARDS. *F1000Research* 2019; 8: F1000 FacultyRev-1959. DOI: 10.12688/f1000research.20411.1.

5. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19» от 08.02.2021, стр. 11.

## **ОСОБЕННОСТИ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ Т-ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ТИРЕОИДИТОМ**

*Бурцева А. В., Абрамова З. И.*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Институт фундаментальной медицины и биологии  
ziabramova@mail*

Аутоиммунный тиреоидит (АИТ) – хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание щитовидной железы, характеризующееся циркуляцией тиреоидных аутоантител и повышенной лимфоидной инфильтрацией, в основном Т-лимфоцитами, которые принимают участие в разрушении тканей щитовидной железы. Важным процессом, принимающим участие в патогенезе аутоиммунных заболеваний, является аутофагия. Нарушение регуляции образования аутофагосом и аутофагического потока может иметь пагубные последствия для клетки, начиная

от неспособности удаления поврежденных органелл и белков до индукции гибели клеток, вызванной аутофагией, а нарушение нормального контроля апоптоза вызывает нарушение гомеостаза и приводит к различным патологическим заболеваниям.

Наше исследование было направлено на изучение программируемой клеточной гибели, а именно апоптоза и аутофагии, в Т-лимфоцитах при аутоиммунном тиреоидите. Мы продемонстрировали, что в Т-лимфоцитах при АИТ активируется как аутофагия, так и апоптоз. Оценку апоптоза и аутофагии проводили методами трансмиссионной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Уровни белков оценивали с помощью Вестерн-блот анализа. Всего было отобрано 20 пациентов с АИТ, контрольную группу составили 29 условно здоровых доноров. Уровни proCasp3 в Т-лимфоцитах при АИТ ниже, а активной Caspase-3 выше. Кроме того, при АИТ наблюдался высокий уровень анти-апоптотического белка Bcl-2. Содержание mTOR у больных АИТ значительно выше, чем в Т-лимфоцитах здоровых доноров, что свидетельствует об их активном состоянии. По сравнению с группой здоровых доноров уровни как белков инициаторов аутофагии – ATG14 и Vps34, так и элонгации – LC3-I и LC3-II, в Т-лимфоцитах больных АИТ значительно выше, а уровень адаптерного белка p62 ниже. Анализ показал значимую корреляцию между уровнями белка LC3-I и LC3-II и функциональным состоянием железы, и корреляцию между уровнями белков proCasp3 и Caspase-3 с формой АИТ.

Мы также исследовали реакцию Т-лимфоцитов на стрессовый фактор, а именно на голод по питательным веществам. Аутофагия в здоровых Т-клетках постоянно поддерживается на базальном уровне, благодаря чему она функционирует как механизм контроля качества. Однако она усиливается в ответ на голодание, о чем свидетельствуют повышение уровней ATG14 и Vps34, LC3-II и p62 в Т-лимфоцитах здоровых доноров. Голод не усиливал активацию аутофагии в Т-лимфоцитах больных АИТ, но наблюдалось увеличение содержания p62 и нарушение слияния аутофагосом и лизосом – незавершенная аутофагия, приводящая к накоплению большого числа аутофагосом внутри клетки.

Ключевые слова: аутоиммунный тиреоидит, аутофагия, апоптоз



# CLINICAL LABORATORY PARAMETERS OF ACUTE SARS-COV-19 INFECTION - PREDICTORS OF THE DEVELOPMENT OF THE ARTICULAR SYNDROME IN THE POST-COVID PERIOD

*Byvaltsev K.<sup>b</sup>, Larionova R.<sup>a, b, \*</sup>, Takha E.<sup>a</sup>, Petrov S.<sup>a, c</sup>, Kazarian G.<sup>a</sup>, Valeeva A.<sup>a</sup>, Shuralev E.<sup>a, c, d</sup>, Mukminov M.<sup>a, c</sup>, Renaudineau Y.<sup>a, e</sup>, Arleevskaya M.<sup>a, b</sup>*

*a Central Research Laboratory, Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia*

*b Institute of Fundamental Medicine and Biology,*

*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

*c Institute of Environmental Sciences,*

*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*

*d Kazan State Academy of Veterinary Medicine Named After N.E. Bauman, Kazan, Russia*

*e CHU Toulouse, INSERM U1291, CNRS U5051, University Toulouse III, Toulouse, France*

## КЛИНИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОСТРОЙ SARS-COV-19 ИНФЕКЦИИ – ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ СУСТАВНОГО СИНДРОМА В ПОСТКОВИДНЫЙ ПЕРИОД

*Бывальцев К.А.<sup>2</sup>, Ларионова Р.В.<sup>1,2</sup>, Таха Е.А.<sup>1</sup>, Петров С.В.<sup>1,3</sup>,*

*Казарян Г.Г.<sup>1</sup>, Валеева А.Р.<sup>1</sup>, Шуралёв Э.А.<sup>1,3,4</sup>,*

*Мукминов М.Н.<sup>1,3</sup>, Ренадино И.<sup>1,5</sup>, Арлеевская М.И.<sup>1,2</sup>*

*1 Центральная научно-исследовательская лаборатория КГМА, Казань, РФ*

*2 Институт фундаментальной медицины и биологии,*

*Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, РФ*

*3 Институт экологии и природопользования,*

*Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, РФ*

*4 Казанская государственная академия ветеринарной медицины*

*имени Н.Э. Баумана, Казань, РФ*

*5 Больничный центр Тулузского университета, Тулуза, Франция*

Представлены результаты анализа данных, полученных в рамках выполнения проекта “Исследование молекулярных механизмов провокации аутоиммунных и иммуновоспалительных заболеваний SARS-CoV-19 вирусной инфекцией”.

Одну из ключевых ролей в развитии аутоиммунных и иммуновоспалительных заболеваний, несомненно, играют инфекции. Чёткие представления о механизмах их триггерной роли в развитии патологической аутоиммунных и воспалительных реакций не только имеют значение в понимании фундаментальных основ аутоиммунитета, но и актуальную практическую значимость, поскольку при всё возрастающем интересе к преคลินิกским стадиям заболеваний понимание этих механизмов будет полезным в выявлении этих заболеваний на самых ранних стадиях или даже позволит предотвратить или отсрочить их развитие, исключив модифицируемые средовые факторы или с помощью адекватного терапевтического вмешательства. Мы проводим

исследования механизмов развития патологических аутоиммунных и иммуновоспалительных реакций, спровоцированных новой острой вирусной инфекцией SARS-COV-19. Различные вирусные инфекции являются известными провокаторами аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Роль вирусов, в том числе коронавирусов, в патогенезе системной красной волчанки, ревматоидного артрита, синдрома Шегрена, рассеянного склероза, аутоиммунного тиреоидита и многих других активно обсуждается и исследуется (1, 2). Анализ литературы позволил выделить следующие аспекты патогенеза SARS-COV-19 и противовирусного ответа, чреватые развитием аутоиммунных и иммуновоспалительных заболеваний:

Предполагаемая рядом авторов длительная персистенция вируса с наиболее вероятной локализацией в ЖКТ (3). При наличии дефектов иммунного надзора, признаки которых мы обнаружили в случае другой – ВПГ – инфекции (4), недостаточно глубокое состояние латентности вируса может поддерживать вялотекущие противовирусные реакции. В случае предрасположенности к РА, это может провоцировать развитие заболевания.

Основной мишенью SARS-COV-19 вируса является респираторный тракт (5, 6). В настоящее время является общепризнанным тот факт, что самые ранние – доклинические стадии РА – развиваются на слизистых оболочках респираторного тракта.

Центральное место в патогенезе SARS-COV-19 инфекции занимает выброс провоспалительных цитокинов, интенсивность которого определяет, в частности, исход инфекции (7). Провокация продукции этих факторов у предрасположенных к РА лиц чревата развитием заболевания (8).

Следует отметить, что интенсивность и продолжительность продукции провоспалительных цитокинов зависит от подключения к противовирусному ответу интерферон-зависимых факторов, приводящего к переключению на адаптивные иммунные реакции, в частности – к выработке антивирусных антител.

Задачами данного фрагмента исследований были

1. Выявление возможной зависимости развития признаков воспалительного процесса в суставах в постковидном периоде от особенностей клинической картины острого периода SARS-COV-19 инфекции.

2. Анализ особенностей уровней противовирусных антител в остром периоде, через 3-4 недели и 3 и более месяцев после реконвалесценции в подгруппах лиц с суставным синдромом (n=28) и без него (n=29) в постковидном периоде.

Информация о клинических особенностях острой SARS-COV-19 инфекции получена из медицинских документов. На сроках 3-4 недели и 3 и более месяцев после реконвалесценции пациенты обследовались ревматологами.

Проводилась ПЦР диагностика SARS-COV-19 инфекции в соскобах из носоглотки в острый период инфекции и после стихания её симптомов. Исследование уровней IgM и IgG антивирусных антител (ИФА) проводилось в острый период инфекции и на сроках 3-4 недели и 3 и более месяцев после реконвалесценции.

## **Результаты.**

1. Вероятность развития признаков воспалительного процесса в суставах обратно пропорциональна возрасту – у молодых она выше.

2. Постковидный суставной синдром достоверно чаще развивается у лиц с осложнённым ревматологическими заболеваниями семейным анамнезом.

3. В относительно небольших выборках выявлена тенденция к более частым лёгким случаям перенесённой вирусной инфекции в группе пациентов с постковидным суставным синдромом. Эта тенденция подтвердилась при исследовании корреляции Спирмена.

4. В группе пациентов с постковидным суставным синдромом выявлены достоверно более низкие уровни IgM и IgG антивирусных антител по сравнению с пациентами без признаков поражения суставов. На сроках 3-4 недели и 3 и более месяцев после реконвалесценции уровни этих антител в группах были сравнимыми. Эти различия не были обусловлены большей частотой лёгких случаев вирусной инфекции в группе пациентов с постковидным суставным синдромом.

5. Уровни IgM и IgG антител коррелировали со степенью поражения лёгких в остром периоде.

6. IgM антитела выявлялись также через 3-4 недели после реконвалесценции, их уровни были обратно пропорциональны возрасту пациентов. Они также определялись на сроках 3 и более месяцев после реконвалесценции, причём их уровни коррелировали с поражением ЖКТ в остром периоде инфекции.

7. Уровни IgG антител в позднем постковидном периоде коррелировали с тяжестью перенесённой острой вирусной инфекции и поражением кожи в остром периоде.

Таким образом, выявлены определённые различия в частоте лёгких и тяжёлых случаев острой SARS-COV-19 инфекции и в динамике выработки противовирусных антител в группах пациентов с постковидным суставным синдромом и без него.

Ключевые слова: SARS-COV-19 инфекция, постковидный синдром, антивирусные антитела

Эл. адрес: pcketfllofstars@gmail.com

## **Список литературы:**

1. *Viruses and Autoimmunity: A Review on the Potential Interaction and Molecular Mechanisms.* Maria K. Smatti, Farhan S. Cyprian, Gheyath K. Nasrallah, Asmaa A. A. Thani, Ruba O. Almishal, Hadi M. Yassine. *Viruses.* 2019 Aug 19;11(8):762. doi: 10.3390/v11080762.

2. *Coronavirus pathogenesis* Susan R Weiss 1, Julian L Leibowitz. *Adv Virus Res.* 2011;81:85-164. doi: 10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2.

3. *The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients.* Yifei Chen, Liangjun Chen, Qiaoling Deng, Guqin Zhang, Kaisong Wu, Lan Ni, Yibin Yang, Bing Liu, Wei Wang, Chaojie Wei, Jiong Yang, Guangming Ye, Zhenshun Cheng. *J Med Virol.* 2020 Jul;92(7):833-840. doi: 10.1002/jmv.25825. doi: 10.1002/jmv.25825.

4. In seroconverted rheumatoid arthritis patients a multi-reactive anti-herpes IgM profile is associated with disease activity. Regina V. Larionova, Marina I. Arleevskaya, Olga A. Kravtsova, Shamil Validov, Yves Renaudineau Clin Immunol. 2019 Mar;200:19-23. doi: 10.1016/j.clim.2019.01.004.

5. Radiographic-clinical correlation in severe acute respiratory syndrome: study of 1373 patients in Hong Kong. Gregory E. Antonio, Clara G. C. Ooi, Ka Tak Wong, Eva L. H. Tsui, Joyce S. W. Wong, Alan N. L. Sy, Joyce Y. H. Hui, Cho Yin Chan, Henry Y. H. Huang, Yip Fai Chan, Tai Pang Wong, Lilian L. Y. Leong, Jane C. K. Chan, Anil T. Ahuja Radiology. 2005 Dec;237(3):1081-90. doi: 10.1148/radiol.2373041919.

6. Evaluation of WHO criteria for identifying patients with severe acute respiratory syndrome out of hospital: prospective observational study. Timothy H Rainer , Peter A. Cameron, DeVilliers Smit, Kim L. Ong, Alex Ng Wing Hung, David Chan Po Nin, Anil T. Ahuja, Louis Chan Yik Si, Joseph J. Y. Sung BMJ. 2003 Jun 21;326(7403):1354-8. doi: 10.1136/bmj.326.7403.1354.

7. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19. Jun Wang, Qian Li, Yongmei Yin, Yingying Zhang, Yingying Cao, Xiaoming Lin, Lihua Huang, Daniel Hoffmann, Mengji Lu, Yuanwang Qiu. Front Immunol. 2020 Aug 18;11:2063. doi: 10.3389/fimmu.2020.02063. eCollection 2020.

8. How Rheumatoid Arthritis Can Result from Provocation of the Immune System by Microorganisms and Viruses. Marina I. Arleevskaya, Olga A. Kravtsova, Julie Lemerle, Yves Renaudineau, Anatoly P. Tsibulkin. Front Microbiol. 2016 Aug 17;7:1296. doi:10.3389/fmicb.2016.01296. eCollection 2016.

## АНАЛИЗ МИКРОБИОМА СЛИЗИСТОЙ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ СРЕДИ ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Дисюк Е. А.<sup>1</sup>, Лисовская С.А.<sup>2,3</sup>, Каюмов А. Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, г. Казань, РФ

<sup>2</sup> ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, РФ

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет»

ekaterina.dissyuk@mail.ru, s\_lisovskaya@mail.ru, kairatr@yandex.ru

### Резюме

Проведен анализ состава микробиома слизистой ротовой полости в группах «условно здоровых лиц» и пациентов с диагнозом бронхиальная астма. Выявлены отличия в составе и количестве микроорганизмов между группами. Микроскопические грибы в группе «БА» встречались в 81,25% случаев, что в 1,67 раза чаще, чем в группе «УЗЛ», где процент встречаемости составил 48,48%. В группе «УЗЛ» бактериальные ассоциации доминировали над грибково-бактериальными.

**Ключевые слова:** микробиоценоз ротовой полости, бронхиальная астма, бактериальные ассоциации, грибково-бактериальные ассоциации.

### Abstract

The analysis of the composition of the microbiome of the oral mucosa in the groups of "conditionally healthy individuals" and patients with a diagnosis of bronchial asthma was carried out. Differences in the composition and number of microorganisms

between the groups were revealed. Microscopic fungi in the "BA" group were found in 81,25% of cases, which is 1,67 times more common than in the «СНР» group, where the percentage of occurrence was 48,48%. In the «СНР» group, bacterial associations dominated over fungal-bacterial associations.

**Key words:** microbiocenosis of the oral cavity, bronchial asthma, bacterial associations, fungal-bacterial associations.

### **Актуальность**

По данным ВОЗ, ежегодно острыми и хроническими респираторными инфекционными заболеваниями болеет каждый третий житель планеты. Принято считать, что причинами частых респираторных инфекций является дисфункция иммунной системы. Однако, полость рта представляет собой своеобразную экологическую систему, которая тесно связана с внутренней средой организма и его внешним окружением. Поэтому возникает необходимость рассматривать проблему с позиции оценки микробиоты верхних дыхательных путей и реализации её возможного патогенного влияния на организм человека. Внедрение современных технологий изучения микробиома человека, позволило получить информацию о сложности микробных сообществ в этом локусе. Представители аутохтонной и транзитной микрофлоры носоглоточного локуса могут продуцировать медиаторы, ответственные за реакции гиперчувствительности немедленного типа. Считается, что воспаление при хронических заболеваниях респираторного тракта интенсивно поддерживается дисбиотическими нарушениями на слизистых оболочках дыхательных путей. Персистирующая бактериальная и грибковая инфекции – один из важнейших факторов в развитии хронической патологии дыхательной системы. Бронхиальная астма является одним из самых частых хронических заболеваний легких. В нашей стране по данным эпидемиологического исследования 2014 г. распространенность бронхиальной астмы среди взрослых составила 6,9%.

**Целью исследования** является изучение микробиома слизистой ротовой полости в норме (группа «условно здоровых лиц») и при патологии (пациенты с диагнозом бронхиальная астма).

**Материалы и методы.** Обследовано 65 пациентов, составляющие взрослое население, в возрасте от 18 до 75 лет, 33 из которых являлись здоровыми донорами. Все больные обследованы в период обострения заболевания. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами. На каждого больного и испытуемого из группы «условно здоровые лица» заполнялась индивидуальная регистрационная карта. Микробиологическое исследование образцов слизистой ротовой полости проводилось классическими микробиологическими методами, выделение чистой культуры на элективных и дифференциально-диагностических средах, и идентификация видов микроорганизмов по общепринятым биохимическим и ферментативным свойствам. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинской Декларации 2011 г.

### **Результаты исследования.** Сформированы группы пациентов:

1. Группа «условно здоровые лица» (УЗЛ), взрослое население (возраст 18 - 44 лет, 45-59 и старше 60)
2. Группа пациентов с диагнозом бронхиальная астма (БА), взрослое население (возраст 18 - 44 лет, 45-59 и старше 60).

Стафилококки были представлены 2 видами: *S. aureus* и *S. epidermidis*. *Streptococcus* spp у 55,3% пациентов обеих групп выделялся в значимых количествах более 10<sup>4</sup> КОЕ/тамп. Кроме того, в микробном пейзаже встречались, и грамотрицательные бактерии *Klebsiella* spp. Стоит отметить, что у пациентов группы «условно здоровые лица» в 48,48% мазков со слизистых присутствовала грибковая микрофлора, где основным представителем являлся дрожжевой грибок *Candida albicans* (42,4% от общего количества грибковых изолятов). Высеивались также виды: *C. parapsilosis* (12,12%), *C. tropicalis* (3,03%). Анализ микробного биоценоза полости рта у пациентов с диагнозом «бронхиальная астма», показал, что микробный пейзаж был представлен полимикробной флорой и включал в себя как условно-патогенные бактерии, так и микроскопические грибы. Ведущими представителями бактериальной флоры: грамположительные – *Streptococcus* spp., грамотрицательные – *Klebsiella* spp. Представителем грибковой флоры – *C. albicans*. Оценка состава микробных ассоциаций в группе 2 показала, что грибково-бактериальные ассоциации доминировали над бактериальными, причем у пациентов старше 60 лет бактериальные ассоциации отсутствовали.

Таким образом, сравнительный анализ микробного биоценоза слизистой ротовой полости двух основных групп среди взрослого населения: в норме (группа «условно здоровых лиц») и при патологии (пациенты с диагнозом бронхиальная астма), показал отличия в частоте встречаемости условно-патогенных видов микроорганизмов и количестве участников микробных ассоциаций. В группе 2 (бронхиальная астма) микроскопические грибы встречались в 81,25% случаев, что в 1,67 раза чаще, чем в группе «условно здоровые лица», где процент встречаемости составил 48,48%. Содержание *C. albicans* и *C. tropicalis* значимо коррелирует с повышением содержания лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и нейтрофилов. Интересно, что анализ не выявил связи между высоким содержанием золотистого стафилококка, стрептококка и показателями анализа крови, что по всей видимости, может быть ложноотрицательным результатом и требует повышения объема выборки.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 20-64-47014).*

### **Список литературы**

1. Morris D.P., Nagr A. Biofilm: Why the Sudden Interest? // *The Journal of Otolaryngology*, 2005, 34 (Suppl. 2): p. 56–59.
2. *Общая заболеваемость взрослого населения России в 2015 году. Статистические материалы. Часть IV // Сборник Департамента мониторинга, анализа, и стратегического*

развития здравоохранения Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва 2016.

3. Pereira C. A., Toledo B.C, Santos C.T. et al. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013, Vol. 76 (4): 419-424. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.05.001>

4. Лисовская С.А., Халдеева Е.В., Глушко Н.И. Роль бактериально-грибковых ассоциаций в развитии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи// *Практическая медицина*, 2016, Т.5, №97, С 30-33.

5. Winther B., Gross B. C, Hendley J. O. et al. Location of Bacterial Biofilm in the Mucus Overlying the Adenoid by Light Microscopy // *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009; 145 (12): 1239–1245.

6. Calo L., Passali G. C., Galli J. et al. Role of biofilms in chronic inflammatory diseases of the upper airways // *Adv Otorhinolaryngol*. 2011; 72: 93–96.

7. Coticchia J., Zuliani G., Coleman C. et al. Biofilm Surface Area in the Pediatric Nasopharynx // *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007; 133: 110–114.

8. Nistico L., Kreft R., Gieseke A. et al. Adenoid Reservoir for Pathogenic Biofilm Bacteria // *J. Clin. Microbiol*. 2011; 47 (4): 1411–1420.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМ СИНДРОМОМ

Жаранкова Ю.С.<sup>1</sup>, Скибо Ю.В.<sup>2</sup>, Гурьянова И.Е.<sup>1</sup>,  
Полякова Е. А.<sup>1</sup>, Абрамова З.И.<sup>2</sup>, Белевцев М.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Республиканский научно-практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия  
[marukovich85@mail.ru](mailto:marukovich85@mail.ru)

**Введение.** Иммунная система организма защищает его от патогенов (вирусов, бактерий, грибов и т.д.) и контролирует уничтожение дефектных или устаревших клеток. Дефицит отдельного звена иммунитета приводит к возникновению различных заболеваний. Первичные иммунодефицитные состояния – гетерогенная группа редких, преимущественно наследственных заболеваний, характеризующихся нарушением работы одного или нескольких компонентов иммунной системы. Одним из таких заболеваний является аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС) – группа первичных иммунодефицитов, в основе которых лежат мутации генов, приводящие к дефектам апоптоза.

**Материалы и методы.** В исследование, проведенное на базе Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии (Республика Беларусь) были включены 8 пациентов с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом. Диагноз «АЛПС» ставили на основании диагностических критериев, разработанных ESID (European Society for Immunodeficiencies). Оценивали стандартные гематологические показатели. Оценку популяций лимфоцитов, включая двойных негативных Т-клеток (ДНТ,

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), проводили с помощью методов стандартной проточной цитометрии.

**Результаты.** Диагноз АЛПС установлен у 8 пациентов из 5 семей в период с 2009 по 2014 гг. Медиана возраста манифестации составила 3 года. У 3 пациентов диагноз был выставлен после 30 лет. Лимфаденопатия и спленомегалия являлись ведущими клиническими проявлениями у всех пациентов.

Изучение иммунофенотипа лимфоцитов выявило значительное повышение активированных Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>HLA<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>), а также NKT<sup>+</sup>-клеток (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). Повышенное содержание активированных Т-клеток с высокой степенью может указывать на дефект в программе апоптоза, что характерно для АЛПС. Оценка ДНТ – один из важных диагностических критериев АЛПС, верхней границей нормы которого является их уровень менее 6 %. В проведенном исследовании этот показатель варьировал от 7,6 до 40 %.

АЛПС – редкий синдром, в основе которого лежит ряд патологических механизмов, в том числе апоптоз лимфоцитов. Большинство из них имеют мутации в гене рецепторного белка Fas. У 1/3 пациентов мутации, ассоциированные с дефектами апоптоза, выявить не удастся. Интересно, что похожая на АЛПС клиническая картина с нарушением FAS-зависимого апоптотического пути может наблюдаться при других моногенных нарушениях иммунной системы.

## **ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЕЙ ПИЩЕВЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССОВ G ИЕ У РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ КАТЕГОРИЙ**

*Камальдинова Д.Р.<sup>1</sup>, Сынбулатова Г.Э.<sup>1</sup>, Сенина А.М.<sup>1</sup>,*

*Решетник О.А.<sup>2</sup>, Григорьева Т.В.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> *Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, РФ*

<sup>2</sup> *Казанский национальный исследовательский технологический университет,  
г. Казань, РФ*

*kamaldila\_rav@mail.ru, tatabio@inbox.ru*

**Аннотация:** Пищевая непереносимость может не иметь явных клинических проявлений, в отличие от истинной пищевой аллергии. Повышение уровня IgG свидетельствует о напряжении иммунной системы, связанное с пищевыми предпочтениями человека. Связь микробиома кишечника и воспалительными реакциями неоспорима. В своей работе мы планируем оценить уровни IgG по профилю в 90 аллергенов для взрослых и 37 аллергенов для детской панели. В перспективе, планируем оценить эффект элиминационной диеты на показатель IgG и микробиоту кишечника.

**Abstract:** Food intolerance may not have obvious clinical manifestations, unlike a true food allergy. An increase in IgG levels indicates a strain on the immune system associated with a person's food preferences. The connection between the gut microbiome



and inflammatory reactions is undeniable. In our work, we plan to evaluate IgG levels according to a profile of 90 allergens for adults and 30 allergens for a children's panel. In the future, we plan to evaluate the effect of the elimination diet on the IgG index and the intestinal microbiota.

**Ключевые слова:** пищевая аллергия, пищевая непереносимость, профили пищевых аллергенов.

Неблагоприятные реакции на пищевые компоненты обычно классифицируются как пищевая аллергия (IgE-опосредованная) и пищевая непереносимость (IgG-опосредованная). При этом пищевая непереносимость может быть связана с целым рядом заболеваний и не иметь классических клинических проявлений, как при аллергии. Повышенная выработка специфичных к пище антител IgG в сочетании со снижением выработки противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10 и TGFβ1, была связана с синдромом раздраженного кишечника [4]. Имеются публикации, описывающие связь между неврологическими проявлениями, такими как мигрень и пищевой непереносимостью [3, 4]. А также, пищевая непереносимость была связана с такими расстройствами, как атеросклероз и астма [4]. Элиминационная диета приводит к значительному улучшению показателей симптомов [1]. Пациентов с клиническими симптомами аллергии в норме обследуют на наличие специфических IgE, которые могут отсутствовать, если аллергические проявления связаны с пищевой непереносимостью [2]. Важно заметить, что IgE запускает реакцию немедленного типа (истинная пищевая аллергия) и зависит от активации тучных клеток в определенных тканях, включая кожу, дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, слизистые оболочки и сердечно-сосудистую. Таким образом есть возможность связать клинические проявления с пищевым аллергеном. IgG ведет к реакции замедленного типа (время проявления симптомов возможно через несколько часов или даже дней), что не дает возможности просчитать вероятный аллерген. Хронические рецидивирующие заболевания органов пищеварения сопровождаются пищевой непереносимостью в 25–35 % случаев, в то время как частота встречаемости истинной пищевой аллергии составляет всего около 1,5 % населения [6, 10]. Считается, что основным механизмом формирования пищевой чувствительности является проницаемость кишечного барьера. Повышение проницаемости желудочно-кишечного тракта может привести к повышенному поступлению аллергенных белков из просвета кишечника в системный кровоток, что активизирует иммунную систему в сторону внекишечного воспаления. Слизистая оболочка кишечника является важным иммунным органом человека, так как имеет наибольшее скопление иммунных клеток в человеческом организме. Взаимодействуя с этой лимфоидной тканью, кишечная микрофлора принимает активное участие в формировании местного и системного иммунного ответа. Микроорганизмы кишечника оказывают разнообразное метаболическое воздействие, модулируют целостность тканей, что приводит к становлению здоровой экосистемы, неблагоприятной для инвазии и

колонизации патогенов. Изменения качественного и количественного состава пристеночной и полостной микрофлоры кишечника могут провоцировать неадекватный иммунный ответ на пищевые аллергены [5, 8, 9]. Условно патогенная микрофлора может способствовать сенсibilизации организма к пищевым аллергенам, вызывая увеличение проницаемости и влияя на дифференцировку Т-хелперов в сторону провоспаления [7, 8].

При параллельной постановке анализов на IgG и IgE, продукты, вызывающие аллергическую специфическую реакцию, так же проявили себя и при анализе на пищевую непереносимость. При этом в панели на пищевую непереносимость есть продукты, которые не вызывают выработку IgE. В связи с чем, в своей панели мы оставили оценку только IgG.

В связи с этим целью нашей работы является оценка распространенности специфических к пище антител IgG среди пациентов не имеющих клинических симптомов аллергии. Проследить наличие корреляций между кишечной микрофлорой и чувствительности к пищевым антигенам. В последующем, хотелось бы оценить влияние элиминационной индивидуальной диеты на показатели IgG и возможной корректировки микробиоты кишечника.

### **Пациенты**

В исследовании принимали участие условно здоровые пациенты (n=46) различных возрастных групп (от 7 до 70 лет). Все пациенты не имели клинических признаков аллергии (по личной оценке пациентов).

### **Методы**

Пациенты различных возрастных групп были обследованы на наличие специфических к пище IgG - антител. Тестирование проводили на специфические IgG методом твердофазного неконкурентного непрямого иммуноферментного анализа. При составлении панелей было учтено стандартное меню для нашей полосы с охватом всех групп продуктов, были включены общепризнанные аллергены, а также гипоаллергенные продукты. В таблице 1,2 представлены профили аллергенов для взрослой (90 пищевых аллергенов) и детской (39 пищевых аллергенов) панелей.

**Таблица 1. Взрослая пищевая панель (90 аллергенов)**

<b>Группа продуктов</b>	<b>Наименование аллергена</b>
<b>Ягоды и фрукты</b>	Ананас, арбуз, апельсин, банан, виноград красный, гранат, груша, инжир, киви, клубника, лимон, манго, персик, фейхоа, финик, черешня красная, яблоко
<b>Рыба и морепродукты</b>	Горбуша, форель, лосось, судак, тунец, скумбрия, икра красная, кальмары, мидии, креветки
<b>Овощи и зелень</b>	Баклажан, авокадо, цветная капуста, горох, огурец, морковь, картофель, чеснок, капуста белокочанная, оливки, болгарский перец красный, петрушка, редис, сельдерей, соевые бобы, томат, кабачок, лук репчатый, укроп, шампиньоны

<b>Крупы и мука</b>	просо (пшено), рис, пшеничная мука, гречневая крупа, овсяные хлопья, кукурузная крупа, киноа, глютен
<b>Сахар и сахарозаменители</b>	Мёд, шоколад, свекольный сахар
<b>Молочные продукты</b>	сыр голландский, йогурт, молоко козье, молоко коровье цельное, казеин, альфа-лактальбумин, бета-лактоглобулин
<b>Орехи</b>	Кокос, фундук, арахис, грецкий орех
<b>Мясные продукты и яйца</b>	Баранина, говядина, кролик, курица, свинина, утка, яйцо куриное цельное, желток куриного яйца нативный, белок куриного яйца нативный, конина, майонез
<b>Напитки</b>	Какао, кофе, молотый
<b>Пищевые добавки и специи</b>	Горчица, смесь специй, карри, корица, корень хрена, кунжут, глутамат натрия, семена подсолнечника

*Примечание: цветные обозначения продуктов: цветная капуста – гипоаллергенный продукт; гранат – низкая аллергенность; ананас – средняя аллергенность; апельсин – высокая аллергенность.*

**Таблица 2. Детская пищевая панель (37 аллергенов)**

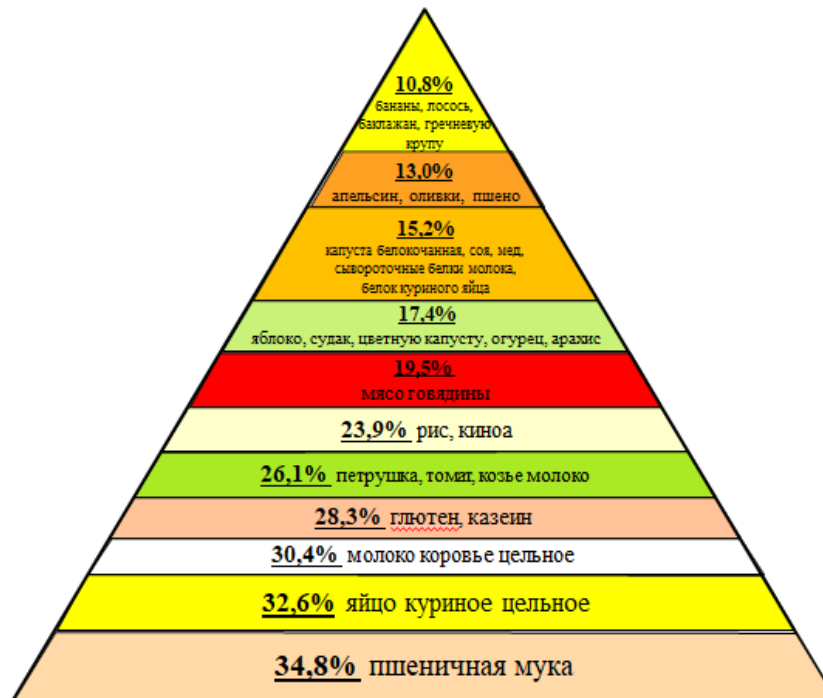
<b>Группа продуктов</b>	<b>Наименование аллергена</b>
<b>Ягоды и фрукты</b>	апельсин, банан, клубника, персик, арбуз, черешня красная, яблоко, груша
<b>Рыба и морепродукты</b>	лосось, креветки, сельдь, треска, икра красная,
<b>Овощи и зелень</b>	томат, кабачок, картофель, шампиньоны, соевые бобы
<b>Крупы и мука</b>	рис, пшеничная мука, овсяные хлопья, кукурузная крупа, глютен
<b>Сахар и сахарозаменители</b>	Мёд, шоколад, свекольный сахар
<b>Молочные продукты</b>	йогурт, молоко коровье цельное
<b>Орехи</b>	Кокос, арахис, грецкий орех
<b>Мясные продукты и яйца</b>	говядина, курица, свинина, яйцо куриное цельное
<b>Пищевые добавки и специи</b>	глутамат натрия, семена подсолнечника

*Примечание: цветные обозначения продуктов: цветная капуста – гипоаллергенный продукт; гранат – низкая аллергенность; ананас – средняя аллергенность; апельсин – высокая аллергенность.*

### **Результаты и обсуждение**

Наиболее часто у пациентов обнаруживались пищевые антитела IgG к пшеничной муке у 34,8% пациентов, к цельному куриному яйцу у 32,6%, цельное

коровье молоко у 30,4%, к глютену, казеину у 28,3%; петрушка, томаты, козье молоко у 26,1%; к рису и киноа у 23,9%, к мясу говядины у 19,5%; яблоко, судак, цветная капуста, огурец, арахис у 17,4%; капуста белокочанная, соя, мёд, сывороточные белки молока, белок куриного яйца у 15,2%; апельсин, оливки, пшено у 13,0%; банан, лосось, баклажан, гречневая крупа у 10,8% пациентов (рис.1).



**Рисунок 1. Частота встречаемости чувствительности к пищевым аллергенам**

Максимальные значения соответствуют общепризнанным распространённым аллергенам, хотя в современном обществе значительные показатели имеют и «гипоаллергенные» продукты. Это может быть связано как с измененной, редуцированной микробиотой кишечника на фоне ухудшающейся экологии, приема антибиотиков и перенесенной инфекции во время пандемии Covid-19, так и с качеством самих продуктов.

**Список литературы:**

1. Atkinson W., Sheldon T.A., Shaath N., Whorwell P.J. Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial//Gut. -2004. - 53(10). - 1459-1464 p.
2. Berni Canani R., De Filippis F., Nocerino R. et al. Gut microbiota composition and butyrate production in children affected by non-IgE-mediated cow's milk allergy//Sci Rep.- 2018. – 8.
3. Mitchell N. et al. Randomised controlled trial of food elimination diet based on IgG antibodies for the prevention of migraine like headaches // Nutrition Journal. – 2011. – 10(85).
4. Shakoor Z., AlFaiqi A., AlAmro B., AlTawil L.N., AlOhalay R.Y. Prevalence of IgG-mediated food intolerance among patients with allergic symptoms // Ann Saudi Med. – 2016. - 36(6). - 386-390 p.

5. Бердников А.А., Бавыкина И.А., Звягин А.А. Проницаемость кишечника при аллергических заболеваниях // Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья. – 2020. – № 80. – С.22-27.
6. Гурова М.М., Романова Т.А., Попова В. С. Роль кишечной микробиоты в формировании пищевой непереносимости // Медицина: теория и практика. – 2019. – 4(1). – С. 229-232.
7. Мазурина С.А., Гервазиева В.Б., Сверановская В.В. Микробиота кишечника и аллергические заболевания // Журнал инфектологии. – 2020. - 12(2). - С.19-29.
8. Турчина М. С., Королева Л. Ю., Букреева М. В., Ерофеева М. В., Борзова Д. В. Взаимосвязь пищевой аллергии и состава кишечной микробиоты при синдроме раздраженной толстой кишки // Медицинский алфавит. Серия «Практическая гастроэнтерология». – 2019. – Т. 2. – 13 (388). – С. 39–42.
9. Хайтович А.Б., Воеводкина А.Ю. Микробиом и его влияние на здоровье человека // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2019. – 9(1). -С. 61-70.
10. Пищевая непереносимость [Электронный ресурс]: Гастроэнтерологический центр профессора Мехтиева. – Режим доступа: <https://gastroe.ru/poleznaya-informatsiya/blog/pishchevaya-neperenosimost/> (Дата обращения: 16.05.2022).

## СТРЕСС КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

*Капитонова Н.В.<sup>1</sup>, Коровина М.О.<sup>1,2</sup>, Арлеевская М.И.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет

<sup>2</sup> КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

**Актуальность:** Ревматические болезни – один из ключевых кандидатов на включение в список социально значимых заболеваний в России в ближайшем будущем. На 2018 год был зарегистрирован 312 631 больной ревматоидным артритом (РА) в России (212,8 на 100 тыс. чел.). Статистический учет больных сильно осложнен, в то время как экономическое бремя ревматических заболеваний резко возрастает по мере течения болезни. Причинные факторы возникновения ревматоидного артрита как аутоиммунного заболевания связывают с генетической патологией. Однако, с каждым годом накапливается все больше клинических данных о том, что в инициации болезни и об отягощении течения ревматоидного артрита большую роль играют стрессовые ситуации. Факты, говорящие о значении стресса в течении ревматоидного артрита, представляются достаточно убедительными, однако, достоверных фактов, свидетельствующих об этиологической роли стресса в течении болезни не было выявлено. Это послужило поводом для проведения исследования.

**Цель:** изучить влияние психического стресса на развитие и поддержания РА.

**Материалы и методы:** Проведен анализ 200 историй болезней, включающих в себя 1) пациентов с диагностированным ревматоидным артритом, состоящих на учете у ревматолога, 2) родственников этих пациентов, 3) условно здоровых лиц с неотягощенным анамнезом и без аутоиммунных заболеваний,

согласившихся на прохождение анкетирования,. Анализировались клинические (выраженность депрессии, тревожности, оценивалась напряженность обстановки дома, на работе, дефицит сна) и лабораторные данные (уровень тромбоцитов, РФ, антиЦПП, СОЭ, лейкоциты, тромбоциты, DAS28, СРБ).

Статистический анализ результатов проводился с помощью метода ANOVA-MANOVA, непараметрического критерия Манн-Уитни, корреляционного анализа Спирмана и регрессионного анализа. Результаты были обработаны с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты:** По данным литературы ведущим фактором, вызывающим суставной синдром является физическое напряжение. Стресс занимает 2 место в общей когорте причин, вызывающих РА.

Статистическая обработка выраженности депрессии показала увеличение уровня выраженности депрессии в зависимости от продолжительности заболевания. С усугублением стадии заболевания ревматоидного артрита реактивная тревожность и личностная тревожность по Спилбергу тоже увеличиваются. Непараметрический критерий Манн-Уитни показал более низкую реактивную тревожность у контрольной группы по сравнению с группой пациентов, страдающих РА.

Шкала напряженности дома и на работе показала меньшую напряженность групп болеющих по сравнению с контрольной группой. Все исследуемые группы в сравнении с контрольной имеют дефицит сна. Чем продолжительнее заболевание, тем более выраженный дефицит сна.

Корреляционный анализ Спирмана выявил прямую корреляцию между напряженностью дома и отеком суставов, напряженностью на работе и болью в суставах. Чем больше стресса испытываемые испытывали на работе и дома, тем сильнее проявлялась болезненность и отек в суставах. Регрессионный анализ выявил зависимость ревматоидного фактора от дефицита сна, зависимость СОЭ от реактивной тревожности. Зависимость уровня лейкоцитов от реактивной тревожности и дефицита сна. Есть прямая корреляция между уровнем тромбоцитов и дефицитом сна. Дефицит сна так же влияет на следующие показатели: СРБ, DAS28, СОЭ, HAQ, болезненность суставов 28(болезненность в основных 28-и суставах) отек суставов 68 (отек в 68-и суставах). Есть прямая зависимость между утренней скованностью и реактивной тревожностью и дефицитом сна.

#### **Выводы:**

1. Выявлены некоторые различия в показателях психического здоровья в группах, а именно, тенденция к нарастанию уровня депрессии по Беку в ряду «контроль-генетическая стадия РА-преклиническая стадия РА-ранний РА-развернутый РА», повышенная реактивная тревожность во всех опытных группах по сравнению с контролем, а также сходный по выраженности дефицит сна в опытных группах, достоверно превышающий таковой в контроле.

2. Обнаружена достоверная зависимость клинических признаков поражения суставов, интегральных показателей активности РА, стандартных лабораторных показателей заболевания от показателей психического здоровья, а именно от выраженности реактивной тревожности и степени недосыпания.

## **BACTERIAL BIOFILMS: INFLUENCE OF BIOCHEMICAL COMPOSITION OF THE EXTRACELLULAR MATRIX IN INTERACTION WITH ANTIBIOTICS**

*Karimova A. V., Trizna E.Y.*  
*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia*  
*karimovaagnia20@gmail.com*

**Keywords:** bacterial biofilms, extracellular matrix, antibacterial therapy

The extracellular polymeric matrix is one of the key factors influencing changes in the sensitivity to antibacterial therapy of microorganisms existing in biofilms. The chemical composition of the matrix, which is specific to each microorganism, determines its architecture and protective properties. In this case, the resistance of different pathogens in the biofilm structure to adverse influences is not the same.

The aim of this work was to determine the effect of the biochemical composition of the extracellular polymeric matrix of mono- and dimicrobial biofilms on its permeability to antimicrobial agents.

Determination of the quantitative ratio of the biopolymers comprising the matrix structure was performed by staining the mono- and dimicrobial biofilms with fluorescent dyes followed by measurement on a Tecan infinite 200 Pro microplate reader at certain wavelengths. In addition, matrix permeability to various antibiotics was assessed by incubating nitrocellulose disks on mono- and dimicrobial biofilms, which grow on LB-agar medium contains antibiotic. After 24 h disks were then transferred to the bacterial cell culture for further incubation and determination of microbial growth suppression zones around them.

The analysis of the composition of the extracellular matrix was performed on models of *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* monomicrobial biofilms and their dimicrobial communities. We revealed a significant difference in the ratio of biochemical matrix components between *P. aeruginosa* - *S. aureus*, *K. pneumonia* - *S. aureus* biofilms and their monospecies communities. In particular, there was an increase in the amount of  $\alpha$ - and  $\beta$ -polysaccharides in the *S. aureus* - *K. pneumonia* matrix and a decrease in  $\beta$ -polysaccharides, proteins and extracellular DNA in *P. aeruginosa* - *S. aureus* biofilms. Also on the example of mono- and dimicrobial biofilms of *S. aureus* and *K. pneumonia* was determined that ciprofloxacin has the greatest ability to migrate through the extracellular matrix. At the same time, the permeability for amikacin and vancomycin was significantly lower. Ampicillin was characterized by minimal ability to penetrate.

The results of this work show a difference in relation to the matrix components of pure and mixed cultures. In addition, an increase in matrix permeability to fluoroquinolone molecules in the *S. aureus*-*K. pneumonia* polymicrobial biofilm was detected, which may be related to an increase in polysaccharides in the extracellular matrix.

This work funded by a grant from the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists - candidates of sciences (№ МК-3052.2021.1.4.)

## **БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ: ЗНАЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В СПЕЦИФИКЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С АНТИМИКРОБНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ**

*Каримова А. В., Тризна Е.Ю.*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия.*

*karimovaagnia20@gmail.com*

Одним из ключевых факторов, влияющих на изменение чувствительности микроорганизмов, существующих в составе биопленок, к воздействию антибактериальной терапии является наличие внеклеточного полимерного матрикса, образуемого бактериями. Химический состав матрикса, являющийся уникальным для каждого микроорганизма, определяет его архитектуру и протекторные свойства. В связи с этим устойчивость различных патогенов в структуре биопленок к неблагоприятным воздействиям является неодинаковой.

Целью данной работы было установить влияние биохимического состава внеклеточного полимерного матрикса моно- и димикробных биопленок на его проницаемость для антимикробных препаратов.

Определение количественного соотношения биополимеров, входящих в структуру матрикса, осуществлялось путем окрашивания моно- и димикробных биопленок флуоресцентными красителями с последующим замером на микропланшетном ридере Tecan infinite 200 Pro при определенных длинах волн. Кроме этого, была проведена оценка проницаемости матрикса для различных антибиотиков, для которой проводилась инкубация нитроцеллюлозных дисков на подложках из моно- и дивидовых биопленок в агаризованной среде с антибиотиком. Затем диски переносились на культуру бактериальных клеток для дальнейшей инкубации и определения зон подавления роста микроорганизмов вокруг них.

Анализ состава внеклеточного матрикса был проведен на моделях мономикробных биопленок *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*, а также их димикробных сообществ. Было выявлено достоверное различие в соотношении биохимических компонентов матрикса между биопленками *P. aeruginosa* – *S. aureus*, *K. pneumonia* – *S. aureus* и их моновидовых сообществ. В частности,



отмечалось повышение количества  $\alpha$ - и  $\beta$ -полисахаридов в матриксе *S. aureus* – *K. pneumoniae* и уменьшение  $\beta$  - полисахаридов, белков и внеклеточной ДНК в биопленках *P. aeruginosa* – *S. aureus*. Также на примере моно- и димикробных биопленок *S. aureus* и *K. pneumoniae* было определено, что наибольшей способностью к миграции сквозь внеклеточный матрикс обладает ципрофлоксацин. В то же время проницаемость для амикацина и ванкомицина была значительно ниже. Ампициллин отличался минимальной способностью к проникновению.

Результаты данной работы указывают на различие в отношении компонентов матрикса чистых и смешанных культур. Помимо этого, было выявлено увеличение проницаемости матрикса для молекул фторхинолона в полимикробной биопленке *S. aureus* – *K. pneumoniae*, что может быть связано с повышением количества полисахаридов в составе внеклеточного матрикса.

*Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (№ МК-3052.2021.1.4)*

## **POLYMORPHISMS IN THE GENES OF PATTERN-RECOGNITION TOLL-LIKE RECEPTORS AFFECTED THE SUSCEPTIBILITY TO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

*Korovina M.O.<sup>1,2</sup>, Khaertynov K.S.<sup>1</sup>, Gabdulkhakova A.G.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *KSMA – Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia*

<sup>2</sup> *Kazan (Volga Region) Federal University*

**Abstract.** Every stage of the host response to *Mycobacterium tuberculosis* is under genetic control, including the initial encounter with mycobacteria by macrophages, epithelial cells, and dendritic cells in the lung, the induction of T cell response, and killing by activated macrophages in granulomas. The incidence of tuberculosis differs among ethnic groups, suggesting that human genetic variation is an important factor in host response to *M. tuberculosis* infection and in regulating disease susceptibility and progression.

Toll-like receptors (TLRs) are receptors of innate immune system that recognize molecular patterns associated with pathogens and initiate an immune response. TLR activation leads to signal transduction and activation of NF- $\kappa$ B, which in turn leads to the release of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), an important cytokine for macrophage activation and granuloma formation during tuberculosis infection. Normal TLR function provides for the co-activation of antigen-presenting cells, followed by activation of cellular and humoral responses. Previously, we isolated serologically active fractions of *M. tuberculosis* surface antigens, which are lipopeptides in nature and are recognized by homo- or heterodimers of TLR1, TLR2, and TLR6 receptors. Variability in the structure of the antigen-recognizing or signaling domains of the receptor due to

single nucleotide substitutions may be the reason for the weakening of the immune response to infectious agents.

Spreading of antibiotic-resistant forms of tuberculosis revives interest in the mechanisms of natural resistance to tuberculosis infection. Therefore, the search for a link between polymorphisms in TLR genes and susceptibility/resistance to tuberculosis is currently relevant. In this regard, an important task is to identify genetic markers of predisposition to the development of tuberculosis, the activity of the tuberculosis process and the development of the new technologies for the differential diagnosis of active and latent tuberculosis. A personalized approach due to genotyping will allow to identify patients with malfunctioning of the immune response and, as a result, to build new strategies in preventive and therapeutic arrangements.

**Key words:** TLR, polymorphism, susceptibility, tuberculosis, resistance, immunity.

**The aim of this work** was to search for polymorphisms of the TLR genes and their adapter proteins that affect to susceptibility of tuberculosis (TB).

**Results and Conclusions:**

The most serologically active components of mycobacterial antigens are lipopeptides which are bound by TLR-1, TLR-2, TLR-6 and TLR10. The following SNPs TLR-1 rs4833095, TLR-2 rs5743708, TLR-8 rs3764880 are good candidates due to higher frequency in different populations regarding the tuberculosis infection, as well as TLR-1 rs5743618 and TLR-6 rs5743810, because in many studies they stand out as a provocative and protective factor, respectively. These polymorphisms have a serious impact on the functional characteristics of the receptor induced by the substitution of amino acids in the protein structure. Analysis of these SNPs in Tatarstan population is our further task.

**ПОИСК ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ПАТТЕРН-РАСПОЗНАЮЩИХ  
TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА  
ВОСПРИИМЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА К МИКОБАКТЕРИИ ТУБЕРКУЛЕЗА**

*Коровина М.О.<sup>1,2</sup>, Хаертынов К.С.<sup>1</sup>, Габдулхакова А.Г.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup> КГМА - филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России*

*<sup>2</sup> ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"*

*kororulina.mo@gmail.com*

**Введение.** Каждая стадия ответа хозяина на *Mycobacterium tuberculosis* находится под генетическим контролем, включая первоначальную встречу с микобактериями макрофагами, эпителиальными клетками и дендритными клетками в легких, индукцию ответа Т-клеток и уничтожение активированными макрофагами в гранулемах. Стоит отметить, что частота возникновения туберкулеза среди этнических групп отличается, что позволяет предположить, что

генетическая изменчивость человека является важным фактором в реакции хозяина на инфекцию *M. tuberculosis* и в регулировании восприимчивости и прогрессирования заболевания.

Toll-like рецепторы (TLR) представляют собой рецепторы врожденной иммунной системы, которые распознают молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами, и инициируют иммунный ответ. Активация TLR приводит к передаче сигнала и активации NF-κB, что, в свою очередь, приводит к высвобождению фактора некроза опухоли альфа (TNF-α), важного цитокина для активации макрофагов и образования гранул во время туберкулезной инфекции. Нормальная функция TLR обеспечивает ко-активацию антиген-презентирующих клеток с последующей активацией клеточного и гуморального ответов. TLR разделяют по клеточной локализации на поверхностные (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR10), которые распознают широкий профиль соединений как гликолипиды, липопептиды и флагеллины, присутствующие на бактериях, паразитах и грибах, и на внутриклеточные (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 и TLR13), которые находятся на мембране внутриклеточных эндосом и распознают нуклеиновые кислоты, как правило, вирусного и бактериального происхождения. Ранее мы выделили серологически активные фракции поверхностных антигенов *M. tuberculosis*, которые по своей природе являются липопептидами и распознаются гомо- или гетеродимерами рецепторов TLR1, TLR2 и TLR6. Вариабельность в структуре антиген-распознающих или передающих сигнал доменов рецептора вследствие однонуклеотидных замен может оказаться причиной ослабления иммунного ответа на инфекционные агенты.

Распространение антибиотико-устойчивых форм туберкулеза возрождает интерес к механизмам естественной устойчивости к туберкулезной инфекции. Поэтому, в настоящее время актуален поиск связи между полиморфизмами в генах TLR и восприимчивостью/устойчивостью к туберкулезу. В связи с этим важной задачей является выявление генетических маркеров предрасположенности к развитию туберкулеза, активности туберкулезного процесса и разработка на их основе новых технологий дифференциальной диагностики активного и латентного туберкулеза. Персонифицированный подход за счет генотипирования позволит выявлять пациентов с нарушениями в реализации иммунного ответа и, вследствие этого, выстраивать новые стратегии в профилактических и лечебных мероприятиях.

**Ключевые слова:** TLR, восприимчивость, полиморфизм, туберкулез, резистентность, иммунитет.

**Целью** данной работы был поиск полиморфизмов генов TLR и их адапторных белков, влияющих на восприимчивость к туберкулезу (ТБ).

**Результаты:** на сегодняшний день основными рецепторами для микобактерий туберкулеза считаются TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-6, TLR-8, TLR-9. Некоторые из полиморфизмов этих рецепторов, а также адапторного белка TIRAP

были проанализированы нами в качестве предполагаемых маркеров восприимчивости к ТБ.

Особого внимания заслуживают TLR-1, TLR-2, TLR-6, т.к. они распознают липопептиды, поэтому полиморфизмы в их внеклеточных доменах могут быть ответственны за нарушение ответа на микобактерии туберкулеза.

Полиморфизм TLR-1 rs4833095 (A743G, S248N) расположен во внеклеточном домене белка TLR-1. Замена аспарагина на серин снижает экспрессию рецептора TLR-1 в клетках иммунной системы. Сообщается, что TLR-1 S248N играет важную роль в защите от туберкулеза, поскольку 248N продемонстрировал повышенный ответ активации TNF-а и NF-κB на лизаты МТВ. Исследования в Индии и Германии выявили противоречивые результаты ассоциации: rs4833095 248N играет защитную роль в отношении восприимчивости к туберкулезу у населения Индии и роль провокатора у населения Германии. [5, 18]

Для полиморфизма TLR-1 rs5743557 и rs5743596 (C2076T, S26L) в большинстве исследований в различных этнических группах показано, что присутствие минорного снижает риск развития туберкулеза. [13, 25, 26]. rs5743557, расположенный на 595 п.н. выше гена TLR-1, может влиять на промоторную активность этого гена.

Наличие полиморфизма TLR-1 rs5743604 (минорный аллель А) может свидетельствовать о повышенном риске заболевания туберкулезом [26] Изучение указанных полиморфизмов может представлять исследовательский интерес, т.к. они изучались в нескольких, но довольно близких этнических группах.

Полиморфизм TLR-1 rs 5743618 (T1805G, I602S) является несинонимичным полиморфизмом, расположенным в трансмембранной области TLR1. Полиморфизм был изучен в различных популяциях (Китая, Ирана, Северной Испании, Бразилии, у африканцев и выходцев из Латинской Америки). Было показано, что указанный полиморфизм приводит к увеличению риска заболеваемости туберкулезом у указанных лиц. [1, 10, 14, 27]. Это связано со снижением поверхностной экспрессии TLR1 в моноцитах и гранулоцитах. Также было выявлено снижение уровня фактора некроза опухоли-а (ФНО-а) и хемокинового лиганда 10 СХС (CXCL10) и повышенная продукция ИЛ-10 *ex vivo*. Также стоит отметить, что в Индийской популяции данный полиморфизм не показал корреляции с заболеваемостью ТБ.

Полиморфизм TLR-2 rs3804099 (T597C) расположен во внеклеточном домене белка, происходит синонимичная замена N199N. Обнаружено, что в выборке взрослого населения Китая связан с риском легочного туберкулеза. В популяции Молдавии этот полиморфизм был связан с риском туберкулеза у женщин, а также в группе с ранним началом заболевания. [20, 24, 29]

Полиморфизм TLR-2 rs3804100 (T1350C) находится во внеклеточном домене TLR-2, происходит синонимичная замена – S450S. Наличие полиморфизма может свидетельствовать о повышенном риске заболевания ТБ, что показано в

различных этнических группах [16] Также минорный аллель СС значительно чаще обнаруживался у лиц с латентной туберкулезной инфекцией по сравнению с группой здоровых доноров в Китайской популяции [22].

Указанные синонимичные SNP в TLR-2 вызывают изменения в экзонах и могут напрямую изменять транскрипцию и сплайсинг мРНК, либо влиять на экспрессию оставшихся экзонов внутри генов, либо влиять на стабильность мРНК через цис-факторы и модулировать структуру мРНК.

Показано, что полиморфизм TLR-2 rs5743708 (G2258A, R753Q) связан с повышенным риском туберкулеза, особенно у азиатов и европейцев. [6] Однако выявлено, что аллель А снижает восприимчивость к ТБ в латиноамериканской этнической группе, обеспечивая при этом защиту [16]. При исследовании указанного аллеля в Казахской популяции ассоциации с заболеваемостью туберкулезом выявлено не было. [23] Замена происходит во внутриклеточном домене и приводит к функциональной недостаточности при гетеродимеризации с TLR-6 с последующим уменьшением возможности активации внутриклеточных сигнальных путей. Также аллель А ассоциирован со значительным снижением активации NF-κB (фактора, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа) в ответ на бактериальные пептиды, а также со сниженной экспрессией IL-6.

Полиморфизм TLR-6 (C745T) rs5743810 связан со снижением риска туберкулеза и обеспечивает защиту во многих этнических группах (североиндийская и китайская популяции) [16, 27]. Однако, в южно-индийском населении этот полиморфизм не был связан ни с восприимчивостью, ни с устойчивостью к туберкулезу [19]. Данный полиморфизм rs5743810 является несинонимическим и приводит к замене пролина на серин в положении 249.

Также стоит отметить, что полиморфизмы генов других Toll-подобных рецепторов, которые связывают другие типы антигенов, тоже вносят свой вклад в восприимчивость к туберкулезу.

Полиморфизм TLR-4 (rs4986790, T896C) представляет собой несинонимичный полиморфизм, приводящий к замене аминокислоты Asp299Gly. Замена аминокислот изменяет внеклеточную часть TLR4 и может вызывать снижение связывания лиганда, низкую чувствительность к липополисахаридам (ЛПС) и снижение транспорта TLR-4 на клеточную поверхность.

Полиморфизм TLR-4 rs4986791 (C1196T) ведет к замене треонина на изолейцин во внеклеточном домене (T399I) и изменяет область взаимодействия с ко-рецептором, влияющего на способность TLR-4 отвечать на ЛПС.

Указанные замены ассоциированы с туберкулезом легких с наиболее тяжелым течением заболевания [19]. Аллель G и генотипы AG/GG TLR-4 rs4986790 были связаны с повышенным риском туберкулеза у населения Южного Синьцзяна [3] Аллель T TLR-4 rs4986791 увеличивает риск заболевания туберкулезом в азиатской подгруппе. [16]. Также для TLR-4 rs4986791 был обнаружен значительный повышенный риск ТБ у африканцев. [28] Однако,

исследование, проведенное в мексиканской популяции (штат Веракруз) демонстрирует противоположный результат. Авторами показано, что минорный аллель (G) rs4986790 в TLR-4 (D299G) минорный аллель (T) и rs4986791 в TLR-4 (T399I) снижали риск активного туберкулеза [12].

В китайской популяции частота минорного аллеля GG SNP rs7873784 в TLR-4 была значительно выше в группе больных легочным туберкулезом, чем в группе здоровых доноров [22]. Также наличие этого аллеля связывали с повышенным риском ТБ в Иранской и Индийской популяциях.[19] Полиморфизм rs7873784 в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) гена TLR-4 усиливает его экспрессию. Предполагается, что участок, содержащий этот SNP, обладает свойствами энхансера (усилителя активности гена).

Полиморфизм TLR-8 (A3679G, Met1Val, rs3764880) исследовали в русской, китайской ханьской, казахстанской, иранской, молдавской популяциях. При этом в российской, казахской популяциях минорный аллель был ассоциирован с защитой от ТБ, в ханьской и иранской популяциях зависимости обнаружено не было, а в Индии и Молдове был связан с повышенной восприимчивостью к легочному туберкулезу. [19, 23, 30].

Повышенный риск ТБ был обнаружен у азиатов (Индонезия и Вьетнам), а также мексиканских индейцев с генотипами TLR-9 rs352139 GA и GG. [9, 17, 28]. В молдавской популяции обнаружен повышенный риск ТБ у женщин с указанным генотипом [20]. При этом полиморфизм rs352139 может быть связан со снижением риска ТБ у индонезийцев [4].

Минорный аллель С в локусе rs187084 (T1486C) TLR-9 может быть связан с предрасположенностью к туберкулезу, что было показано при анализе различных индийских племен [2] При этом в южно-индийском населении и популяции Юго-Восточного Ирана этот полиморфизм не был связан с восприимчивостью или резистентностью к туберкулезу[19] В китайской популяции Хань обнаружено, что минорный аллель TLR-9 SNP rs187084 увеличивает риск заболевания [21]

Полиморфизм гена TIRAP (адапторный белок TLR- трансмембранный домен) (rs8177374, C558T) изучался в различных популяциях. При этом в некоторых популяциях – Российской, Колумбийской, Ганской и Индонезийской - ассоциации с ТБ не выявлено. [11, 15] Однако, в африканских популяциях (Гамбия, Гвинея-Биссау, Республика Гвинея), индийской показан протективный эффект этого полиморфизма. [8]. А в популяциях Вьетнама, Ирана он связан с повышенной восприимчивостью к туберкулезу. [7] Это связывают с тем, что генотип 558ТТ был связан со сниженной выработкой интерлейкина-6 в цельной крови. Замена приводит к выработке белка с лейцином вместо серина в положении 180 (S180L). Этот вариант ослабляет функционирование белка, что приводит к снижению продукции воспалительных цитокинов.

**Выводы:** Эти результаты позволяют предположить, что некоторые из рассмотренных полиморфизмов могут быть использованы для выявления лиц с высоким риском развития туберкулеза. Интересными для дальнейшего изучения

нам представляются TLR-1 rs4833095, TLR-2 rs5743708, TLR-8 rs3764880 в связи с разнообразием результатов, полученных для этого полиморфизма в различных популяциях, а также TLR-1 rs5743618 и TLR-6 rs5743810, т.к. во многих исследованиях они выделяются как провоспалительный и защитный фактор, соответственно. Также стоит отметить, что указанные полиморфизмы оказывают серьезное влияние на функциональные характеристики рецептора в связи с заменой аминокислот в белке.

Точные молекулярные механизмы, лежащие в основе TLR-опосредованных иммунных ответов, еще предстоит изучить в будущих экспериментальных исследованиях, но мы предполагаем, что эти полиморфизмы TLR могут привести к изменениям в экспрессии генов или изменениям в структуре белка TLR, что впоследствии может повлиять на биологическую активность TLR, воздействовать на иммунную систему. реакции на экзогенные патогены и, в конечном счете, изменить индивидуальную восприимчивость к ТБ.

### **Список использованных источников:**

1. Barletta-Naveca R.H., Naveca F.G., de Almeida V.A., Porto J.I.R., da Silva G.A.V., Ogusku M.M., et al. Toll-Like Receptor-1 Single-Nucleotide Polymorphism 1805T/G Is Associated With Predisposition to Multibacillary Tuberculosis. *Front Immunol.* 2018;9:1455. Epub 20180625. doi: 10.3389/fimmu.2018.01455. PubMed PMID: 29988507.
2. Bharti D., Kumar A., Mahla R.S., Kumar S., Ingle H., Shankar H. et al. The role of TLR9 polymorphism in susceptibility to pulmonary tuberculosis. *Immunogenetics.* 2014;66(12):675-81. Epub 20140925. doi: 10.1007/s00251-014-0806-1. PubMed PMID: 25248338.
3. Chen Y., Zeng Y., Wang J., Meng C. Immune and inflammation-related gene polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in Southern Xinjiang population: A case-control analysis. *Int J Immunogenet.* 2022;49(2):70-82. Epub 20211227. doi: 10.1111/iji.12564. PubMed PMID: 34958532.
4. Chen Z., Wang W., Liang J., Wang J., Feng S., Zhang G. Association between toll-like receptors 9 (TLR9) gene polymorphism and risk of pulmonary tuberculosis: meta-analysis. *BMC Pulm Med.* 2015;15:57. Epub 20150508. doi: 10.1186/s12890-015-0049-4. PubMed PMID: 25948535.
5. Dittrich N., Berrocal-Almanza L.C., Thada S., Goyal S., Slevogt H., Sumanlatha G., et al. Toll-like receptor 1 variations influence susceptibility and immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2015;95(3):328-35. Epub 20150228. doi: 10.1016/j.tube.2015.02.045. PubMed PMID: 25857934.
6. Guo X.G., Xia Y. The rs5743708 gene polymorphism in the TLR2 gene contributes to the risk of tuberculosis disease. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11921-8. Epub 20150901. PubMed PMID: 26617949.
7. Hawn T.R., Dunstan S.J., Thwaites G.E., Simmons C.P., Thuong N.T., Lan N.T.N. et al. A polymorphism in Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein is associated with susceptibility to meningeal tuberculosis. *J Infect Dis.* 2006;194(8):1127-34. Epub. 20060912. doi: 10.1086/507907. PubMed PMID: 16991088.
8. Khor C.C., Chapman S.J., Vannberg F.O., Dunne A., Murphy C., Ling E.Y., et al. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat Genet.* 2007;39(4):523-8. Epub 20070225. doi: 10.1038/ng1976. PubMed PMID: 17322885.
9. Kobayashi K., Yuliwulandari R., Yanai H., Naka .I, Lien L.T., Hang N.T., et al. Association of TLR polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females. *Tissue Antigens.*

2012;79(3):190-7. Epub 20111229. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01821.x. PubMed PMID: 22211722.

10. Naderi M., Hashemi M., Mirshekari H., Bahari G., Taheri M. Toll-like Receptor 1 Polymorphisms Increased the Risk of Pulmonary Tuberculosis in an Iranian Population Sample. *Biomed Environ Sci.* 2016;29(11):825-8. doi: 10.3967/bes2016.110. PubMed PMID: 27998389.

11. Nejentsev S., Thye T., Szeszko J.S., Stevens H, Balabanova Y, Chinbuah AM, et al. Analysis of association of the TIRAP (MAL) S180L variant and tuberculosis in three populations. *Nat Genet.* 2008;40(3):261-2; author reply 2-3. doi: 10.1038/ng0308-261. PubMed PMID: 18305471.

12. Ortega E., Hernández-Bazán S., Sánchez-Hernández B., Licon-Limón I., Fuentes-Dominguez J. Single Nucleotide Polymorphisms in. *J Immunol Res.* 2020;2020:2965697. Epub 20200129. doi: 10.1155/2020/2965697. PubMed PMID: 32411792.

13. Peng W., Chen H., Zhao Z., Hu X., Zhou Y., Li Y., et al. polymorphisms are significantly associated with the occurrence, presentation and drug-adverse reactions of tuberculosis in Western Chinese adults. *Oncotarget.* 2018;9(2):1691-704. Epub 20171208. doi: 10.18632/oncotarget.23067. PubMed PMID: 29416723.

14. Qi H, Sun L., Wu X., Jin Y., Xiao J., Wang S, et al. Toll-like receptor 1(TLR1) Gene SNP rs5743618 is associated with increased risk for tuberculosis in Han Chinese children. *Tuberculosis (Edinb).* 2015;95(2):197-203. Epub 20141213. doi: 10.1016/j.tube.2014.12.001. PubMed PMID: 25544311.

15. Sánchez D., Lefebvre C., Rioux J, García L.F., Barrera L.F. Evaluation of Toll-like receptor and adaptor molecule polymorphisms for susceptibility to tuberculosis in a Colombian population. *Int J Immunogenet.* 2012;39(3):216-23. Epub 20120105. doi: 10.1111/j.1744-313X.2011.01077.x. PubMed PMID: 22221660.

16. Schurz H., Daya M., Möller M., Hoal E.G., Salie M. TLR1, 2, 4, 6 and 9 Variants Associated with Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139711. Epub 20151002. doi: 10.1371/journal.pone.0139711. PubMed PMID: 26430737.

17. Torres-García D., Cruz-Lagunas A., García-Sancho Figueroa M.C., Fernández-Plata R., Baez-Saldaña R., Mendoza-Milla C. et al. Variants in toll-like receptor 9 gene influence susceptibility to tuberculosis in a Mexican population. *J Transl Med.* 2013;11:220. Epub 20130921. doi: 10.1186/1479-5876-11-220. PubMed PMID: 24053111.

18. Uciechowski P., Imhoff H., Lange C., Meyer C.G., Browne E.N., Kirsten D.K., et al. Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. *J. Leukoc. Biol.* 2011;90(2):377-88. Epub 20110603. doi: 10.1189/jlb.0409233. PubMed PMID: 21642391.

19. Varshney D., Singh S., Sinha E., Mohanty K.K., Kumar S., Kumar Barik S., et al. Systematic review and meta-analysis of human Toll-like receptors genetic polymorphisms for susceptibility to tuberculosis infection. *Cytokine.* 2022;152:155791. Epub 20220211. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155791. PubMed PMID: 35158257.

20. Varzari A., Deyneko I.V., Vladei I., Grallert H., Schieck M, Tudor E, et al. Genetic variation in TLR pathway and the risk of pulmonary tuberculosis in a Moldavian population. *Infect Genet Evol.* 2019;68:84-90. Epub 20181205. doi: 10.1016/j.meegid.2018.12.005. PubMed PMID: 30529560.

21. Wang M.G., Zhang M.M., Wang Y., Wu SQ, Zhang M., He JQ. Association of TLR8 and TLR9 polymorphisms with tuberculosis in a Chinese Han population: a case-control study. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):561. Epub 20181113. doi: 10.1186/s12879-018-3485-y. PubMed PMID: 30424735.

22. Wu L., Hu Y., Li D., Jiang W., Xu B. Screening toll-like receptor markers to predict latent tuberculosis infection and subsequent tuberculosis disease in a Chinese population. *BMC Med Genet.* 2015;16:19. Epub 20150401. doi: 10.1186/s12881-015-0166-1. PubMed PMID: 25928077.



23. Yerezhpov D., Zhabagin A., Askapuli A., Rakhimova S., Nurkina Z., Abilmazhinova A., et al. Genetic Diversity of IF $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TLR2, and TLR8 Loci in Pulmonary Tuberculosis in Kazakhstan. *Cent Asian J Glob Health*. 2014;3(Suppl):181. Epub 20141212. doi: 10.5195/cajgh.2014.181. PubMed PMID: 29805910.
24. Zhang J., Zhao Z., Zhong H., Wu L., Zhou W., Peng W. et al. Importance of common TLR2 genetic variants on clinical phenotypes and risk in tuberculosis disease in a Western Chinese population. *Infect Genet Evol*. 2018;60:173-80. Epub 20180224. doi: 10.1016/j.meegid.2018.02.031. PubMed PMID: 29486365.
25. Zhang M., Tang X., Wang Y., Wu S., Wang M., Liu Q. et al. Variants of TLR1 associated with tuberculosis susceptibility in the Chinese Tibetan population but not in Han Chinese. *Infect Genet Evol*. 2018;61:53-9. Epub 20180215. doi: 10.1016/j.meegid.2018.02.021. PubMed PMID: 29454979.
26. Zhang M., Wang J., Wang Y., Wu S., Sandford A.J., Luo J. et al. Association of the J. Thorac Dis. 2019;11(2):583-94. doi: 10.21037/jtd.2019.01.74. PubMed PMID: 30963003.
27. Zhang Y., Jiang T., Yang X., Xue Y., Wang C., Liu J. et al. Toll-like receptor -1, -2, and -6 polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a systematic review and metaanalysis. *PLoS One*. 2013;8(5):e63357. Epub 20130514. doi: 10.1371/journal.pone.0063357. PubMed PMID: 23691034.
28. Zhao .L, Liu K., Kong X., Tao Z., Wang Y., Liu Y. Association of polymorphisms in Toll-like receptors 4 and 9 with risk of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Med Sci Monit*. 2015;21:1097-106. Epub 20150418. doi: 10.12659/MSM.893755. PubMed PMID: 25889916.
29. Zhao Y., Bu H., Hong K., Yin H., Zou Y.L., Geng S.J., et al. Genetic polymorphisms of CCL1 rs2072069 G/A and TLR2 rs3804099 T/C in pulmonary or meningeal tuberculosis patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2015;8(10):12608-20. Epub 20151001. PubMed PMID: 26722451.
30. Zhou Y., Zhang M. Associations between genetic polymorphisms of TLRs and susceptibility to tuberculosis: A meta-analysis. *Innate Immun*. 2020;26(2):75-83. Epub 20190718. doi: 10.1177/1753425919862354. PubMed PMID: 31319756.

## **HETEROGENEITY OF GENOME-WIDE RNA EXPRESSION PROFILES IN PRIMATE SKELETAL MUSCLES**

*Larionova A.M., Devyatiyarov R.M., Shagimardanova E.I., Gusev O.A.  
Kazan Federal (Volga Region) University, Kazan, Russian Federation  
larionova.a2000@gmail.com*

Immobilization, bed rest, microgravity conditions, limb immobilization and low mobility lead to loss of muscle mass, changes in the size and shape of muscle fibers, and skeletal muscle atrophy occurs. Muscle atrophy can be associated with a variety of diseases, including diabetes, cancer, heart failure, or muscle-related genetic diseases, or with aging in general. Many studies have been conducted showing phenotypic changes in muscle fibers during unloading, which are primarily associated with a decrease in the level of protein synthesis. In particular, recent work illustrates the role of IGF-1-Akt-mTOR signaling pathways, insulin resistance pathway, focal adhesion kinase signaling pathway. Changes in the expression of genes encoding proteins of the ubiquitin-proteasome system MuRF1/MAFbx under the regulation of transcription factors FOXO1 and FOXO3 is one of the key factors in the initiation of atrophy processes. It has also

been shown that an excess of reactive oxygen species and calcium ions play a significant role in the regulation of muscle protein synthesis during unloading. At the same time, there is still a big gap in understanding the peculiarities of the organization of the regulatory elements of the genome in different types of muscles. To create the most complete picture of the molecular mechanisms of regulation, we obtained samples from 29 muscle types of the Crab-eating macaque. In each sample, the level of expression at the level of individual regulatory elements of the genome was determined using the CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) method. Based on the expression profile of 17,502 CAGE clusters, we found significant differences between extraocular muscles and other skeletal muscles. Our study indicates the presence of specific regulatory pathways in certain types of muscles, which opens up prospects for the development of new gene therapy methods in the future.

This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (No. 075-15-2021-601).

## **ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ РНК В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ПРИМАТОВ**

*Ларионова А.М., Девятияров Р.М., Шагимарданова Е.И., Гусев О.А.*

*Казанский Федеральный (Приволжский) Университет, г. Казань, РФ*

*larionova.a2000@gmail.com*

Иммобилизация, постельный режим, условия микрогравитации, обездвиживание конечностей и низкая подвижность приводят к потере мышечной массы, изменению размера и формы мышечных волокон, наступает атрофия скелетных мышц. Мышечная атрофия может быть связана как с различными заболеваниями, включая диабет, рак, сердечную недостаточность или генетические заболевания, связанные с мышцами, так и со старением организма в целом. Было проведено множество исследований, показывающих фенотипические изменения мышечных волокон при разгрузке, что связывают в первую очередь с понижением уровня белкового синтеза. В частности, последние работы указывают на роль сигнальных путей IGF-1-Akt-mTOR, инсулинорезистентности (insulin resistance pathway), сигнального пути киназы очаговой адгезии (focal adhesion kinase). Изменение экспрессии генов, кодирующих белки убиквитин-протеасомной системы MuRF1/MAFbx под регуляцией транскрипционных факторов FOXO1 и FOXO3, является одним из ключевых факторов в инициации процессов атрофии. Было также показано, что избыток активных форм кислорода и ионов кальция играют значительную роль в регуляции синтеза белков в мышцах при разгрузке. При этом все еще остается большой пробел в понимании особенностей организации регуляторных элементов генома в разных типах мышц. Для создания наиболее полной картины молекулярных механизмов регуляции

нами были получены образцы из 29 типов мышц макаки крабоеда (Crab-eating macaque). В каждом образце уровень экспрессии на уровне отдельных регуляторных элементов генома определен с помощью метода CAGE (Cap Analysis of Gene Expression). По профилю экспрессии 17 502 кластеров CAGE мы обнаружили значимые отличия глазных (Extraocular) мышц в сравнении с остальными скелетными мышцами. Наше исследование указывает на наличие специфичных путей регуляции в отдельных типах мышц, что открывает перспективы в освоении новых генотерапевтических методов в будущем.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2021-601).*

## **PATHOGENETIC AND CLINICAL RELATIONSHIP BETWEEN IL-1B AND IL-8 IN MELANOMA**

*Malkova A. \*, Orlova R. \*, Zhukova N. \*, Kaledina E. \*, Demchenkova A. \*,  
Naimushina P. \*, Sharoyko V. \*, \*\**

*\* Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

*\*\* I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg,  
Russia*

### **Introduction**

Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have changed the prognosis of many patients with metastatic melanoma, but the efficacy of the treatment is not achieved for every patient, and approved markers predictors are still not available in clinical practice [1]. One of the reasons for the low therapy efficacy may be the local immunosuppression in the tumor microenvironment (TME), due to the action of various factors, including high production IL-1 $\beta$  by tumor cancer cells [2].

Immunosuppressive effect of IL-1 $\beta$  was shown in several studies *in vivo* using IL-1 $\beta$  inhibitors [3, 4]. An increase in the efficacy of checkpoint inhibitors was observed in mouse models of breast cancer due to the combination with "Anakinra", an IL-1 $\beta$  inhibitor [3]. The use of the drug "Anakinra" led to a decrease in immunosuppression mediated mainly by macrophages, and thereby to an increase in antitumor immunity mediated by increased function of dendritic cells and activated CD8-cytotoxic lymphocytes. It is important to note that the treatment with anti-PD-1 drugs reduced the growth of tumor cells, while the combination of anti-IL-1 $\beta$  and anti-PD-1 contributed to the destruction of tumor cells [3].

Similar results were obtained in mouse models of renal cell carcinoma using anti-PD-1 drugs. Anti-IL-1 $\beta$  contributed to the reduction of the infiltration of myeloid suppressor cells and macrophages associated with the tumor. Combined application of anti-IL-1 $\beta$  with anti-PD-1 increased the antitumor activity of the therapy, which was associated with a decrease in immunosuppressive cells and an increase in M1-type macrophages [4].

Considering the pathogenetic role of IL-1 $\beta$  in immunosuppression and association with low efficacy of immunotherapy, it can be assumed that elevated IL-1 $\beta$  levels in the blood serum can serve as a biomarker of progression or a predictor of low ICI efficacy. However, clinical studies of diagnostic significance of IL-1 $\beta$  in cancer patients showed conflicting results. According to various studies in patients with melanoma, the spectrum of interleukins (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-13) was elevated relative to healthy individuals [5], and a high concentration of IL-1 $\beta$  was associated with poor prognosis [6,7]. In patients with other tumor localizations increased cytokine expression in the tissue was more often observed compared to an increase in the level of IL-6 and IL-8 in the blood serum, for example, in colorectal [8-12,13] and gastric [14-17] carcinomas.

At the same time, overexpression of IL-1  $\beta$  is observed in the tissues of most tumors, while an increase of IL-8 is more often in the blood. However, there are no data on the diagnostic significance of IL-1 $\beta$  and IL-8 in the treatment of ICI melanoma and the effects of IL-1 $\beta$  on melanoma cells.

It is known that IL-1 $\beta$  activates secretion of IL-8 in various cells, such as endothelial cells, epithelial cells and smooth muscle cells, macrophages, by stimulating p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK- activated protein kinase 2 [18-22], which also was reported in human gastric cancer cells TMK-1 [17].

This study is aimed at assessing the diagnostic significance of IL-1 $\beta$  and IL-8 detection in patients with metastatic melanoma and the effect of IL-1 $\beta$  on the production of IL-8 by melanoma cells *in vitro* which could show the possibility of using IL-8 as a biomarker of high IL-1 $\beta$  expression in the tumor microenvironment (TMO), local immunosuppression and low efficacy of therapy.

## **Materials and methods**

Human melanoma cell line (SK-MEL) and IL-1 $\beta$  solution (0.5 mM) were used for experiments. Cells were cultured in vials for adhesive cell cultures with ventilated lids, in CO<sub>2</sub>- incubator at a humidity of 95 %, containing 21 % O<sub>2</sub> and 5 % CO<sub>2</sub>, at 37°C in DMEM culture medium (Paneco, Russia) with the addition of 10 mM HEPES-Na (Paneco, Russia), 2 mM glutamine (Paneco, Russia), 10 % bovine fetal serum (FBS; (HyClone™, USA) and 1 % penicillin-streptomycin (10 IU ml<sup>-1</sup>-100 mcg ml<sup>-1</sup>; Paneco, Russia). SK-MEL was incubated with/without IL-1 $\beta$  with an increased concentration (1-1-2-4 ng / ml) for 9 days, and cell media was collected every 2 days. The level of IL-1 $\beta$  and IL-8 in culture media was determined by ELISA.

A clinical study included 28 patients with metastatic (mts) melanoma who were treated with ICIs. IL-1 $\beta$  and IL-8 levels in the blood serum before and after 2-3 months from the start of treatment was determined by ELISA.

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 using Fischer and Mann-Whitney test methods, ROC, Wilcoxon for sign rank criteria, Spearman's statistical analysis, and ANOVA. The project was supported by RFBR grant 20-015-00498.

## Results

External exposure to IL-1 $\beta$  (1-1-2-4 ng / ml) for 9 days contributed to an increase in the level of IL-1 $\beta$  (p=0.029) and IL-8 (p=0.029). The concentration of added IL-1 $\beta$  correlated non-linearly with the level of IL-8 (R=0.949) and linearly with the level of IL-1b (R=0.949) in the culture medium.

IL-1 $\beta$  was detected in 35.5% (11/31) of patients before therapy, with elevated levels recorded in only one patient. IL-8 was detected in all patients; elevated levels before therapy were observed in 64.5% (20/31) of cases, and after 2-3 months - in 35.5% (11/31). A statistically significant decrease in IL-1 $\beta$  (p=0.0498) and IL-8 (p=0.0002) concentrations was observed during ICI therapy. In the presence of IL-1 $\beta$  the IL-8 level was statistically higher (139.6 $\pm$ 65.26 pg/ml), p=0.024, also the positive correlation between IL-1 $\beta$  and IL-8 concentrations was found (R=0.6469), p=0.035). According to ROC-analysis (Area=0.76) with an increase in the IL-8 concentration of more than 42.31 pg/ml with a diagnostic sensitivity of 66.67% and a specificity of 90.00%, it can be assumed that IL-1 $\beta$  can be detected in the patient's blood serum (p = 0,025).

Analysis of the relationship between the interleukin concentration and the efficacy of the therapy did not reveal statistically significant results. Although the IL-8 level in the tumor regression group was significantly lower (41.6 $\pm$ 19.1 pg/ml) compared to the progression group (120.6 $\pm$ 67.6 pg/ml).

## Conclusions

The study showed a concentration-dependent increase in production IL-1 $\beta$  and IL-8 human melanoma cells under external IL-1 $\beta$  influence. The obtained data suggest that high expression of IL-1 $\beta$  promotes the production of IL-8 in TMO, which in turn might be detected in peripheral blood and can serve as a biomarker of high IL-1 $\beta$  expression in TME and local immunosuppression.

According to the clinical study, if the IL-8 concentration exceeds 42.31 pg/ml in patients with mts melanoma, the presence of IL-1 $\beta$  can be expected in the blood serum. The IL-8 level in the tumor regression group was significantly lower (41.6 $\pm$ 19.1 pg/ml) compared to the progression group (120.6 $\pm$ 67.6 pg/ml), but there was no statistically significant difference. For example, in a study by Schalper et al. [18] elevated serum IL-8 levels prior to ICI therapy were associated with lower overall survival in patients (n = 1,344) with advanced cancer treated with nivolumab and/or ipilimumab, everolimus, or docetaxel in a phase 3 clinical trial. The result we obtained may be related to a small sample size and a short observation period.

## ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ IL-1В И IL-8 ПРИ МЕЛАНОМЕ

*Малкова А. \*, Орлова Р. \*, Жукова Н. \*, Каледина Е. \*,  
Демченкова А. \*, Наймушина П. \*, Шаройко В. \*\*\**

*\*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия*

*\*\*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

**Ключевые слова:** интерлейкин-1 $\beta$ , интерлейкин-8, меланома, ингибиторы  
контрольных точек, эффективность, диагностика

*anya.malkova.95@mail.ru*

### **Введение**

Ингибиторы иммунных контрольных точек (ИКТ) изменили прогноз многим пациентам с метастатической меланомой, однако эффективность лечения достигается не у каждого пациента, а одобренных маркеров предиктивности до сих пор нет в клинической практике [1]. Одной из причин низкой эффективности терапии может быть местная иммуносупрессия в микроокружении опухоли (МОО), обусловленная действием различных факторов, в том числе высокой продукцией IL-1 $\beta$ [2].

Иммуносупрессивный эффект IL-1 $\beta$  был показан в нескольких исследованиях *in vivo* с применением ингибиторов IL-1 $\beta$ [3,4]. Повышение эффективности ингибиторов контрольных точек наблюдалось на мышинных моделях рака молочной железы за счет комбинации с препаратом «Анакинра», ингибитором IL-1 $\beta$ [3]. Применение препарата «Анакинра» приводило к снижению иммуносупрессии, опосредованной преимущественно макрофагами, и тем самым к повышению противоопухолевого иммунитета, опосредованного усилением функции дендритных клеток и активированными CD8-цитотоксическими лимфоцитами. Важно отметить, что лечение анти-PD-1 препаратами уменьшало рост опухолевых клеток, в то время как комбинация анти-IL-1 $\beta$  и анти-PD-1 способствовала деструкции опухолевых клеток [3].

Аналогичные результаты были получены на мышинных моделях почечно-клеточной карциномы с применением анти-PD-1-препаратов. Анти-IL-1 $\beta$  способствовал уменьшению инфильтрации миелоидных клеток супрессоров и макрофагов, ассоциированных с опухолью. Комбинированное применение анти-IL-1 $\beta$  с анти-PD-1 увеличило противоопухолевою активность терапии, что было связано со снижением иммуносупрессивных клеток и увеличением макрофагов M1-типа [4].

Учитывая патогенетическую роль IL-1 $\beta$  в иммуносупрессии и ассоциацию с низкой эффективностью иммунотерапии, можно предположить, что повышенный уровень IL-1 $\beta$  в сыворотке крови может служить биомаркером прогрессирования или предиктором низкой эффективности ИКТ. Однако клинические исследования

диагностической значимости IL-1 $\beta$  у онкологических пациентов показали противоречивые результаты. Согласно различным исследованиям у пациентов с меланомой спектр интерлейкинов (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-13) оказался повышен относительно здоровых лиц [5], а высокая концентрация IL-1 $\beta$  была ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [6,7]. При других локализациях опухоли чаще наблюдали повышенную экспрессию цитокинов в ткани по сравнению с повышением уровня IL-6 и IL-8 в сыворотке крови, например, при колоректальной [8–12,13] и желудочной [14–17] карциномах.

При этом в тканях большинства опухолей наблюдается гиперэкспрессия IL-1 $\beta$  и IL-8, тогда как в крови чаще наблюдается повышение IL-8. Однако отсутствуют данные о диагностической значимости IL-1 $\beta$  и IL-8 при лечении меланомы ИКТ и влиянии IL-1 $\beta$  на клетки меланомы.

Известно, что IL-1 $\beta$  активирует продукцию IL-8 в различных клетках, таких как эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки и гладкомышечные клетки, макрофаги, путем стимуляции р38-митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и МАРК-активируемой протеинкиназы 2 [18–22], что также было показано в клетках рака желудка человека ТМК-1 [17].

Данное исследование направлено на оценку диагностической значимости определения IL-1 $\beta$  и IL-8 у пациентов с метастатической меланомой и влияние IL-1 $\beta$  на продукцию IL-8 клетками меланомы *in vitro*, что могло бы показать возможность использования IL-8 как биомаркера высокой экспрессии IL-1 $\beta$  в микроокружении опухоли (ТМО), местной иммуносупрессии и низкой эффективности терапии.

### **Материалы и методы**

Для экспериментов использовали клеточную линию меланомы человека (SK-MEL), раствор IL-1 $\beta$  (0,5 мМ). Клетки культивировали во флаконах для адгезивных культур клеток с вентилируемыми крышками, в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при влажности 95 %, содержащей 21 % O<sub>2</sub> и 5 % CO<sub>2</sub>, при 37°C в культуральной среде DMEM («Панэко», Россия) с добавлением 10 мМ HEPES- Na («Панэко», Россия), 2 мМ глутамина («Панэко», Россия), 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; («HyClone™», США) и 1 % пенициллин-стрептомицина (10 МЕ мл-1–100 мкг мл-1; Paneco, Россия). SK-MEL инкубировали с/без IL-1 $\beta$  с повышением концентрации (1-1-2-4 нг/мл) в течение 9 дней, каждые 2 дня собирали клеточную среду. Уровень IL-1 $\beta$  и IL-8 в культуральных средах определяли методом ИФА.

В клиническом исследовании приняли участие 28 пациентов (пациентов) с метастатической (мтс) меланомой, принимавших ИКТ. Уровень IL-1 $\beta$  и IL-8 в сыворотке крови до и спустя 2–3 месяца от начала лечения определяли методом ИФА.

Статистический анализ проводили с помощью GraphPad Prism 6 с использованием методов критерия Фишера, Манна-Уитни, ROC, Уилкоксона для

знаковых ранговых критериев, статистического анализа Спирмена и ANOVA. Проект поддержан грантом РФФИ 20-015-00498.

### **Результаты**

Внешнее воздействие IL-1 $\beta$  (1-1-2-4 нг/мл) в течение 9 суток способствовало повышению уровня IL-1 $\beta$  ( $p=0,029$ ) и IL-8 ( $p=0,029$ ). Концентрация добавленного IL-1 $\beta$  коррелировала нелинейно с уровнем IL-8 ( $R=0,949$ ) и линейно с уровнем IL-1 $\beta$  ( $R=0,949$ ) в культуральной среде.

IL-1 $\beta$  был обнаружен у 35,5% (11/31) пациентов до терапии, при этом повышенный уровень был зафиксирован только у одного пациента. IL-8 обнаружен у всех больных, повышенный уровень до терапии наблюдался в 64,5% (20/31) случаев, через 2-3 месяца - в 35,5% (11/31). На фоне терапии ИКТ наблюдалось статистически значимое снижение концентрации IL-1 $\beta$  ( $p=0,0498$ ) и IL-8 ( $p=0,0002$ ). В присутствии IL-1 $\beta$  уровень IL-8 был статистически выше ( $139,6\pm 65,26$  пг/мл),  $p=0,024$ , при этом между концентрациями IL-1 $\beta$  и IL-8 выявлена средняя положительная корреляция ( $R=0,6469$ ),  $p=0,035$ ). По данным ROC-анализа ( $Area=0,76$ ) при повышении концентрации IL-8 более 42,31 пг/мл с диагностической чувствительностью 66,67% и специфичностью 90,00% можно предположить, что IL-1 $\beta$  будет обнаружен в сыворотке крови у пациента ( $p = 0,025$ ).

Анализ взаимосвязи концентрации интерлейкинов с эффективностью терапии не выявил статистически значимых результатов. Хотя уровень IL-8 в группе регрессии опухоли был значительно ниже ( $41,6\pm 19,1$  пг/мл) по сравнению с группой прогрессирования ( $120,6\pm 67,6$  пг/мл).

### **Выводы**

Исследование показало зависящее от концентрации увеличение продукции IL-1 $\beta$  и IL-8 клетками меланомы человека при внешнем воздействии IL-1 $\beta$ . Полученные данные позволяют предположить, что высокая экспрессия IL-1 $\beta$  способствует продукции IL-8 в МОО, который в свою очередь детектируется в периферической крови и может служить биомаркером высокой экспрессии IL-1 $\beta$  в ММО и местной иммуносупрессии.

По данным клинического исследования, при концентрации IL-8 более 42,31 пг/мл у больных мтс меланомой можно ожидать наличие IL-1 $\beta$  в сыворотке крови. Уровень IL-8 в группе регрессии опухоли оказался значительно ниже ( $41,6\pm 19,1$  пг/мл) по сравнению с группой прогрессирования ( $120,6\pm 67,6$  пг/мл), но статистически значимого различия обнаружено не было. Так, в исследовании Schalper et al. [18] повышенный уровень IL-8 до терапии ИКТ в сыворотке оказался ассоциирован с более низкой общей выживаемостью пациентов ( $n = 1344$ ) с распространенным раком, получавших ниволумаб и/или ипилимумаб, эверолимус или доцетаксел в фазе 3 клинических испытаний. Полученный нами результат может быть связан с малым размером выборки и коротким периодом наблюдения.



### ***Список использованной литературы:***

- [1] Robert C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy, *Nat. Commun.*, Vol. 11, (2020) , pp. 1–3. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17670-y>.
- [2] Apte R.N., Krelm Y., Song X., Dotan S., Recih E., Elkabets M., Carmi Y., Dvorkin T., White R.M., Gayvoronsky L., Segal S., Voronov E. Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions, *Eur. J. Cancer.*, Vol. 42, (2006) , pp. 751–759. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.010>.
- [3] Kaplanov I., Carmi Y., Kornetsky R., Shemesh A., Shurin G. V., Shurin M.R., Dinarello C.A., Voronov E., Apte R.N. Blocking IL-1 $\beta$  reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 116, (2019) , pp. 1361–1369. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812266115>.
- [4] Aggen D.H., Ager C.R., Obradovic A.Z., Chowdhury N., Ghasemzadeh A., Mao W., Chaimowitz M.G., Lopez-Bujanda Z.A., Spina C.S., Hawley J.E., Dallos M.C., Zhang C., Wang V., Li H., Guo X. V., Drake C.G. Blocking IL1 beta promotes tumor regression and remodeling of the myeloid compartment in a renal cell carcinoma model: multidimensional analyses, *Clin. Cancer Res.*, Vol. 27, (2021) , pp. 608–621. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-1610>.
- [5] Z.R. Yurkovetsky, J.M. Kirkwood H.D.E. et al., Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon- $\alpha$ 2b, *Clin. Cancer Res.*, Vol. 13, (2007) , pp. 2422–2428.
- [6] Singh S., Singh A.P., Sharma B., Owen L.B., Singh R.K. CXCL8 and its cognate receptors in melanoma progression and metastasis, *Future Oncol.*, Vol. 6, (2010) , pp. 111. <https://doi.org/10.2217/FON.09.128>.
- [7] Jiang H., Gebhardt C., Umansky L., Beckhove P., Schulze T.J., Utikal J., Umansky V. Elevated chronic inflammatory factors and myeloid-derived suppressor cells indicate poor prognosis in advanced melanoma patients, *Int. J. Cancer.*, Vol. 136, (2015) , pp. 2352–2360. <https://doi.org/10.1002/ijc.29297>.
- [8] Waldner M.J., Foersch S., Neurath M.F. Interleukin-6 - A key regulator of colorectal cancer development, *Int. J. Biol. Sci.*, Vol. 8, (2012) , pp. 1248–1253. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4614>.
- [9] Nastase A., Pâslaru L., Niculescu A.M., Ionescu M., Dumitraæcu T., Herlea V., Dima S., Gheorghe C., Lazar V., Popescu I. Prognostic and predictive potential molecular biomarkers in colon cancer, *Chir.*, Vol. 108, (2011) , pp. 177–185. <https://europepmc.org/article/med/21696062> (accessed October 12, 2021).
- [10] Chen Z.Y., He W.Z., Peng L.X., Jia W.H., Guo R.P., Xia L.P., Qian C.N. A prognostic classifier consisting of 17 circulating cytokines is a novel predictor of overall survival for metastatic colorectal cancer patients, *Int. J. Cancer.*, Vol. 136, (2015) , pp. 584–592. <https://doi.org/10.1002/ijc.29017>.
- [11] Kantola T., Klintrup K., Väyrynen J.P., Vornanen J., Bloigu R., Karhu T., Herzig K.H., Näpänkangas J., Mäkelä J., Karttunen T.J., Tuomisto A., Mäkinen M.J. Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma, *Br. J. Cancer.*, Vol. 107, (2012) , pp. 1729–1736. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.456>.
- [12] Ueda T., Shimada E., Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: Possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis, *J. Gastroenterol.*, Vol. 29, (1994) , pp. 423–429. <https://doi.org/10.1007/BF02361238>.
- [13] Voronov E., Apte R.N. IL-1 in Colon Inflammation, Colon Carcinogenesis and Invasiveness of Colon Cancer, *Cancer Microenviron.*, Vol. 8, (2015) , pp. 187–200. <https://doi.org/10.1007/s12307-015-0177-7>.
- [14] Konturek S.J., Starzynska T., Konturek P.C., Karczewska E., Marlicz K., Lawniczak M., Jaroszewicz-Heigelman H., Bielanski W., Hartwich A., Ziemiak A., Hahn E.G. Helicobacter pylori and CagA status, serum gastrin, interleukin-8 and gastric acid secretion in gastric cancer, *Scand. J. Gastroenterol.*, Vol. 37, (2002) , pp. 891–898. <https://doi.org/10.1080/003655202760230838>.
- [15] Wong H.L., Rabkin C.S., Shu X.O., Pfeiffer R.M., Cai Q., Ji B.T., Yang G., Li H.L., Rothman

N., Gao Y.T., Zheng W., Chow W.H. Systemic cytokine levels and subsequent risk of gastric cancer in Chinese Women, *Cancer Sci.*, Vol. 102, (2011) , pp. 1911–1915. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02033.x>.

[16]Tannahill G.M., Curtis A.M., Adamik J., Palsson-Mcdermott E.M., McGettrick A.F., Goel G., Frezza C., Bernard N.J., Kelly B., Foley N.H., Zheng L., Gardet A., Tong Z., Jany S.S., Corr S.C., Haneklaus M., Caffrey B.E., Pierce K., Walmsley S., Beasley F.C., Cummins E., Nizet V., Whyte M., Taylor C.T., Lin H., Masters S.L., Gottlieb E., Kelly V.P., Clish C., Auron P.E., Xavier R.J., O’Neill L.A.J. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ , *Nature.*, (2013). <https://doi.org/10.1038/nature11986>.

[17]Hwang Y.S., Jeong M., Park J.S., Kim M.H., Lee D.B., Shin B.A., Mukaida N., Ellis L.M., Kim H.R., Ahn B.W., Jung Y.D. Interleukin-1 $\beta$  stimulates IL-8 expression through MAP kinase and ROS signaling in human gastric carcinoma cells, *Oncogene.*, Vol. 23, (2004) , pp. 6603–6611. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207867>.

[18]Schalper K.A., Carleton M., Zhou M., Chen T., Feng Y., Huang S.P., Walsh A.M., Baxi V., Pandya D., Baradet T., Locke D., Wu Q., Reilly T.P., Phillips P., Nagineeni V., Gianino N., Gu J., Zhao H., Perez-Gracia J.L., Sanmamed M.F., Melero I. Elevated serum interleukin-8 is associated with enhanced intratumor neutrophils and reduced clinical benefit of immune-checkpoint inhibitors, *Nat. Med.*, Vol. 26, (2020) , pp. 688–692. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0856-x>.

## **ОЦЕНКА СИНЕРГИЗМА НОВОГО БАКТЕРИОФАГА Ka1 ИЗ СЕМЕЙСТВА PODOVIRIDAE С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ В ОТНОШЕНИИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA В СОСТАВЕ БИОПЛЁНОК**

*Палагина В.Г.<sup>1\*</sup>, Гатина А. Э.<sup>1</sup>, Каюмов А. Р.<sup>1</sup>,  
Семёнова В. Н.<sup>2</sup> Горшкова А. С.<sup>2</sup>, Дрюккер В.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) Федеральный Университет,  
ул. Кремлёвская 18, г. Казань, 420008, РФ

<sup>2</sup> Лимнологический Институт Сибирского Отделения Российской Академии Наук, ул.  
Улан-Баторская 3, г. Иркутск, 664033, РФ

\* [palagina.vika@bk.ru](mailto:palagina.vika@bk.ru)

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, фаготерапия, *P.aeruginosa*.

Несмотря на огромный успех антибиотиков, появление полирезистентных бактерий вызывает всеобщее беспокойство. В настоящее время некоторые штаммы бактерий устойчивы практически ко всем имеющимся антибиотикам. В ближайшем будущем это может привести к серьезным осложнениям из-за появления штаммов, не поддающихся лечению никакими антибиотиками.

Основным преимуществом фагов является их специфичность к бактериям-мишеням, что значительно снижает нанесение вреда нормальной флоре хозяина. Бактерии, на которые нужно нацелиться, должны быть сначала идентифицированы, иначе следует использовать коктейль из фагов.

Фаги показывают многообещающие результаты против биопленок [J.Soothill et al., 2014]. Фаги имеют потенциал в лечении устойчивых к антибиотикам инфекций *P. aeruginosa*. [Chegini, Khoshbayanetal., 2020]

*P. aeruginosa* - вид строго аэробных грамотрицательных палочек, широко встречающийся в окружающей среде, является условно-патогенным микроорганизмом человека и животных. Он вызывает ушные и глазные инфекции у людей и домашних животных. У людей с тяжелой степенью ожогов может вызвать сложно протекающие, иногда смертельные инфекции, а также деструкцию пересаженных кожных трансплантатов. Он поражает язвы на теле, хирургические раны и протезы, а также мочевыводящие пути. Возможна инфекция дыхательных путей, особенно у пациентов, находящихся на ИВЛ, а также у пациентов с муковисцидозом, у которых часто встречаются мукоидные варианты *P. aeruginosa*; они производят много слизистого вещества - альгината. *P. aeruginosa* устойчив ко многим обычно используемым антибиотикам первого и второго поколения, включая пенициллин, цефалоспорины, тетрациклин, хлорамфеникол и ванкомицин. [Parkins, Somayaji et al., 2018]

Антибиотикам, действующим против штамма в лабораториях, часто не удается устранить штамм из дыхательных путей пациента. Одна из причин этого - развитие колоний в дыхательных путях, которые напоминают биопленки, обладающие меньшей чувствительностью к антибиотикам [Alkawash et al., 2006], чем свободно живущие бактерии. Следовательно, необходимы другие методы лечения.

Целью данной работы было оценить возможность сочетания фаготерапии с антибактериальными препаратами против клеток *Pseudomonas aeruginosa*.

Из озера Байкал был выделен бактериофаг Ka1, способный лизировать клетки *P. aeruginosa*. Проведено полногеномное секвенирование генома бактериофага на платформе Illumina-SOLEXA (MiSeq). Геном Ka1 содержит 46092 нуклеотидов и имеет максимальную идентичность с геномом бактериофага *Pseudomonas phagePSA37* (95,14%) при покрытии 79%, относящимся к семейству *Podoviridae*. Электронная микроскопия Ka1 подтвердила соответствие структуры подовирусам.

В ходе исследований выявлен синергетический эффект бактериофага Ka1 с четырьмя различными антибактериальными препаратами: амикацином, гентамицином, колистином, меропенемом. В сочетании с бактериофагом минимальная подавляющая концентрация этих препаратов снижалась в несколько раз. Так, МПК амикацина на различных тест-штаммах снижалась в 4-16 раз, гентамицина - в 4 раза, колистина - в 16-32 раза, меропенема - в 4 раза.

Бактериофаг Ka1 является потенциальным агентом для внесения его в состав коктейлей различных фагов для лечения инфекций.

### **Список использованных источников**

1. Soothill J. Use of bacteriophages in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. [Text] // *PubMed*. - 2014. - P. 909-915.
2. Hamdi S. Characterization of Five Podoviridae Phages Infecting *Citrobacter freundii* [Text] / S. Hamdi, G. M. Rousseau, S. J. Labrie // *fmmcbi*. - 2016. - P. 4-6.
3. Tacconelli E. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. [Text] / E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D.L. Monnetet // *Lancet Infect Dis*. - 2018. - V.27. - P. 318-320.

4. Horcajada J. *Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections.* [Text] / J.P. Horcajada, M. Montero, A. Oliver, L. Sorlí, S. Luque, S. Zorrilla, // *Clin Microbiol Rev.* – 2019. - V.4. – P. 32-35.

5. Treepong P. *Global emergence of the widespread Pseudomonas aeruginosa ST235 clone.* [Text] // *Clin Microbiol Infect.* – 2018. – V.66. - P. 258.

## **DIFFERENTIAL EFFECT OF SMALL AND LARGE IMMUNE COMPLEXES CONTAINING HSV-1 AND 2 ANTIGENS ON NEUTROPHILS AND MONOCYTES**

<sup>1</sup>Poghosyan David, <sup>1</sup>Margaryan Sona, <sup>2</sup>Larionova Regina,

<sup>2</sup>Arleevskaya Marina, <sup>1</sup>Manukyan Gayane

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular and Cellular Immunology,

*Institute of Molecular Biology NAS RA, Yerevan, Armenia*

<sup>2</sup>Central Research Laboratory, State Medical Academy, Kazan, Russia

The early stages of rheumatoid arthritis (RA) were shown to be associated with reactivation of different viral infections including herpes simplex virus (HSV) type 1 and 2. An increased titers of the human herpes family plasma antibodies, a higher load of HSV DNA in blood and synovial fluids were found in patients with RA. Despite this, the potential mechanisms of HSV association with RA are still unknown. We aimed to study an impact of small (soluble) and large (insoluble) immune complexes (ICs) containing HSV-1 or HSV-2 antigens (IC/HSV+) isolated from RA patients on circulating neutrophils/monocytes and compare the studied effects with those stimulated with ICs not containing HSV antigens (IC/HSV-) and isolated from healthy donors. Our results revealed a significant effect of small IC/HSV+ on neutrophils, while monocytes remained unresponsive to the IC/HSV+ of both sizes. Particularly, an increased production of reactive oxygen species (ROS) by the neutrophils exposed to small IC/HSV+ in comparison with the cells exposed to IC/HSV- was detected ( $p < 0.05$ ). In parallel, small IC/HSV+ caused an increased phagocytic activity ( $p < 0.05$ ) of neutrophils and the tendency to their higher degranulation ability ( $p = 0.06$ ) as measured by the up-regulated expression of CD66b, a marker of specific granules. Interestingly, the increased functional activity of neutrophils exposed to the small IC/HSV+ was mediated through the high-affinity IgG receptor FcRI (CD64). Remarkably, small IC/HSV+ up-regulated the expression of TLR2 not TLR9 on neutrophils ( $p < 0.05$ ) in a time-dependent manner. Phenotypically, neutrophils were not significantly affected by the exposure of IC/HSV+. Taken together, we have described significant changes in functional behavior of neutrophils as a consequence of the small/soluble ICs containing HSV antigens. Presumably, IC/HSV-induced activation of neutrophils may contribute to the initiation of tissue damage at the sites of chronic inflammation and anticipate stimulation of the adaptive immune response, the statement which should be further studied.

This study was supported by research funding from the “Russian Science Foundation” (No. 20-515-05006) and by a State Committee Science MES RA (No. SCS 20RF-112).

## **ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ НОВОГО БАКТЕРИОФАГА Ka2 ИЗ СЕМЕЙСТВА MYOVIRIDAE В ОТНОШЕНИИ PSEUDOMONASAERUGINOSAB СОСТАВЕ БИОПЛЁНОК**

Семёнова В. Н.<sup>1</sup>, Гатина А. Э.<sup>1</sup>, Палагина В. Г.<sup>1</sup>,  
Горшкова А. С.<sup>2</sup>, Дрюккер В.В.<sup>2</sup> Каюмов А. Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) Федеральный Университет,  
ул. Кремлёвская 18, г. Казань, 420008, РФ

<sup>2</sup> Лимнологический Институт Сибирского Отделения Российской Академии Наук,  
ул. Улан-Баторская 3, г. Иркутск, 664033, РФ  
v\_nikolayevna@inbox.ru

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, фаготерапия, *P.aeruginosa*.

*P. aeruginosa* является опасным патогеном человека, вызывающий различные инфекции, особенно у лиц с ослабленным иммунитетом [Deerpetal., 2011]. Она вызывает внутрибольничную пневмонию, в том числе связанную с искусственной вентиляцией легких, характеризующаяся высокой распространенностью и летальностью [Maugiceetal., 2018]. Способность *P. aeruginosa* к образованию биопленок во многих средах делает лечение антибиотиками неэффективным и, следовательно, способствует развитию хронических инфекционных заболеваний, особенно опасны хронические инфекции легких у людей с муковисцидозом [Hoiby et al., 2010; Vjarnsholt, 2013].

В настоящее время поиск новых эффективных антибактериальных препаратов, а также их альтернатив (традиционным антибиотикам), является актуальной задачей современной фармацевтики. Одна из таких альтернатив является фаготерапия в сочетании с антибактериальными препаратами [Головин, 2016].

Целью данной работы было оценить возможность сочетания фаготерапии с антибактериальными препаратами против клеток *Pseudomonas aeruginosa*.

Из озера Байкал были выделены бактериофаг Ka2, способный лизировать клетки *P. aeruginosa*. Проведено полногеномное секвенирование генома бактериофага на платформе Illumina-SOLEXA (MiSeq). Геном Ka2 содержит 66310 п.о. и имеет максимальную идентичность с геномом бактериофага *Pseudomonas* phage S50 (97 % идентичности при покрытии 99 %), относящимся к семейству *Myoviridae*. Электронная микроскопия Ka2 подтвердила соответствие структуры миовирусам.

В ходе исследований выявлен синергетический эффект бактериофага Ка2 с антибактериальными препаратами: амикацином, гентамицином, колистином, меропенемом. В сочетании с бактериофагом минимальная подавляющая концентрация этих препаратов снижалась в несколько раз. Так, МПК амикацина на различных тест-штаммах снижалась в 4-8 раз, гентамицина - в 8 раз, колистина - в 4-8 раз, меропенема - в 4 раза.

Таким образом, данный бактериофаг может быть использован в составе коктейлей различных фагов для лечения инфекций.

### **Список использованных источников**

1. Головин С. Пожиратели бактерий: убийцы в роли спасителей [Текст] / Под ред. Головина С., Волковой О., Панова А. // Биомолекула. – 2016. – С. 1.
2. Deep A. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease [Text] / A. Deep, U. Chaudhary, V. Gupta // Journal of Laboratory Physicians. - 2011. – V.3. - P. 4–11.
3. Hoiby N. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis [Text] / N. Hoiby, O. Ciofu, T. Bjarnsholt // Future Microbiology. - 2010. - V.5. – P. 1663–1674.
4. Maurice N. M. Pseudomonas aeruginosa Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections [Text] / N.M. Maurice, B. Bedi, R.T. Sadikotcorresponding // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2018. – V.58. - P. 428–439.
5. World Health Organization. Antimicrobial resistance [Text] // WHO. - 2014. – P. 1-2.

## **FEATURES OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNOPATOLOGICAL MECHANISMS OF PSYCHIATRIC DISORDERS ASSOCIATED WITH HASHIMOTO THYROIDITIS**

*P.A. SobolevskaIa\*, I.V. Kudryavtsev\*\*, L.P. Churilov \**

*\*Saint Petersburg State University*

*\*\* Institute of Experimental Medicine, Department of immunology,*

*Sain-Petersburg, Russian Federation*

*dr.polinasobolevskaia@bk.ru*

**Keywords:** autoimmunity, psychiatric disorders, Hashimoto’s thyroiditis, T-lymphocytes, autoantibodies

Comorbidity of autoimmune diseases (AID) and psychiatric disorders (PD) is not rare. For example, since 1949, it has been known about “myxoedematous madness” - a psychosis, associated with hypothyroidism, often caused by Hashimoto’s autoimmune thyroiditis (AIT) [1]. It is also known about Hashimoto’s encephalopathy (HE), a severe dysfunction of the central nervous system (CNS) associated with AIT, manifested by various psychoneurological and behavioral disorders, the pathogenesis of which is not associated with hormonal dysfunction of the thyroid gland (TG), since HE is also observed in euthyrosis. However, the pathogenesis, criteria and clinical characteristics of HE still remain unexplored [2,3].

**The purpose of this study:** to study the features of the cellular and humoral immune response in patients with AIT comorbid with mental disorders, which are not associated with hypothyroidism.

**Materials and methods:** The study included 169 people (both men and women at the age of 18 to 65 years), divided into 3 groups: 1) AIT+PD - patients with AIT, associated with various PD (n=33 ; mean age  $53.8 \pm 15.6$  years); 2) AIT - patients with AIT without PD (n=103; mean age  $46.7 \pm 13.3$  years); 3) HC - control group, healthy individuals without PD and AIT (n=33; mean age  $41.9 \pm 12.9$  years). The methods included study of the levels of thyroid hormones, thyrotropic hormone (TSH), prolactin (PRL), various autoantibodies by enzyme-linked immunosorbent assay method (ELISA), study of subpopulations of T-lymphocytes by flow cytometry, immunofluorescent analysis of the concentrations of various cytokines and chemokines. Statistical analysis of the obtained data was carried out using a set of parametric and nonparametric methods in the programming language R v 4.1.0.

**Results of the study.** The level of free thyroxine (FT4) in patients of all groups was within the reference normal values, however, in the AIT + PD group, it was statistically significantly lower than in patients from the AIT group. The levels of free triiodothyronine (FT3) and TSH did not differ in the study groups. In patients from the AIT+PD group, the serum level of PRL was statistically significantly higher than in patients of other groups, and exceeded the reference normal values. Since patients in this group receive antipsychotics known for their dopaminolytic prolactogenic effects, they were further divided into 3 subgroups, depending on the expected risk of provoking hyperprolactinemia (HPRL) as a side effect of their antipsychotics (no risk, low risk, high risk) [4]. It turned out that in the groups taking drugs with the expected minimum risk of HPRL and with the highest expected risk, HPRL was detected only in 25% of cases in each of the groups, and in the group taking the drug with the expected low risk of iatrogenic HPRL, it was already detected in 80%. This suggests that there is a non-drug cause of HPRL in patients with AIT and schizophrenia-like psychosis. An inverse significant statistically significant correlation ( $r = -0.51$ ,  $p = 0.037$ ) was found between PRL levels and the expected risk of HPRL attributed to various antipsychotics, again indicating a drug-independent factor causing HPRL in such comorbid cases. The concentration of antithyroid autoantibodies - antibodies to thyroglobulin (AB to TG) and antibodies to thyroperoxidase (AB to TPO) was significantly higher in patients with AIT and PR, compared with patients from other groups, and also went beyond the normal range. Another possible pathogenetic mechanism of HE is the action of anti-alpha-enolase antibodies, since this antigen and its homologs are expressed in the CNS and neuroendocrinocytes, and are present in Askanasi-Hurtle cells, which are usual for AIT, and also due to the frequent detection of such antibodies in HE, in particular - in Japanese patient's cohorts [5,6]. According to our studies in patients with AIT and PD, the level of these autoantibodies was statistically significantly higher than in patients of other groups. In the AIT + PD group, significant direct correlations were found between the concentrations of FT3 and cytokines such as IL-1b and IL-15, probably due to the

ability of these cytokines to act on the hypothalamic-pituitary regulation of endocrine functions through vagal afferents that have their receptors [7]. This is also explained by the role of FT3 in the CNS: it has receptors on microglial cells and controls their neuroinflammatory activation and phagocytic behavior [8]. Based on CD3 expression as well as CD4 or CD8 co-expression, populations of T-lymphocytes, T-helpers and cytotoxic T-cells were identified. In the course of further studies, a detailed analysis of the subpopulation composition of T-helpers (Th) in peripheral blood was carried out. The relative content of CD3+CD4+ lymphocytes within the total amount of CD3+ T cells did not differ significantly between the compared groups and was 61.01% (55.59; 66.95) in the control group, 63.88% (57.84; 70.09) in the AIT group and 65.01% (58.20; 68.77) in the AIT+PD group. Then, the features of expression of chemokine receptors CCR4, CCR6, CXCR3, and CXCR5 by Th cells of patients from different groups were evaluated. Four main subpopulations of “polarized” peripheral blood T-helpers were identified: Th1 (phenotype CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4-), Th2 (phenotype CXCR5-CXCR3-CCR6-CCR4+), Th17 with the phenotype CXCR5-CCR6+, and follicular T-helpers (Tfh) carrying CXCR5 on their surface. At the same time, the share of the total amount of Tfh was statistically significantly higher in the group of patients with PD, and the level of IL-21, expressed specifically by T-follicular helpers, was statistically significantly higher in both groups with AIT compared to the control group. IL-21 is also involved, in particular, in the immunopathogenesis of schizophrenia [9], so we regard the obtained data as pathogenetically significant for individuals with AIT and PD.

And the revealed statistically significant inverse correlation between the proportion of total central memory Tfh (CMTfh) and FT4 concentration in the AIT+PD group, and volume of the thyroid gland in the AIT group may indicate that in patients with AIT+PD Tfh play an important role in suppressing thyroid function, as indicated by the elevated CMTfh level in these patients, the nature of the relationship with FT4, and the high level of IL-21 (their main effector cytokine). To analyze the subpopulation composition of Tfh, we used an approach based on assessing the presence or absence of chemokine receptors CXCR3 and CCR6 on the cell surface [10]. Due to this, the entire compartment of circulating human Tfh was divided into four populations: CXCR3+CCR6- Tfh1, CXCR3-CCR6- Tfh2, CXCR3-CCR6+ Tfh17, and CXCR3+CCR6+ DP Tfh. The amount of DP Tfh was significantly higher in the AIT+PD group compared to the other groups, while the AIT group did not significantly differ from the control. At the same time, the concentration of IL-13 in the AIT+PD and AIT groups significantly exceeded the values obtained for the control group. We also found that in the blood serum of the examined patients with AIT+PD and AIT, the concentration of IL-5 was significantly higher than the control values. Both of these cytokines belong to Th2-dependent and their production is closely related, which probably explains the concordance of their changes in AIT. The increase in their production in AIT was also recorded by other authors [11]. In the analyzing of the relationship between the content of individual Tfh subpopulations and various immunoendocrine parameters in the AIT + PD group, statistically significant



correlations were found between the level of antibodies to TG and Tfh17, as well as these antibodies and Tfh1. In patients with AIT, Tfh2 and DP Tfh levels were statistically significantly correlated with thyroid hormone concentrations, although these correlations were multidirectional. Probably, thyroid hormones promote multidirectional differentiation of Tfh. There is evidence of a positive correlation of Tfh17 levels in the blood with concentrations of both anti-TG and anti-TPO antibodies in AIT cases [14]. Thus, in patients with AIT in comorbidity with PD, there is an imbalance in the subpopulation composition of T-follicular helpers, namely, a decrease in the Tfh2 subpopulation, which probably migrate to the lymph nodes and thyroid gland, which acquires a pronounced lymphoid infiltration and even lymphoid follicles during AIT [15] where these lymphocytes appear to express both IL-5 and IL-13 as evidenced by elevated levels of both of these cytokines.

Subsequently, the expression levels of the key chemokine receptors—CCR4, CCR6, and CXCR3—on the surface of the total pool of central memory follicular T helpers were evaluated. The content of CCR4-positive cells was statistically significantly different in the AIT+PD group from the AIT group, and in the AIT group from the control group, and the content of CXCR3+ cells was statistically significantly different in the AIT+PD group from all other groups.

Statistically significant correlations were also established between various immunoendocrine parameters and Tfh in the AIT+PD group and in the AIT group. In patients with AIT+PD, on the Tfh surface, the levels of expression of CXCR3, the level of which is associated with the concentration of antibodies to TG, and CCR4, which is associated with the volume of the thyroid gland, are increased; it is likely that the presence of these markers of migration into inflamed tissue on the cell surface may be associated with their ability to infiltrate thyroid tissue, as evidenced by an increase in thyroid volume in AIT+PD patients.

### **Conclusion**

1. A part of the of HE manifestations, but not all of its picture, depends on anti-TPO antibodies. Anti-alpha-enolase and anti- thyroglobulin antibodies also may play a pathogenetic role in HE

2. HPRL in AIT, comorbid with psychiatric disorders on the background of euthyrosis and mild hypothyroidism, serves as a pathogenetic factor in enhancing autoimmunity and correlates with some psychopathological symptoms of the disease, being at least partially not associated with iatrogenic effects

3. In patients with AIT and PD, there is an imbalance in the subpopulation composition of Tfh, which correlates with the manifestations of the disease and is presumably pathogenetically significant. At the same time, CXCR3 expression levels are increased on the surface of Tfh, which correlates with signs of thyroid damage and is pathogenetically significant for controlling the processes of lymphocyte migration to the CNS and thyroid gland.

*The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation RSF № 22-15-00113*

# ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНЫХ И ГУМОРАЛЬНЫХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ТИРОИДИТОМ ХАСИМОТО

*П.А. Соболевская\*, И.В. Кудрявцев\*\*, Л.П. Чурилов \**

*\*Санкт-Петербургский Государственный Университет*

*\*\* ФГБНУ Институт Экспериментальной Медицины*

*e-mail: dr.polinasobolevskaia@bk.ru*

**Ключевые слова:** аутоиммунитет, психические расстройства, тиреоидит Хасимото, Т-лимфоциты, аутоантитела

Коморбидность аутоиммунных заболеваний (АИЗ) и психических расстройств (ПР) нередка. Например, с 1949 года известно о «микседематозном безумии» – психозе, ассоциированном с гипотирозом, причиной которого часто служит аутоиммунный тиреоидит Хасимото (АИТ) [1]. Известно также об энцефалопатия Хасимото (ЭХ) – тяжелом нарушении функций центральной нервной системы (ЦНС) на фоне АИТ, проявляющееся различными психоневрологическими и поведенческими расстройствами, патогенез которых не связан с гормональной дисфункцией щитовидной железы (ЩЖ), поскольку ЭХ наблюдается и при эутирозе. Однако патогенез, критерии и клинические характеристики ЭХ до сих пор остаются неизученными [2,3].

**Цель данного исследования:** изучить особенности клеточного и гуморального иммунного ответа у пациентов с АИТ, коморбидным с психическими расстройствами (ПР), не связанными с гипотирозом.

**Материалы и методы:** в исследование были включены 169 человек (мужчин и женщин в возрасте от 18 до 65 лет), разделенных на 3 группы: 1) АИТ+PD - пациенты с АИТ, коморбидным с различными ПР (n=33; средний возраст 53,8±15,6 лет); 2) АИТ - пациенты с АИТ без ПР (n=103; средний возраст 46,7±13,3 лет); 3) НС - группа контроля, условно здоровые лица без ПР и АИТ (n=33; средний возраст 41,9±12,9 лет). Методы исследования включали в себя определение методом иммуноферментного анализа (ИФА) уровней тиреоидных гормонов, тиротропного гормона (ТТГ), пролактина (ПРЛ), различных аутоантител, определение субпопуляций Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии, иммунофлюоресцентный анализ концентраций различных цитокинов и хемокинов. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с применением комплекса параметрических и непараметрических методов на языке программирования R v 4.1.0.

**Результаты исследования.** Уровень свободного тироксина (FT4) у пациентов всех групп были в пределах референсных значений нормы, однако в группе АИТ+PD, был статистически значимо ниже, чем у пациентов из группы АИТ. Уровни свободного трийодтиронина (FT3) и ТТГ не отличались в исследуемых группах. У пациентов из группы АИТ+PD сывороточный уровень

ПРЛ был статистически значимо выше, чем у пациентов других групп, и превышал референсные значения нормы. С учетом того, что пациенты из этой группы принимают нейролептики, известные своим дофаминолитическим пролактогенным действием, они были дополнительно подразделены на 3 подгруппы, в зависимости от ожидаемого риска провокации гиперпролактинемии (ГПРЛ), как побочного эффекта принимаемых ими нейролептиков (отсутствие риска, низкий риск, высокий риск) [4]. Оказалось, что в группах, принимавших препараты с ожидаемо минимальным риском ГПРЛ и с самым высоким её ожидаемым риском, ГПРЛ выявлялась лишь в 25% наблюдений в каждой из групп, а в группе, принимающей препарат с ожидаемо низким риском ятрогенной ГПРЛ, она определялась уже у 80%. Это позволяет предположить, что существует нелекарственная причина ГПРЛ у пациентов с АИТ и шизофреноподобным психозом. Была выявлена обратная достоверная статистически значимая корреляция ( $r=-0.51$ ,  $p=0.037$ ) между уровнем ПРЛ и приписываемым различным антипсихотикам ожидаемым риском ятрогенной ГПРЛ, что опять-таки указывает на независимый от лекарственного лечения фактор, вызывающий ГПРЛ в подобных коморбидных случаях. Концентрация антитироидных аутоантител-антител к тироглобулину (АТ к ТГ) и антител к тиропероксидазе (АТ к ТПО) была достоверно выше у пациентов с АИТ и ПР, по сравнению с пациентами из других групп, а также выходила за пределы нормы. Еще одним возможным патогенетическим механизмом ЭХ служит действие анти-альфа-енолазных АТ, поскольку данный антиген и его гомологи экспрессированы в ЦНС и нейроэндокриноцитах, присутствуют в характерных для АИТ клетках Асканази-Хюртле, а также ввиду нередкого обнаружения таких АТ при ЭХ, в частности – в японских когортах больных [5,6]. По данным наших исследований у пациентов с АИТ и ПР, уровень данных АТ был статистически значимо выше, чем у пациентов других групп. В группе АИТ+ПР были выявлены достоверные прямые корреляции между концентрациями FT3 и таких цитокинов как IL-1b и IL-15, вероятно, это связано со способностью цитокинов действовать на гипоталамо-гипофизарную регуляцию эндокринных функций через вагальные афференты, располагающие их рецепторами [7]. Это объясняется и ролью FT3 в ЦНС: он располагает рецепторами на микроглиальных клетках и контролирует процессы их нейровоспалительной активации и фагоцитарное поведение [8]. На основании экспрессии CD3, а также коэкспрессии CD4 или CD8, были выявлены популяции Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, соответственно. В ходе дальнейших исследований был проведен детальный анализ субпопуляционного состава Т-хелперов (Th) периферической крови. Относительное содержание CD3+CD4+ лимфоцитов в рамках общего пула CD3+ Т-клеток достоверно не различалось между сравниваемыми группами и составляло в группе контроля (НС) 61.01% (55.59; 66.95), в группе психически здоровых пациентов с АИТ (АИТ) 63.88% (57.84; 70.09) и 65.01% (58.20; 68.77) у пациентов с АИТ и ПР (АИТ+ПР). Затем была проведена оценка особенностей экспрессии хемокиновых рецепторов

CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 Th клетками пациентов различных групп. Были выявлены четыре основные субпопуляции «поляризованных» Т-хелперов периферической крови: Th1 (фенотип CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4-), Th2 (фенотип CXCR5-CXCR3-CCR6-CCR4+), общий пул Th17 с фенотипом CXCR5-CCR6+, а также общий пул фолликулярных Т-хелперов (Tfh), несущих на своей поверхности CXCR5. При этом доля общего пуля Tfh была статистически значимо выше в группе пациентов с ПР, а уровень IL-21, экспрессируемого именно Т-фолликулярными хелперами, был статистически значимо выше в обеих группах с АИТ по сравнению с группой контроля. IL-21 участвует, в частности, и в иммунопатогенезе шизофрении [9], поэтому мы расцениваем полученные данные как патогенетически значимые для лиц с АИТ и ПР.

А выявленная статистически значимая обратная корреляция между долей общих Tfh центральной памяти (СMTfh) и концентрацией FT4 в группе АИТ+PD, и объемом ЩЖ в группе АИТ может свидетельствовать о том, что у пациентов с АИТ+PD Tfh играют важную роль в подавлении функции ЩЖ, на что указывает повышенный уровень СMTfh у данных пациентов, характер взаимосвязи с FT4 а также высокий уровень IL-21 (их главного эффекторного цитокина). Для анализа субпопуляционного состава Tfh был использован подход, основанный на оценке наличия или отсутствия на поверхности клетки хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6 [10]. Благодаря этому весь компартмент циркулирующих Tfh человека был разделен на четыре популяции: CXCR3+CCR6- Tfh1, CXCR3-CCR6- Tfh2, CXCR3-CCR6+ Tfh17 и CXCR3+CCR6+ DPTfh. Содержание DPTfh было достоверно выше в группе АИТ+PD по сравнению с остальными группами, тогда как группа АИТ значимо не отличалась от контроля. В то же время, концентрация IL-13 в группах АИТ+PD и АИТ достоверно превосходила значения, полученные для контрольной группы. Мы также выявили, что в сыворотке крови обследованных пациентов с АИТ+PD и АИТ и концентрация IL-5 была достоверно выше контрольных значений. Оба эти цитокина принадлежат к Th2-зависимым и их продукция тесно связана, чем и объясняется, вероятно, конкордантность их изменений при АИТ. Прирост их продукции при АИТ регистрировался и другими авторами [11]. IL-13 ассоциирован с развитием болезни Грейвса-фон Базедова, он экспрессируется не только в лимфоцитах, но и в тироцитах, а его продукция зависит от ТТГ и его рецептора [12,13]. При анализе взаимосвязей между содержанием отдельных субпопуляций Tfh и различными иммуноэндокринными параметрами в группе АИТ+PD были обнаружены статистически значимые корреляции между уровнем АТ к ТГ и Tfh17, а также этими АТ и Tfh1. У пациентов с АИТ уровни Tfh2 и DPTfh статистически значимо коррелировали с концентрациями гормонов ЩЖ, хотя эти корреляции были разнонаправленными. Вероятно, тироидные гормоны способствуют разнонаправленной дифференцировке Tfh. Есть данные о положительной корреляции содержания в крови Tfh17 – с концентрациями как АТ к ТГ, так и АТ к ТПО при АИТ [14]. Таким образом, у пациентов с АИТ в коморбидности с ПР наблюдается дисбаланс

субпопуляционного состава Т-фолликулярных хелперов, а именно снижение субпопуляции Tfh2, которые, вероятно, мигрируют в лимфоузлы и ЩЖ, приобретающую при АИТ выраженную лимфоидную инфильтрацию и даже лимфоидные фолликулы [15], где эти лимфоциты, видимо, и экспрессируют IL-5 и IL-13, о чем свидетельствуют повышенные уровни обоих этих цитокинов. В дальнейшем была проведена оценка уровней экспрессии ключевых хемокиновых рецепторов – CCR4, CCR6 и CXCR3 – на поверхности общего пула фолликулярных Т-хелперов центральной памяти. Содержание CCR4-позитивных клеток статистически значимо отличалось в группе АИТ+PD от группы АИТ, и в группе АИТ от контрольной группы, а содержание CXCR3+ клеток статистически значимо отличалась в группе АИТ+PD от всех остальных групп.

Также были установлены статистически значимые корреляции между различными иммуноэндокринными параметрами и Tfh в группе АИТ+PD и в группе АИТ. У пациентов с АИТ+PD на поверхности Tfh повышены уровни экспрессии CXCR3, уровень которого связан с концентрацией АТ к ТГ, и CCR4, который связан с объемом ЩЖ, вероятно, наличие этих маркеров миграции в воспаленную ткань на поверхности клеток может быть связано с их способностью инфильтрировать ткань ЩЖ, что подтверждается увеличением объема ЩЖ у пациентов из группы АИТ+PD.

### **Выводы**

1. Часть проявлений ЭХ, но не вся ее картина, зависят от АТ к ТПО. Патогенетическую роль при ЭХ играют также АТ к альфа-енолазе, тироглобулину.

2. ГПРЛ при АИТ, коморбидным с психическими нарушениями на фоне эутириоза и легкого гипотироза служит патогенетическим фактором усиления аутоиммунитета и коррелирует с некоторыми психопатологическими симптомами заболевания, будучи, по крайней мере, частично не связанной с ятрогенными воздействиями.

3. У пациентов с АИТ и ПР наблюдается дисбаланс субпопуляционного состава Tfh, коррелирующий с проявлениями заболевания и, предположительно патогенетически значимый. При этом на поверхности Tfh повышены уровни экспрессии CXCR3, что коррелирует с признаками поражения ЩЖ и является патогенетически значимым для контроля процессов миграции лимфоцитов в ЦНС и ЩЖ.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского Научного Фонда РФ № 22-15-00113*

### **Список использованной литературы / References**

1. Asher R. *Myxoedematous Madness. Br Med J* 1949;2:555–62.
2. Zvonarev V., Tregubenko P. *Hashimoto encephalopathy: Advanced review of clinical and scientific Aspects. Journal of Neurology and Neurobiology* 2020;6:1–1.

3. Starzyk J., Pituch-Noworolska A., Pietrzyk J., Urbanik A., Krocza S., Drożdż R. et al. *Niestrukuralne zaburzenia czynności OUN odpowiedzialne za współwystępowanie endokrynopatii, padaczki i zaburzeń psychoneurologicznych u dzieci i młodzieży. Non-structural abnormalities of CNS function resulting in coincidence of endocrinopathies, epilepsy and psychoneurologic disorders in children and adolescents* 2010;67:1127–31.
4. Vilar L., Fleseriu M., Bronstein M.D. *Challenges and pitfalls in the diagnosis of hyperprolactinemia. Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014;58:9–22. <https://doi.org/10.1590/0004-2730000003002>.
5. Fujii A., Yoneda M., Ito T., Yamamura O., Satomi S., Higa H. et al. *Autoantibodies against the amino terminal of alpha-enolase are a useful diagnostic marker of Hashimoto's encephalopathy. J Neuroimmunol* 2005;162:130–6. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.02.004>.
6. Yoneda M., Fujii A., Ito A., Yokoyama H., Nakagawa H., Kuriyama M. *High prevalence of serum autoantibodies against the amino terminal of alpha-enolase in Hashimoto's encephalopathy. J Neuroimmunol* 2007;185:195–200. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.01.018>.
7. Корнева Е.А. *Пути взаимодействия нервной и иммунной систем: история и современность, клиническое применение. Медицинская иммунология* 2020;22:405–18. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-PON-1974>.
8. Mori Y., Tomonaga D., Kalashnikova A., Furuya F., Akimoto N., Ifuku M. et al. *Effects of 3,3',5-triiodothyronine on microglial functions. Glia* 2015;63:906–20. <https://doi.org/10.1002/glia.22792>.
9. Long D., Chen Y., Wu H., Zhao M., Lu Q. *Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity. Journal of Autoimmunity* 2019;99:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.01.013>.
10. Morita R., Schmitt N., Bentebibel S-E., Ranganathan R., Bourdery L., Zurawski G. et al. *Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. Immunity* 2011;34:108–21. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.012>.
11. Zivancevic-Simonovic S., Mihaljevic O., Majstorovic I., Popovic S., Markovic S., Milosevic-Djordjevic O. et al. *Cytokine production in patients with papillary thyroid cancer and associated autoimmune Hashimoto thyroiditis. Cancer Immunol Immunother* 2015;64:1011–9. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1705-5>.
12. Ajjan R.A., Watson P.F., Weetman AP. *Detection of IL-12, IL-13, and IL-15 messenger ribonucleic acid in the thyroid of patients with autoimmune thyroid disease. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82:666–9. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.2.3760>.
13. Bednarczuk T., Placha G., Jazdzewski K., Kurylowicz A., Kloza M., Makowska U. et al. *Interleukin-13 gene polymorphisms in patients with Graves' disease. Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;59:519–25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2003.01880.x>.
14. Zhao J., Chen Y., Zhao Q., Shi J., Yang W., Zhu Z., et al. *Increased circulating Tfh17 and PD-1+Tfh cells are associated with autoantibodies in Hashimoto's thyroiditis. Autoimmunity* 2018;51:352–9. <https://doi.org/10.1080/08916934.2018.1516761>.
15. Строев Ю.И., Утехин В.И., Чурилов Л.П. *Аутоиммунный тиреоидит Хасимото, его последствия и коморбидность. Руководство по аутоиммунным заболеваниям для врачей общей практики. Под. ред. Шенфельда И., Мерони П.Л., Чурилова Л.П., Санкт-Петербург: ЭЛБИ-Медкнига; 2017, р. 298–325.*

## FEATURES OF ANTIGEN-SPECIFIC IL-2 PRODUCTS FOR DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS

*Tarabayeva A.S.*\*, *Abilbayeva A.A.*\*, *Prasanna W.P.*\*, *Dilip G.M.*\*, *Anilkumar M.S.*\*

\* - *Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan*  
*arailym2686@gmail.com*

Tuberculosis (TB) still ranks ninth among the top ten causes of death worldwide, being the leading cause of death from a single infectious agent. *M. tuberculosis* developing resistance to antibiotics is of major concern. Currently, approximately 20% of all strains of *M. tuberculosis* are resistant to at least one major TB drug. Multidrug-resistant TB (MDR-TB) and extensively drug-resistant TB (XDR-TB) are defined as resistance to at least two and four major anti-TB drugs, respectively [1]. Cases have been reported with resistance to even new licensed anti-TB drugs, bedaquiline and delamanid [2].

The lack of treatment options for XDR-TB poses a major challenge to society as terminally ill patients continue to spread the disease [3]. MDR-TB and XDR-TB being practically incurable by first-line and second-line anti-TB drugs respectively is gradually returning humanity to the pre-antibiotic era of TB.

The current situation calls for a re-evaluation of TB treatment with a shift in focus to immunotherapy as an addendum to drug resistant TB strains [4]. However, the immunological imbalances and their mechanisms must first be understood before the development of such interventions. Moreover, the difficulty of obtaining high quality sputum samples in certain cases like extrapulmonary TB poses a significant limitation to techniques like GeneXpert used for the diagnosis of MDR-TB. In this regard, it is necessary to search for biomarkers independent of sputum samples that can detect drug-resistant forms of TB [5].

Th1 cell-mediated immunity is associated with the production of key cytokines, like: interleukin-2 (IL-2), interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and a number of other cytokines. These cytokines are the main mechanism for the protection against TB. In this regard, the IFN- $\gamma$  release assay (IGRA) test is currently used to diagnose latent tuberculosis infection (LTBI). Moreover, there is an active search for the use of other cytokines in similar tests for the differential diagnosis of TB and LTBI [6]. The functional balance of Th1 and Th2 cells is responsible for induction of the correct immune response against pathogens. These cell populations have a mutually regulatory effect. In recent years, in addition to the analysis of the role of Th1 and Th2 cells, the role of other populations of T-helper cells, such as Th9, Th22, IFN- $\gamma$ -IL-10-producing Th-cells, T-reg and others, have been described [7]. Some recent evidence also suggests the imbalance of Th1 and Th2 cells, and immunosuppression, in the pathogenesis of MDR-TB/XDR-TB [8]. A number of studies have been devoted to the analysis of the role of T-reg in the pathogenesis of tuberculosis, including MDR/XDR-TB [9, 10]. Most researchers agree that T-regulatory activity increases during the formation of drug-resistant *M.*

*tuberculosis*. This increased activity causes a decrease in pathogenetically significant cytokines produced by Th1 cells.

IL-2 is one of the most powerful growth factors for T-cells, particularly, of Th-1 effector cell, which is necessary for optimal immune system function [11]. IL-2 has a possibility of being used in the treatment of drug resistant TB due to its role in the pathogenesis of MDR-TB/XDR-TB [12]. However, the number of publications devoted to the features of antigen-specific production of IL-2 in MDR/XDR-TB is extremely limited [13].

**Purpose of the study:**

To study the features of IL-2 production after stimulation of blood cells with *M. tuberculosis* secretory antigens ESAT-6, CFP-10 and TB 7.7 in drug-susceptible and drug-resistant forms of TB

**Materials and methods of research:**

**Study group:**

The study had 202 blood samples from TB patients. Recruitment of patients with tuberculosis was carried out at the National Center for Physiopulmonology of the Republic of Kazakhstan. Tuberculosis diagnosis was confirmed by molecular genetic (GeneXpert/Hain-test) and/or bacteriological (BACTEC) methods.

All studies were carried out with the approval of the Local Ethical Committee of the Kazakh National Medical University.

**Analysis of the production of antigen-specific IL-2**

To determine the level of production of antigen-specific IL-2, HUMAN IL-2 ELISA (Lionex GmbH, Germany) was used according to the manufacturer's instructions.

**Statistical methods:**

Statistical data processing was performed using the SPSS software package (23.0 demo-version). In connection with the revealed non-normal distribution, standard methods of non-parametric statistics (Mann-Whitney test, median) were used to describe the results obtained. Hypotheses were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . The odds ratio with a confidence interval was also calculated.

**Results**

Comparative analysis of the concentrations of antigen-specific IL-2 in drug-susceptible and drug-resistant forms of TB.

The results of a comparative analysis of IL-2 production in MDR and drug-susceptible TB after stimulation with a complex of ESAT-6, SFP-10 and TB7.7 TB antigens, as well as PHA are presented in the table 1.

*Table 1. "Concentration of antigen-specific and PHA-stimulated IL-2 in drug-susceptible and drug-resistant TB"*



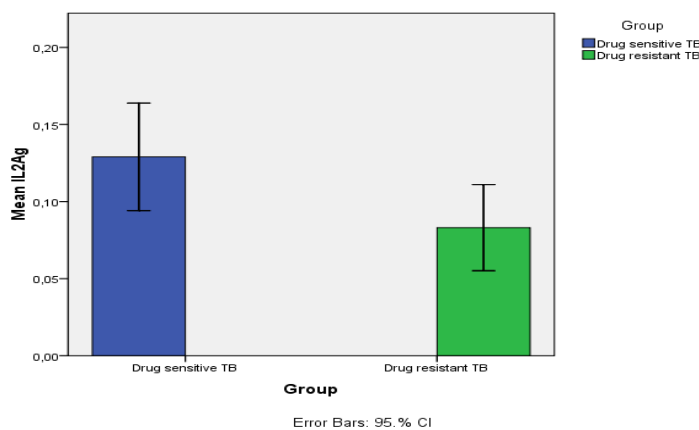
Parameters	Group	M±m	Median	U - test	p	OR
<b>ESAT-6, CFP-10 and TB 7.7 antigens stimulation</b>						
IL-2 (ME/ml)	Drug sensitive	0,13±0,02	0,08	3115,5	<b>0,003</b>	<b>2,602</b> <b>[1,179-5,7429]</b>
	Drugresistance	0,08±0,01	0,06			
<b>PHA stimulation</b>						
IL-2 (ME/ml)	Drug sensitive	1,52±0,07	1,67	3847,5	0,277	2,736 [0,7747-9,6627]
	Drugresistance	1,41±0,05	1,60			

When comparing the concentration of antigen-specific IL-2 in patients with MDR and drug-susceptible TB, it was found that the level of IL-2 was significantly higher in patients with drug-susceptible TB compared with MDR patients (0.13±0.02 IU/ml (median – 0.08) vs. 0.08±0.01 IU/ml (median – 0.06), respectively, p=0.003). At the same time, there were no differences in PHA-stimulated IL-2 levels between MDR and drug-susceptible TB.

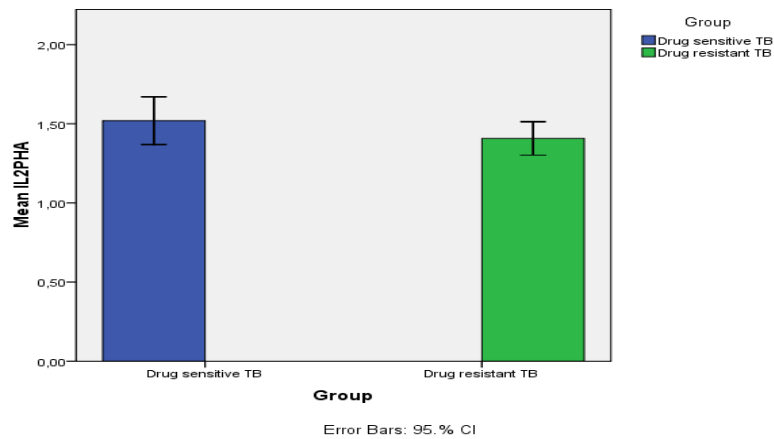
The distribution of levels of antigen-specific and PHA-stimulated IL-2 in patients with MDR and drug-susceptible TB is shown in the figures 1 and 2.

The level of antigen-specific IL-2 in patients with drug-susceptible TB (mean (95% CI) = 0,13 (0.09-0.16) IU/mL) was significantly higher than in patients with MDR-TB (mean (95% CI) = 0.08 (0.05-0.11) IU/ml) (p=0.003).

The level of PHA-stimulated IL-2 was the same in patients with drug-susceptible TB (mean (95% CI) = 1.52 (1.37-1.67) IU/ml) and MDR-TB (mean (95% CI) = 1.41 (1.30-1.51) IU/mL) (p = 0.277).



**Figure 1** “Distribution of IL-2 concentration after stimulation with ESAT-6, CFP-10 and TB 7.7 antigens”



**Figure 2** “Distribution of IL-2 concentration after stimulation with PHA”

We also assessed the association of MDR-TB with a negative antigen-specific IL-2 result. To determine negative results, we used the cut-off established by us in previous studies [14]. It was found that the probability of obtaining a negative result is 2.6 times higher in MDR-TB than in drug-resistant TB (OR - 2.602 95% CI - 1.179-5.7429).

**Conclusion:** Summarizing the obtained results, we can conclude that drug-resistant strains of *M. tuberculosis* have a specific suppressive effect on the production of IL-2, while not having a general suppressive effect on the cells producing this cytokine.

### Discussion

We analyzed IL-2 production after stimulating blood cells with well-studied immunodominant antigens of *M. tuberculosis*; ESAT-6, CFP-10 and TB 7.7. The virulence of these antigens was determined. These antigens are characteristic of *M. tuberculosis* and are absent in all BCG strains, as well as many other non-tuberculous mycobacteria. Due to these features of the above-mentioned antigens, they are widely used in diagnostic immunological tests which are based on antigen specific cytokine production, as well as the development of anti-tuberculosis vaccines.

The choice of IL-2 in our study was made due to its role in the pathogenesis of tuberculosis [15]. IL-2 is one of the main cytokines synthesized by Th1, which is the central cell that provides *M. tuberculosis* protection, along with cytokines; IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Initially, dendritic cells and macrophages present antigen to T cells in association with major histocompatibility complex (MHC) class I and class II. Th1 activation is followed by activation of cytotoxic CD8+ T-lymphocytes. All of these cells are initially activated in the pulmonary lymph nodes which subsequently migrate to the site of infection. Stimulation of naive CD4+ cells by IL-2 leads to their differentiation into effector Th1 cells. These cells activate CD8+ cytotoxic T-cells which release granzyme B and perforin proteins.

We found a significant decrease in antigen-specific IL-2 production when cells were stimulated with *M. tuberculosis* antigens from patients with drug-resistant forms of

TB, compared to stimulation with Phytohemagglutinin (PHA), a non-specific T-cell mitogen, in patients with drug-sensitive and drug-resistant forms. This evidence suggests that the presence of MDR-TB/XDR-TB in patients without any immunocompromise produces a specific clonal decrease in the activity of IL-2 producing cells, specifically Th1. Our results are consistent with those of other authors. For example, Xun Liu et al found in an experiment that intense antigenic stimulation led to a decrease in the production of antigen-specific IFN- $\gamma$  and IL-2, additionally, it also decreased the number of CD8+ memory T cells. Conversely, therapy with IL-2 restored the function of antigen-specific T-cell response in the mice of this group [12].

There have been a number of studies dedicated to study the mechanisms of reduced T-cell activity in MDR-TB/XDR-TB, one mechanism in particular proposes increased T-regulatory cell activity with CD4+, CD25+ and FoxP3+ phenotype [9, 16, 17]. A noted increase in T-regulatory activity was observed, particularly in pleural effusions [17]. FoxP3+ T-regulatory cells suppress effector T-cell function at pathologic site in miliary tuberculosis [18]. Another mechanism hypothesized to reduce Th1 cell activity is an imbalance of cytokines produced by Th1/Th2 subpopulations [19]. A study by Renhua Fan et al., 2016 found an increase in the number of CD4+ CD25+ T-regulatory cells in the blood of patients with MDR-TB. The authors also found an increase in IL-10 and Th2 activity; however, a lower natural killer cell activity was observed. The authors conclude that the persistence of Mycobacterium tuberculosis associated with the formation of resistance leads to an imbalance in the effector and suppressive immune mechanisms [20].

**Resume:** This study contributes to the understanding of the mechanisms of production of pathogenetically significant cytokines in MDR-TB, which will contribute to the development of more effective immunobiological diagnostic systems. At the same time, additional studies are needed to confirm the hypothesis of the formation of specific immunosuppression in MDR-TB.

### **References:**

1. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2019*. World Health Organization; 2019. Accessed March 28, 2022. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/329368>.
2. He W., Liu C, Liu D. et al. Prevalence of Mycobacterium tuberculosis resistant to bedaquiline and delamanid in China. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021;26:241-248. doi:10.1016/j.jgar.2021.06.007.
3. Dheda K., Gumbo T., Maartens G. et al. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *Lancet Respir Med*. 2017;5(4):291-360. doi:10.1016/S2213-2600(17)30079-6.
4. Tan Q., Min R., Dai G. qun, et al. Clinical and Immunological Effects of rhIL-2 Therapy in Eastern Chinese Patients with Multidrug-resistant Tuberculosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):17854. doi:10.1038/s41598-017-18200-5.
5. Mensah G.I., Boakye A.N., Basingnaa A. et al. Identification of Serum Cytokine Biomarkers Associated with Multidrug Resistant Tuberculosis (MDR-TB). *Immuno*. 2021;1(4):400-409. doi:10.3390/immuno1040028.
6. Sudbury E.L., Clifford V., Messina N.L., Song R., Curtis N. Mycobacterium tuberculosis-specific cytokine biomarkers to differentiate active TB and LTBI: A systematic review. *J Infect*. 2020;81(6):873-881. doi:10.1016/j.jinf.2020.09.032.

7. da Silva M.V., Tiburcio M.G.S., Machado J.R. et al. Complexity and Controversies over the Cytokine Profiles of T Helper Cell Subpopulations in Tuberculosis. *J Immunol Res.* 2015;2015:1-13. doi:10.1155/2015/639107.
8. Bafica A., Scanga C.A., Feng C.G., Leifer C., Cheever A., Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 2005;202(12):1715-1724. doi:10.1084/jem.20051782.
9. Geffner L., Yokobori N., Basile J. et al. Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis Display Impaired Th1 Responses and Enhanced Regulatory T-Cell Levels in Response to an Outbreak of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* M and Ra Strains. *Infect Immun.* 2009;77(11):5025-5034. doi:10.1128/IAI.00224-09.
10. Semple P.L., Binder A.B., Davids M., Maredza A., van Zyl-Smit R.N., Dheda K. Regulatory T Cells Attenuate Mycobacterial Stasis in Alveolar and Blood-derived Macrophages from Patients with Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(11):1249-1258. doi:10.1164/rccm.201210-1934OC.
11. Raeber M.E., Zurbuchen Y., Impellizzieri D., Boyman O. The role of cytokines in T-cell memory in health and disease. *Immunol Rev.* 2018;283(1):176-193. doi:10.1111/imr.12644.
12. Liu X., Li F., Niu H. et al. IL-2 Restores T-Cell Dysfunction Induced by Persistent *Mycobacterium tuberculosis* Antigen Stimulation. *Front Immunol.* 2019;10:2350. doi:10.3389/fimmu.2019.02350.
13. Tan Q., Xie W.P., Min R. et al. Characterization of Th1- and Th2-type immune response in human multidrug-resistant tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(6):1233-1242. doi:10.1007/s10096-011-1434-4.
14. Abilbayeva A.A., Tarabayeva A.S., Bitanova E.Zh., Bektasov S.Zh., Haertynova I.M., Shuraliyev E.A. Evaluation of the effectiveness of the experimental test platform based on antigen-specific il-2-producing ability of lymphocytes in the diagnosis of tuberculosis. *Quarterly scientific and practical journal «Life and health science».* 2019;4:29-35.
15. Domingo-Gonzalez R., Prince O., Cooper A., Khader S.A. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Jacobs Jr. WR, McShane H, Mizrahi V, Orme IM, eds. *Microbiol. Spectr.* 2016;4(5):4.5.23. doi:10.1128/microbiolspec.TBTB2-0018-2016.
16. Guyot-Revol V., Innes J.A., Hackforth S., Hinks T., Lalvani A. Regulatory T Cells Are Expanded in Blood and Disease Sites in Patients with Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(7):803-810. doi:10.1164/rccm.200508-1294OC.
17. Qin X. Jun, Shi H. Zhong, Liang Q.Li, Huang L.Ying, Yang H. Bo. CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in tuberculous pleural effusion. *Chin Med J (Engl).* 2008;121(7):581-586.
18. Sharma P.K., Saha P.K., Singh A., Sharma S.K., Ghosh B., Mitra D.K. FoxP3 + Regulatory T Cells Suppress Effector T-Cell Function at Pathologic Site in Miliary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(11):1061-1070. doi:10.1164/rccm.200804-529OC.
19. Xu H., Yang Y., Wu Q., Zhang Y. Th1/Th2 Imbalance and Elevated PD-L1 in Pleural Effusion Predict the Risk of Multi-Drug Resistant Tuberculous Pleuritis. *Iran J Immunol.* 2020;17(1). doi:10.22034/iji.2020.80290.
20. Fan R., Xiang Y., Yang L. et al. Impaired NK cells' activity and increased numbers of CD4 + CD25+ regulatory T cells in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* patients. *Tuberculosis.* 2016;98:13-20. doi:10.1016/j.tube.2016.02.001.

## ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ АТМОСФЕРНЫХ ВЫБРОСОВ В ПРОВОКАЦИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА (ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ)

*Таха Е.А.<sup>1</sup>, Ларионова Р.В.<sup>1,2</sup>, Петров С.В.<sup>1,2</sup>, Казарян Г.Г.<sup>1</sup>, Валеева А.Р.<sup>1</sup>,  
Коровина М.О.<sup>1,2</sup>, Шамаев Н.Д.<sup>2</sup>, Пипченко А.П.<sup>2</sup>, Макаму С.А.<sup>2</sup>, Ташпулатов Б.М.<sup>2</sup>,  
Латыпова Э.Г.<sup>2</sup>, Селиванова Д.С.<sup>2</sup>, Ренадино И.<sup>3</sup>, Кравцова О.А.<sup>2</sup>,  
Хаммадов Н.И.<sup>4,5</sup>, Хаертынов К.С.<sup>1,4</sup>, Бадрутдинов О.Р.<sup>2</sup>,  
Мукминов М.Н.<sup>1,2</sup>, Шуралев Э.А.<sup>1,2,4,5</sup>, Арлеевская М.И.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО  
Минздрава России, 420012, г. Казань, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, г. Казань, Россия;

<sup>3</sup>Université Toulouse III - Paul Sabatier, 31062, г. Тулуза, Франция;

<sup>4</sup>ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической  
безопасности», 420075, г. Казань, Российская Федерация;

<sup>5</sup>ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана»,  
420029, г. Казань, Россия  
*miwutka@yandex.ru*

**Актуальность.** В настоящее время в развитии ревматоидного артрита важную триггерную роль отводят экологическим факторам.

Установлено, что содержащиеся в атмосфере экотоксиканты – производственные выбросы провоцируют окислительный стресс. Такие средовые факторы, как плотность населения и количество транспортных средств, влияют на частоту и продолжительность банальных инфекций, которые вносят определённый вклад в провокацию окислительного стресса. Окислительный стресс закономерно провоцирует продукцию антител к окисленным продуктам. Проведено сравнение уровней окислительных маркёров в образцах лиц, проживающих в провинциях с наибольшим и наименьшим содержанием отдельных экотоксикантов в атмосфере.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, окислительный стресс, экотоксиканты, антитела к окисленным липидам

## POSSIBLE ROLE OF ATMOSPHERIC EMISSIONS IN PROVOCATION OF RHEUMATOID ARTHRITIS (PRELIMINARY DATA)

*Takha E.A.<sup>1</sup>, Larionova R.V.<sup>1,2</sup>, Petrov S.V.<sup>1,2</sup>, Kazarian G.G.<sup>1</sup>, Valeeva A.R.<sup>1</sup>, Korovina M.O.<sup>1,2</sup>, Shamaev N.D.<sup>2</sup>, Pipchenko A.P.<sup>2</sup>, Macamo S.A.<sup>2</sup>, Tashpulatov B.M.<sup>2</sup>, Latipova E.G.<sup>2</sup>, Selivanova D.S.<sup>2</sup>, Renaudineau Y.<sup>3</sup>, Kravtsova O.A.<sup>2</sup>, Khammadox N.I.<sup>4,5</sup>, Khaertynov K.S.<sup>1,4</sup>, Badrutdinov O.R.<sup>2</sup>, Mukminov M.N.<sup>1,2</sup>, Shuralev E.A.<sup>1,2,4,5</sup>, Arleevskaya M.I.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>*Kazan State Medical Academy – Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia, Kazan, 420012, Russian Federation;*

<sup>2</sup>*Kazan Federal University, Kazan, 420008, Russian Federation;*

<sup>3</sup>*Université Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, 31062, France;*

<sup>4</sup>*Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, 420075, Russian Federation;*

<sup>5</sup>*Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan, 420029, Russian Federation*

Currently, environmental factors play an important trigger role in the development of rheumatoid arthritis.

It has been established that ecotoxigants contained in the atmosphere – industrial emissions provoke oxidative stress. Environmental factors such as population density and the number of vehicles affect the frequency and duration of banal infections, which contribute to the provocation of oxidative stress. Oxidative stress naturally provokes the production of antibodies to oxidized products. The levels of oxidative markers in samples of persons living in provinces with the highest and lowest content of individual ecotoxigants in the atmosphere were compared.

**Key words:** rheumatoid arthritis, oxidative stress, ecotoxigants, antibodies to oxidized lipids

Ревматоидный артрит – широко распространенное воспалительное заболевание, половина риска развития которого приходится на факторы окружающей среды.

Наиболее давнюю историю имеют исследования связи РА и инфекций, однако на сегодняшний день конкретные триггерные механизмы и их воздействия на предрасположенный к развитию заболевания организм остаются неясными. В литературе имеются немногочисленные работы, демонстрирующие наличие связей заболеваемости РА или параметров заболевания с предшествующим или длящимся контактом с тем или иным экотоксикантом либо средой обитания, но ни в одной из них не анализируются конкретные молекулярные взаимодействия с предрасположенным к развитию РА организмом.

Экотоксиканты провоцируют различные неспецифические процессы в организме. В частности, окислительный стресс (ОС). Активация продукции активных форм кислорода (АФК) является составной частью противоинфекционного ответа. При РА – хроническом воспалительном

заболевании – обнаруживаются признаки ОС как в сосудистом русле, так и в суставах, причем выраженность этого процесса коррелирует с активностью заболевания и, по-видимому, имеет патогенетическое значение.

**Цель:** исследовать роль атмосферных выбросов в провокации ревматоидного артрита

**Материалы и методы.** Содержание тяжёлых металлов в волосах проводился с помощью масс-спектрометрии, уровней маркёров ОС, анти-оксиЛПНП измерялись иммуноферментным методом с помощью стандартных коммерческих наборов. Экспрессия генов перечисленных выше факторов с помощью ПЦР в режиме реального времени. Статистический анализ проводился методами ANOVA/MANOVA и множественный регрессионный анализ, сила корреляционной зависимости оценивалась по шкале Чеддока, различия считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты:** Предварительный анализ данных, полученных при исследовании малых выборок биологических образцов, позволил, тем не менее, выявить следующие закономерности.

Содержащиеся в атмосфере экотоксиканты – производственные выбросы, даже если их уровень не превышает предельно допустимые значения, способны провоцировать окислительный стресс у всех жителей региона. На данный момент при анализе малых выборок маркёров окислительного стресса заметно, что выраженность этого процесса у больных ранним РА, лиц группы риска развития заболевания – родственников этих больных не отличается от таковой в контроле. В то же время в группах больных РА и родственников сывороточные уровни антител к окисленным ЛПНП (oxiLDL-AT) превышают таковые в контроле ( $p < 0,02$ , ANOVA-MANOVA. С учётом выявленных тенденций, возможно, при увеличении выборок, различия в уровнях маркёров окислительного стресса в группах окажутся достоверными.

Такие средовые факторы, как плотность населения и количество транспортных средств влияют на частоту и продолжительность банальных инфекций в группах. В свою очередь, инфекции вносят определённый вклад в провокацию окислительного стресса во всех группах. Вклад частоты и суммарной продолжительности инфекционных эпизодов в выраженность окислительного стресса особенно заметен в группах родственников и больных ранним РА. Проведено сравнение уровней окислительных маркёров в образцах лиц, проживающих в провинциях с наибольшим и наименьшим содержанием отдельных экотоксикантов в атмосфере.

Уровни окисленных белков и окисленных ЛПНП оказались достоверно более высокими у жителей с наибольшим содержанием монооксида углерода по сравнению с жителями провинции с наименьшим содержанием оксида углерода.

При этом заЗХЪ была значительной и достоверной.

Можно отметить зависимость сывороточных уровней окисленных белков от содержания оксида азота была умеренной и достоверной.

Аналогичные результаты получены при анализе зависимости уровней маркёров окислительного стресса от содержания летучих органических соединений в атмосфере при сравнении образцов из провинций с наибольшим содержанием экотоксиканта и наименьшим, где зависимость уровней окисленных белков оказалась умеренной и достоверной.

Окислительный стресс закономерно провоцирует продукцию антител к окисленным продуктам, в частности, исследованным к настоящему времени антител к окисленным ЛПНП. Выявлено что, у лиц, предрасположенных к развитию РА и находящихся в преклинической стадии заболевания, как и у больных, ранним РА, уровень этих антител повышен.

В группах родственников и больных ранним РА выявлена зависимость ряда клинических и лабораторных показателей от уровней указанных антител, что указывает на их патогенетическую значимость. Учитывая связь уровней этих антител со стёртыми клиническими признаками поражения суставов в доклиническую стадию РА и с возрастом появления суставных симптомов у больных РА, а также с уровнем антиЦЦП, антитела к окисленным ЛПНП, вероятно, имеют патогенетическое значение, в частности, они, возможно, могут служить триггером суставных симптомов в доклиническую стадию.

Таким образом, выраженность окислительного стресса (в том числе ок-ЛПНП) у жителей загрязнённых регионов выше, чем таковой в условно чистых районах. Учитывая вероятную триггерную роль окислительного стресса, опосредуемую антителами к окисленным ЛПНП, вероятность заболеть РА у лиц группы риска, проживающих в грязных районах, выше. Для проверки этой гипотезы необходимо увеличивать выборки результатов исследования сывороточных уровней маркёров окислительного стресса и антител к ним, чтобы сравнить эти показатели в когортах лиц, проживающих в районах с высоким и низким уровнями загрязнения. Исследования необходимо дополнить тестированием активности факторов антиоксидантной системы. В этом плане проводятся исследования экспрессии генов антиоксидантной системы в группах. Также исследуются продукции активных форм кислорода гранулоцитами и суммарная антиоксидантная активность цельной крови методом люминол-зависимой хемилюминесценции в группах.

Необходимо отметить, что в настоящее время имеется только информация об экологической обстановке в административных районах РТ, но экологическая группа ЦНИЛ проводит исследования этих параметров непосредственно в населённых пунктах проживания лиц из наших когорт. Кроме того, проводится исследование содержания тяжёлых металлов в волосах этих лиц. Возможно, результаты этих исследований позволят более точно оценить вклад экологических факторов в развитие окислительного стресса.

Поскольку экологические факторы в определённой степени можно считать модифицируемыми, исследование их роли в развитии ревматоидного артрита и конкретных механизмов триггерного воздействия этих факторов на лиц группы



риска развития заболевания имеют важное фундаментальное и прикладное значение. Полученные данные, возможно, позволят разработать подходы к профилактике перехода лиц группы риска в преκлиническую стадию РА и в стадию раннего РА.

**Выводы:** При исследовании ограниченных выборок было продемонстрировано влияние экотоксикантов на провокацию ОС у жителей различных регионов. Также впервые продемонстрировано, что спровоцированный экотоксикантами ОС провоцирует продукцию антител к окисленным ЛПНП, более выраженную у больных ранним РА и лиц, предрасположенных к развитию заболевания, по сравнению контролем. Выявленная в группах родственников и больных ранним РА зависимость ряда клинических и лабораторных показателей от уровней указанных антител, может свидетельствовать об их патогенетическом значении. Таким образом, выраженность ОС (в том числе уровня ок-ЛПНП) у жителей загрязнённых регионов выше, чем таковой в условно чистых районах. Учитывая вероятную триггерную роль ОС, опосредуемую антителами к ок-ЛПНП, вероятность заболеть РА у лиц группы риска, проживающих в грязных районах, выше.

Полученные данные, возможно, позволят разработать подходы к профилактике перехода лиц группы риска в преκлиническую стадию РА и в стадию раннего РА.

## **NEXT-GENERATION SEQUENCING AS A TOOL FOR GENETIC CHARACTERIZATION OF LARGE VIRUS COLLECTIONS ON THE EXAMPLE OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS STRAINS FROM WESTERN SIBERIA**

Tkachev S.E.<sup>1,2\*</sup>, Shaikhutdinov N.M.<sup>1,3</sup>, Shigapova L.Kh.<sup>1</sup>, Chicherina G.S.<sup>4</sup>,  
Zinkina A.S.<sup>4</sup>, Yakimenko V.V.<sup>5</sup>, Shagimardanova E.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Research Center "Regulatory Genomics" of Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia;*

<sup>2</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia;*

<sup>3</sup>*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia;*

<sup>4</sup>*Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia;*

<sup>5</sup>*Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russia*

\* *sergey.e.tkachev@gmail.com*

**Key words:** tick-borne encephalitis virus, Western Siberia, subtypes, lineages

*Introduction:* Tick-borne encephalitis virus (TBEV), a member of the *Flaviviridae* family, is the causative agent of a severe disease of the human central nervous system.

To date, TBEV foci have been identified in Europe and Asia, including European and Central Russia, Ural, Siberia, Far-East. Up to 12,000 tick-borne encephalitis cases are identified annually from countries where the disease is reportable. Mortality rates

between 0.2% to 20% are reported, depending on region and perhaps on viral subtype (Dobler et al., 2021).

Currently, in accordance with classification TBEV is divided into three subtypes: Far Eastern, Siberian (TBEV-Sib) and European (Virus taxonomy..., 2012). In addition, two putative TBEV subtypes, Baikalian (Demina et al., 2010) and Himalayan (Dai et al., 2018), have been described. TBEV-Sib is the most common subtype and found in all regions where TBEV was detected, except for Central and Western Europe. Until recently, three genetic lineages were described for TBEV-Sib: Zausaev, Vasilchenko, and Baltic; subsequent studies showed that there are at least two more lineages, Obskaya and Bosnia (Tkachev et al., 2017; 2020).

In the majority of TBEV collections genetic studies, sequencing of only genome fragments is used, which limits the use of the data obtained to assess genetic diversity, the distribution of certain virus variants, phylogeography, as well as the patterns that determine the evolution of their genomes, and only complete genome sequences provide the necessary information. The use of "classical" approaches based on Sanger sequencing for this is inefficient and time consuming. The solution to this problem could be the use of high-throughput sequencing (next-generation sequencing, NGS) to analyze large sets of TBEV strains samples from virus collections.

Currently, only about 250 TBEV complete genome sequences are presented in the GenBank databases (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) (and only about 30 of them for TBEV-Sib), so the task of replenishing data on the genomes of various TBEV genetic variants is crucial.

*Aim of the study:* The aim of this work was to develop approaches to high-throughput sequencing of TBEV strains, obtain TBEV complete genome sequences of strains from different regions of Western Siberia, and perform molecular genetic analysis of the obtained data in comparison with the available TBEV sequences from the GenBank database.

*Materials and Methods:* For the study, 85 TBEV strains previously isolated by bioassay method from various natural samples (different ticks and small mammals species) in various regions of Western Siberia (Novosibirsk oblast, Omsk oblast, Khanty-Mansiysk Autonomous District, the Altai Republic of the Russian Federation, as well as Kazakhstan) were taken. From the isolated genomic RNAs, genomic libraries were constructed and sequenced using Miseq (Illumina). After assessing the quality of the data and trimming, genomes were assembled either *de novo* (with sufficiently high coverage) or using the data mapping method with published reference TBEV genomes (with low coverage). For further analysis, TBEV complete genome sequences from the GenBank database corresponding to various subtypes and genetic lineages of the virus were used.

*Results:* Analysis of determined complete genome sequences of TBEV strains isolated in various regions of Western Siberia revealed predominantly TBEV-Sib strains, with single findings of TBEV of the Far Eastern subtype in the Altai Republic and the Novosibirsk Region, and of the European subtype in the Omsk Region. Zausaev

lineage was found to be the most represented among the studied strains, and the Vasilchenko lineage was represented to a lesser extent, which correlates with our earlier data. Also, strains of the Baltic lineage were discovered and characterized in the Novosibirsk and Omsk oblasts, as well as, for the first time, in Kazakhstan. No representatives of the Obskaya lineage previously described in the indicated territory were found, which, as previously shown, is most genetically different from other TBEV-Sib lineages. Analysis of the chronogram demonstrated that within the TBEV-Sib, the Obskaya lineage diverged from the common ancestor the earliest, after that the Bosnia lineage was separated, then the Baltic lineage, and the Zausaev and Vasilchenko lineages diverged most recently.

*Acknowledgements:* The study was part of Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030) and funded by the Pfizer Quality Improvement project #65238411 "Optimization of methods for mass complete genome sequencing of tick-borne encephalitis virus strains".

### ***References***

1. Dai X. et al. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 74. doi: 10.1038/s41426-018-0081-6.
2. Demina T.V. et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *J. Med. Virol.* 2010; 82(6): 965–976. doi: 10.1002/jmv.
3. Dobler G. et al. (Eds.). *The TBE Book*. 4th ed. Singapore: Global Health Press; 2021. 386 p.
4. Tkachev S.E. et al. New genetic lineage within the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus found in Western Siberia, Russia. *Infection, Genetics and Evolution.* 2017; 56: 36–43. doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.020
5. Tkachev S.E. et al. Genetic diversity and geographical distribution of the Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(2):101327. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101327.4
6. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2012. Elsevier Academic Press, San Diego.

# ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬШИХ КОЛЛЕКЦИЙ ВИРУСОВ НА ПРИМЕРЕ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ИЗ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Ткачев С.Е.<sup>1,2\*</sup>, Шайхутдинов Н.М.<sup>1,3</sup>, Шигапова Л.Х.<sup>1</sup>, Чичерина Г.С.<sup>4</sup>,  
Зинкина А.С.<sup>4</sup>, Якименко В.В.<sup>5</sup>, Шагимарданова Е.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научный центр "Регуляторная геномика" Института фундаментальной медицины  
и биологии Казанского федерального университета, г. Казань, Россия;

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
г. Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup>Сколковский институт науки и технологии, г. Москва, Россия;

<sup>4</sup>Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск, Россия;

<sup>5</sup>Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций, г. Омск, Россия

\* *sergey.e.tkachev@gmail.com*

**Ключевые слова:** вирус клещевого энцефалита, Западная Сибирь, субтипы, линии

**Введение:** Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), представитель семейства *Flaviviridae*, является возбудителем тяжелого заболевания центральной нервной системы человека. К настоящему времени очаги ВКЭ выявлены в Европе и Азии, в том числе в Европейской и Центральной России, на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке. Ежегодно в странах, где регистрируется данное заболевание, выявляется до 12 000 случаев клещевого энцефалита. Сообщается о смертности от 0,2% до 20% в зависимости от региона и, возможно, от субтипа вируса (Dobleretal., 2021).

В настоящее время в соответствии с классификацией ВКЭ подразделяют на три субтипа: дальневосточный, сибирский (ВКЭ-Сиб) и европейский (Virus taxonomu..., 2012). Кроме того, были описаны два предполагаемых субтипа ВКЭ: байкальский (Deminaetal., 2010) и гималайский (Daietal., 2018). ВКЭ-Сиб является наиболее распространенным субтипом и встречается во всех регионах, где был выявлен ВКЭ, за исключением Центральной и Западной Европы. До недавнего времени для ВКЭ-Сиб были описаны три генетические линии: Заусаев, Васильченко и Балтийская; последующие исследования показали наличие еще как минимум двух линий – Обской и Боснийской (Tkachevetal., 2017; 2020).

В большинстве генетических исследований коллекций ВКЭ используется секвенирование только фрагментов генома, что ограничивает использование полученных данных для оценки генетического разнообразия, распространения тех или иных вариантов вируса, филогеографии, а также закономерностей, определяющих эволюцию их геномов, и только полногеномные последовательности предоставляют необходимую информацию. Использование для этого «классических» подходов, основанных на секвенировании по Сэнгеру, неэффективно и требует много времени. Решением этой проблемы могло бы стать

использование высокопроизводительного секвенирования (next-generation sequencing, NGS) для анализа больших наборов образцов штаммов ВКЭ из коллекций вирусов.

В настоящее время в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) представлено всего около 250 полногеномных последовательностей ВКЭ (и только около 30 из них для ВКЭ-Сиб), поэтому задача пополнения данных о геномах различных генетических вариантов ВКЭ является чрезвычайно важной.

*Цель исследований:* Целью данной работы являлась разработка подходов к высокопроизводительному секвенированию геномов штаммов ВКЭ, получение полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ из различных регионов Западной Сибири и проведение молекулярно-генетического анализа полученных данных в сравнении с имеющимися последовательностями ВКЭ из базы данных GenBank.

*Материалы и методы.* В исследовании использовали 85 штаммов ВКЭ, ранее выделенных методом биопробы из различных природных образцов (разных видов клещей и мелких млекопитающих) в различных регионах Западной Сибири (Новосибирская область, Омская область, Ханты-Мансийский автономный округ, Республика Алтай Российской Федерации, а также в Казахстане). Из выделенных геномных РНК были сконструированы геномные библиотеки и секвенированы с использованием Miseq (Illumina). После оценки качества данных и тримминга геномы собирали либо *denovo* (при достаточно высоком покрытии), либо методом картирования данных с опубликованными эталонными геномами ВКЭ (при низком покрытии). Для дальнейшего анализа использовали полногеномные последовательности ВКЭ из базы данных GenBank, соответствующие различным субтипам и генетическим линиям вируса.

*Результаты.* Анализ определенных полногеномных последовательностей штаммов ВКЭ, выделенных в различных регионах Западной Сибири, выявил преимущественно штаммы ВКЭ-Сиб с единичными находками ВКЭ дальневосточного субтипа в Республике Алтай и Новосибирской области, и европейского субтипа в Омской области. Линия Заусаев оказалась наиболее представленной среди исследованных штаммов, а линия Васильченко была обнаружена в меньшем количестве, что коррелирует с нашими предыдущими данными. Также, штаммы Балтийской линии были обнаружены и охарактеризованы в Новосибирской и Омской областях, а также впервые в Казахстане. Представители ранее описанной Обской линии, которая, как было показано, наиболее генетически отличается от других линий ВКЭ-Сиб, на указанных территориях не были обнаружены. Анализ хронограммы показал, что в пределах ВКЭ-Сиб от общего предка наиболее ранее отделилась Обская линия, затем произошло отделение Боснийской линии, затем Балтийской, а линии Заусаев и Васильченко разделились совсем недавно.

*Благодарности:* Исследование проведено в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030) и финансируется в рамках проекта повышения качества (QualityImprovement) № 65238411 компании Пфайзер (Pfizer) «Оптимизация методов массового полногеномного секвенирования штаммов вируса клещевого энцефалита».

### **Список литературы:**

1. Dai X. et al. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 74. doi: 10.1038/s41426-018-0081-6.
2. Demina T.V. et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *J. Med. Virol.* 2010; 82(6): 965–976. doi: 10.1002/jmv.
3. Dobler G. et al. (Eds.). *The TBE Book. 4th ed.* Singapore: Global Health Press; 2021. 386 p.
4. Tkachev S.E. et al. New genetic lineage within the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus found in Western Siberia, Russia. *Infection, Genetics and Evolution.* 2017; 56: 36–43. doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.020
5. Tkachev S.E. et al. Genetic diversity and geographical distribution of the Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(2):101327. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101327.4
6. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses.* In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* 2012. Elsevier Academic Press, San Diego.

## **НОВЫЙ ПОДХОД ПОДГОТОВКИ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАТ *Mycobacterium bovis***

Третьякова А.Б.<sup>1</sup>, Валеева А.Р.<sup>2</sup>, Хаертынов К.С.<sup>2</sup>, Мукминов М.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> - Институт экологии и природопользования, Казанский

(Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация

<sup>2</sup> - Казанская государственная медицинская академия – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Казань, Российская Федерация  
annatretyackowa@yandex.ru

**Ключевые слова:** *Mycobacterium bovis*, антигены, липополисахариды, хроматография, электрофорез

**Аннотация.** Целью исследования стало получение потенциальных антигенов *Mycobacterium bovis* с использованием метода предварительной обработки материала для гель-фильтрационной хроматографии, основанного на денатурации и добавлении хаотропных реагентов. В результате проведения гель-фильтрационной хроматографии супернатанта, механически разрушенных клеток *M.bovis* Bovinus-8 штамм 700201, было получено 38 фракций. Был проведен

электрофорез в 12,5 % полиакриламидном геле с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану для определения зон серологической активности в реакции иммуноблот. Особый интерес представляли фракции с 4 по 7 и с 8 по 11. Данные фракции содержали липополисахариды с зонами серологической активности, соответствующими молекулярной массе 40 и 10 кДа.

## **A NOVEL APPROACH TO THE PREPARATION OF MATERIAL FOR OBTAINING ANTIGENIC DETERMINANTS OF *MYCOBACTERIUM BOVIS***

**Key words:** *Mycobacterium bovis*, antigen, lipopolysaccharides, chromatography, electrophoresis.

**Abstract.** The objective research was to preparation of potential *Mycobacterium bovis* antigens with using the method of preliminary of the material for gel-filtration chromatography based on denaturation and addition of chaotropic reagents. As a result of gel-filtration chromatography of the supernatant, mechanically destroyed cells of the *M.bovis* Bovinus-8 strain 700201, 38 fractions were obtained. Electrophoresis was performed in 12,5% polyacrylamide gel with followed by transfer to a nitrocellulose membrane to determine zones of serological activity in the Western blot assay. Fractions from 4 to 7 and from 8 to 11 were of particular interest. These fractions contained lipopolysaccharides with serological activity zones corresponding to molecular weights of 40 and 10 kDa.

**Введение.** *Mycobacterium bovis* вызывает туберкулез у крупного рогатого скота и широкого круга млекопитающих, включая человека. Особенно высок риск заболевания среди лиц инфицированных ВИЧ [1]. Структурные компоненты клетки и продукты экспрессии микобактерий содержат специфичные антигенные детерминанты, которые могут использоваться в диагностических и терапевтических целях. Для получения специфических антигенов используется широкий круг методических подходов, в частности методы гель-фильтрационной хроматографии [2]. Часто при получении антигенов исследователи сталкиваются с проблемой дальнейшей очистки материала после проведения хроматографии [3]. В настоящее время существует необходимость разработки новых подходов поиска и выделения биологических маркеров *M.bovis*. В данном исследовании описан метод получения потенциально значимых антигенных детерминант *M.bovis*, основанный на предварительной обработке фракционируемого материала хаотропными реагентами.

**Цель исследования:** получение потенциальных антигенов *M.bovis* с использованием метода предварительной обработки материала для гель-фильтрационной хроматографии, основанного на денатурации и добавления хаотропных реагентов.

**Материалы и методы.** В эксперименте использовали 30 дневную культуру *M.bovis* Bovinus-8 штамм 700201 выращенную на синтетической питательной среде Soton. Клетки отмывали и разрушали на гомогенизаторе Fast Prep 24 с

использованием пробирок LysingMatrix В. Получившийся материал центрифугировали 45 минут при 4500 g. К осадку добавляли додецилсульфат натрия (SDS) и  $\beta$ -меркаптоэтанол, в процентном содержании 1,6 % и 4 % соответственно, а затем кипятили в течение 35 минут и охлаждали до комнатной температуры. Далее материал центрифугировали при 12000 g, 11 минут. Гель-фильтрационную хроматографию проводили на матрице Sephadex® G-200 superfine. Фракционированный материал анализировали электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле [4]. Для определения белковых и липополисахаридных компонентов гели окрашивали Coomassie blue G-250 и азотнокислым серебром [5]. Серологическую активность определяли в реакции иммуноблот с использованием гипериммунных сывороток крови кроликов. Результаты документировали и обрабатывали с использованием Gel Doc XR и программы Image Lab Software 5.1.

**Результаты.** В результате проведения гель-фильтрационной хроматографии супернатанта, механически разрушенных клеток *M.bovis* с добавлением денатурирующих хаотропных реагентов было получено 38 фракций. Материал элюировался четырьмя пиками.

Для выявления зон серологической активности полученного материала был проведен электрофорез в 12,5 % полиакриламидном геле с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану для проведения иммуноблота. Серологическая активность отмечалась со 2 по 13 фракцию. Согласно локализации зон серологической активности, были объединены со 2 по 3, с 4 по 7, с 8 по 11, с 12 по 13 фракцию.

Для объединённых фракций был проведен электрофорез с последующим окрашиванием на белки и липополисахариды. При окрашивании гелей на белки Coomassie blue G-250 после электрофореза в полиакриламидном геле объединённых фракций шла слабая реакция. По результатам окрашивания азотнокислым серебром с 4 по 7 фракции содержали липополисахариды с зонами серологической активности соответствующей молекулярной массе 40 кДа, а с 8 по 11 - 10 кДа.

Денатурация с помощью нагревания, добавление анионного (солюбилизатора) поверхностно-активного вещества SDS и восстанавливающего агента  $\beta$ -меркаптоэтанола позволила получить материал в более дискретной форме и упростить выделение биологических маркеров специфичных возбудителю *M.bovis*.

### **Литература:**

1. Bell L.C.K., Noursadeghi M. Pathogenesis of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis co-infection / *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – V. 16 – P. 80-90.
2. Khosrobeygi M., Mosavari N., Salehi M., Mojjani N., Akbari M. Isolation and Purification of Low Molecular Weight Proteins from Culture Filtrate of Mycobacterium Tuberculosis Strain C / *Arch Razi Inst.* – 2021. – V. 76(2) – P. 273-281.
3. Zhao M., Vandersluis M., Stout J., Haupts U., Sanders M., Jacquemart R. Affinity chromatography for vaccines manufacturing: Finally ready for prime time / *Vaccine*. – 2019. – V. 37 – P. 5491-5503.



4. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications / Proc. Natl. Acad. Sci. – 1979. – V. 76(9) – P. 4350-4354.

5. Tsai C.-M., Frasch C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels / Analytical Biochemistry. – 1982. – V. 119 (1) – P. 115-119.

## ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ АНТИМИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

М. С. Федорова, А. В. Миронова, Е. Ю. Тризна, А. Р. Каюмов  
Казанский (Приволжский) Федеральный Университет,  
ул. Кремлёвская 18, г. Казань, 420008, РФ.  
MaSFedorova97@mail.ru

**Ключевые слова:** биопленки, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, метаболиты.

В настоящее время быстрое распространение антибиотикорезистентности у патогенных бактерий, опасных для человека, является главной причиной роста заболеваний, таких, как пневмония, внутрибольничные инфекции и т. д. [Rompiio A. *et al.*, 2021]. Образование ими биопленок на медицинских устройствах и инфицирование пациентов с хроническими ранами также представляет серьезную проблему во всём мире [DumaruR. *etal.*, 2019; Mulcahy L. R. *etal.*, 2014]. Поскольку бактерии в составе биопленки мало восприимчивы к противомикробным препаратам из-за множественных механизмов толерантности, поиск новых антибактериальных агентов является актуальной задачей [Olivares E. *et al.*, 2020; Stewart P. S., Costerton J. W., 2001]. На сегодняшний день возможной альтернативой антибиотикам являются бактериоцины, исследования которых могут помочь в разработке новых противомикробных препаратов [Newstead L. L. *et al.*, 2020].

Целью данной работы было подобрать оптимальные условия для выделения фракции метаболитов *Staphylococcus aureus*, обладающей наибольшей антибактериальной активностью в отношении клеток *P. aeruginosa*.

Зачастую грам-положительные бактерии секретируют антибактериальные пептиды, и поскольку добавление культуральной жидкости (КЖ) *S. aureus* приводило к гибели клеток *P. aeruginosa*, подбирали оптимальные условия pH и температур для их выделения. Инкубация суточной культуры *S. aureus* в течение 60 минут в условиях повышенных температур (60°) снижала антимикробное действие КЖ по сравнению с инкубацией в н.у. (37°), а закисление (pH3) среды повышало антимикробную активность КЖ. Для более точного извлечения целевых метаболитов проводили ступенчатую твердофазную экстракцию (ТФЭ) полученных проб с дальнейшей лиофильной сушкой. В результате наибольшая антимикробная активность наблюдалась во фракциях после ТФЭ. Поскольку бактериоцины способны сорбироваться к поверхности клеток, параллельно

проводили их отмывку с клеток *S. aureus* в глициновом буфере (25мМ рН 2.5). В данном случае наблюдалось снижение антибактериальных свойств. Дополнительно оценивали размерный диапазон пептидов с помощью ультрафильтрации проб на PES-мембранах с отсечкой 3 и 10 кДа. Нами предполагается, что метаболиты находятся в диапазоне до 3 кДа. Таким образом, оптимальный протокол для выделения фракции метаболитов с наибольшей антибактериальной активностью включает этапы: 1) инкубация суточной культуры *S. aureus* при температуре 37° в течение 60 минут в кислых условиях (рН3) среды; 2) ступенчатая твердофазная экстракция культуральной жидкости *S. aureus* с дальнейшей лиофильной сушкой.

### **Список использованных источников**

1. Dumaru R., Baral R., Shrestha L. B. Study of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of gram-negative Bacilli among the clinical isolates at BPKIHS, Dharan //BMC Research Notes. – 2019. – Т. 12. – №. 1. – С. 1-6.
2. Mulcahy L. R., Isabella V. M., Lewis K. Pseudomonas aeruginosa biofilms in disease // Microbial ecology. – 2014. – Т. 68. – №. 1. – С. 1-12.
3. Newstead L. L. et al. Staphylococcal-produced bacteriocins and antimicrobial peptides: Their potential as alternative treatments for Staphylococcus aureus infections //Antibiotics. – 2020. – Т. 9. – №. 2. – С. 40.
4. Olivares E. et al. Clinical impact of antibiotics for the treatment of Pseudomonas aeruginosa biofilm infections //Frontiers in microbiology. – 2020. – Т. 10. – С. 2894.
5. Pompilio A. et al. Gram-negative bacteria holding together in a biofilm: the Acinetobacter baumannii way //Microorganisms. – 2021. – Т. 9. – №. 7. – С. 1353.
6. Stewart P. S., Costerton J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms //The lancet. – 2001. – Т. 358. – №. 9276. – С. 135-138.

## **THE ROLE OF NLRP3 IN TAMOXIFEN INSENSITIVITY IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER**

HamzaS.<sup>1</sup>, TezcanG.<sup>2</sup>, GaraninaE.<sup>1</sup>, AlsaadiM.<sup>1</sup>, Rizvanov A.<sup>1</sup> and KhaiboullinaS.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan Federal University, Kazan, Russia.

<sup>2</sup>Department of Fundamental Sciences, Faculty of Dentistry, Bursa Uludag University, Bursa, Turkey.  
shaimaa.hamza@mail.ru

**Background:** Inflammation is involved in breast cancer development (1). Although tamoxifen is widely used in breast cancer chemotherapy, 90–95% of triple-negative breast cancers cases are tamoxifen insensitive (2). One of the central mechanisms contributing to inflammation is mediated by the NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome, a cytoplasmic protein complex (3, 4). However, NLRP3 was shown to have a two-sided role in tumor progression by leading to tumor cell death and relapse due to the secretion of pro-inflammatory cytokines (5). Therefore, how tamoxifen insensitivity affects NLRP3 and its impact on triple-negative breast cancer progression remains largely unknown.

**The aim of the study:** We aimed to investigate the potential role of tamoxifen on NLRP3 mediated triple-negative breast cancer progression in-vitro.

**Materials and methods:** A triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) cell line was treated with lipopolysaccharide (LPS) to prime NLRP3 activation. Cells were then treated with tamoxifen. NLRP3 activation was analyzed by; immune blotting of NLRP3 protein and Gasdermin D (GSDMD) cleavage. ELISA evaluated IL-1 $\beta$  secretion. The effect of tamoxifen on cell viability and progression was determined by Annexin V and sphere formation assays. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's analyses and Kruskal-Wallis's one-way analysis of variance.

**Results:** Combined LPS-Tamoxifen treatment increased NLRP3 protein synthesis and cleavage of GSDMD and IL-1 $\beta$  secretion compared to untreated MDA-MB-231 cells ( $p < 0.05$ ). Although LPS-Tamoxifen decreased the cell viability and the sphere size for the first 24h compared to untreated cells, the spheres recovered in their size in 72 hours ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Our data suggest that NLRP3 overexpression is one of the mechanisms of tamoxifen insensitivity in MDA-MB-231 cells. Research to investigate the effect of co-treatment with NLRP3 inhibitors and tamoxifen on triple-negative breast cancer progression could promise an increase in chemotherapy response of these patients. **Keywords:** cancer, NLRP3, inflammasome, tamoxifen, breast cancer.

### **References:**

1. Fouad T.M., Kogawa T., Reuben J.M., Ueno N.T. *The role of inflammation in inflammatory breast cancer.* *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014;816:53-73. doi: 10.1007/978-3-0348-0837-8\_3. PMID: 24818719.
  2. Manna S., Holz M.K. *Tamoxifen Action in ER-Negative Breast Cancer.* *Sign Transduct Insights.* 2016;5:1-7. doi:10.4137/STI.S29901.
  3. Liston A., Masters S.L. *Homeostasis-altering molecular processes as mechanisms of inflammasome activation.* *Nat Rev Immunol.* (2017) 17:208– 14. doi: 10.1038/nri.2016.151.
  4. Menu P., Vince J.E. *The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly.* *Clin. Exp. Immunol.* (2011) 166:1– 5. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04440.x
  5. Hamarshah S, Zeiser R. *NLRP3 Inflammasome Activation in Cancer: A Double-Edged Sword.* *Front Immunol.* 2020;11:1444. Published 2020 Jul 8. doi:10.3389/fimmu.2020.01444
- The study was supported by Russian Science Foundation grant № 21-74-00048.*

# DEMONSTRATING SARS-COV-2 S PROTEIN EPITOPES INVOLVED IN THE INDUCTION OF AN IMMUNE RESPONSE

*HamzaS.<sup>1</sup>, MartynovaE.<sup>1</sup>, GaraninaE.<sup>1</sup>, MarkelovaM.<sup>1</sup>,  
ShakirovaV.<sup>2</sup>, RizvanovA.<sup>1</sup>, KhaiboullinaS.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Kazan Federal University, Kazan, Russia,*

<sup>2</sup> *Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia,  
Shaimaa.hamza@mail.ru*

**Background:** SputnikV is a vaccine against SARS-CoV-2 developed by the Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology (GRCEM) (1). Recent studies showed that both humoral and cellular responses were induced by the vaccine but the mechanisms is largely unknown (2). Additionally, among all antibodies, those recognizing the S protein are the most important in preventing a severe form of COVID-19 (3). Therefore, analyzing the immune response to SARS-CoV-2 S protein peptides in vaccinated and convalescent COVID-19 sera need to be investigated.

**The aim of study:** demonstrate the location of immunogenic domains of the SARS-CoV-2 S protein using an overlapping peptide library. Thus, by targeting multiple regions, antibodies in immunized individuals can potentially interfere with the most important events in virus replication: entry to the target cell.

**Materials and methods:** Serum samples were collected from 40 vaccinated people and 40 convalescent COVID-19 patients. We studied the immune response to SARS-CoV-2 S protein peptides by ELISA coated with overlapping COVID peptide library. Statistical analysis was performed in the R environment. Statistically significant differences between comparison groups were accepted as  $p < 0.05$ , assessed by the Kruskal-Wallis test with Benjamini-Hochberg adjustment for multiple comparisons.

**Results:** We have found antibodies from both vaccinated and convalescent sera bind to immunogenic regions located in multiple domains of SARS-CoV-2 S protein, including Receptor Binding Domain (RBD), N-terminal Domain (NTD), Fusion Protein (FP) and Heptad Repeats (HRs). Sixteen peptides were found in S1, and fourteen peptides were in S2 domains. These regions could be grouped as aa 137–309, 341–471, 579–812 and 1084–1188. Interestingly, many peptides were recognized by immunized and convalescent serum antibodies and correspond to conserved regions in circulating variants of SARS-CoV-2.

**Conclusion:** These data suggest that SputnikV vaccine induces a humoral immune response similar to that occurring naturally after infection which could explain the protective efficacy of SputnikV vaccine. We believe that selection of epitopes similar to those in naturally infected and recovered individuals is the mechanism of SputnikV protection against COVID-19.

**Keywords:** Covid-19, SputnikV, S-protein, peptides library, immune response.

## References:

1. Logunov D.Y.; Dolzhikova, L.V.; Shcheblyakov, D.V.; Tukhvatulin, A.I.; Zubkova, O.V.; Dzharullaeva, A.S.; Kovyrshina, K.V.; Nadezhda, L.L.; Grousova, D.M.; Erokhova, A.S. Safety and efficacy of a rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: An interim analysis of a randomized controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet* 2021, 397, 671–681.
2. Ni L., Ye, F., Cheng, M.L., Feng, Y., Deng, Y.Q., Zhao, H., Dong, C. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity* 2020, 52, 971–977.r973.
3. Dispinseri S., Secchi M., Pirillo M.F., Tolazzi M., Borghi M., Brigatti C., De Angelis M.L., Baratella M., Bazzigaluppi E., Venturi, G. et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in symptomatic COVID-19 is persistent and critical for survival. *Nat. Commun.* 2021, 12, 2670.

## DEVELOPMENT OF A HIGHLY POTENT MODULATOR OF STING AS A NEW LUPUS THERAPEUTIC

Anna Kharitonova<sup>1</sup>, Rainer Metcalf<sup>1</sup>, Robert Sparks<sup>4,5</sup>, William Lawless<sup>1</sup>,  
Kenyon Daniel<sup>1</sup>, Wesley Brooks<sup>1</sup>, Niketa Patel<sup>2,3</sup>, Wayne Guida<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, University of South Florida, Tampa, FL, USA

<sup>2</sup> Department of Molecular Medicine, University of South Florida Morsani College of Medicine, Tampa, FL, USA

<sup>3</sup> James A. Haley Veterans Hospital, Tampa, FL, USA

<sup>4</sup> Gastrointestinal Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

<sup>5</sup> Harvard Medical School, Boston, MA, USA

kharitonova@usf.edu

Over the last 25 years, there has been noted a steady rise in prevalence of antinuclear antibodies, a common hallmark of autoimmunity.<sup>1</sup> Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that affects anywhere from 20 to 150 individuals per 100,000 people in the United States.<sup>2-5</sup> Despite all efforts, there has been only two entries on the SLE drug market in over than 60 years.<sup>6</sup> As of recent, nucleic acid sensors raised special attention among all the potential candidates driving SLE pathogenesis.<sup>7</sup> In mammalian cells, detection of cytosolic DNA is largely through cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) that functions upstream of stimulator of interferon genes (STING) protein. Activation of the cGAS-STING pathway results in induction of an innate arm of the immune system.<sup>8</sup>

To identify a small molecule that can manipulate STING activity, we employed computational modeling using MD equilibrated crystal structures for human STING and generated optimal protein conformations for diverse chemical library screening. A novel low-molecular-weight organic molecule, not based on a cyclic dinucleotide structure, IBX-0001, was found. SPR showed binding activity of IBX-0001 with a  $K_D$  of  $430 \pm 140$  nM, supporting a computationally derived  $K_D$  of 627 nM.

However, further in vitro studies demonstrated the inhibitory effect of IBX-0001 in the sub-picomolar range, making simple competition with 2,3-cGAMP, a native ligand of STING, unlikely (2,3-cGAMP  $K_D$  of 1.4 nM). Using western blot analyses,

PCR and immunofluorescence methods we demonstrated a significant decrease in activation of the cGAS-STING pathway in HEK293 cells treated with IBX-0001 prior to 2,3-cGAMP. IBX-0001 has also been tested in an in vivo murine model. This extreme inhibitory effect of IBX-0001, seen at a billion times lower concentration than the target protein, would imply some form of inhibitory mechanism not identified previously. Future research is to characterize this inhibitory mechanism and to demonstrate potential application of IBX-0001 for SLE treatment.

**Key words:** STING, autoimmunity, drug discovery, SLE.

### **References:**

1. Vargas-Parada, L. *Research Round-up: Autoimmune Disease. Nature* 2021, 595 (7867), S46–S47. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01834-x>.
2. *Prevalence of Adult Systemic Lupus Erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: Estimates Using Hospitalization Data* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2530907/> (accessed 2021 -11 -04).
3. Pons-Estel, G. J.; Alarcón, G. S.; Scofield, L.; Reinlib, L.; Cooper, G. S. *Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. Semin Arthritis Rheum* 2010, 39 (4), 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.10.007>.
4. Izmirly, P. M.; Parton, H.; Wang, L.; McCune, W. J.; Lim, S. S.; Drenkard, C.; Ferucci, E. D.; Dall’Era, M.; Gordon, C.; Helmick, C. G.; Somers, E. C. *Prevalence of Systemic Lupus Erythematosus in the United States: Estimates From a Meta-Analysis of the Centers for Disease Control and Prevention National Lupus Registries. Arthritis Rheumatol* 2021, 73 (6), 991–996. <https://doi.org/10.1002/art.41632>.
5. Stojan, G.; Petri, M. *Epidemiology of Systemic Lupus Erythematosus: An Update. Curr Opin Rheumatol* 2018, 30 (2), 144–150. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000480>.
6. Commissioner, O. of the. *Lupus Therapies Continue to Evolve. FDA* 2021.
7. Theofilopoulos, A. N.; Kono, D. H.; Beutler, B.; Baccala, R. *Intracellular Nucleic Acid Sensors and Autoimmunity. J Interferon Cytokine Res* 2011, 31 (12), 867–886. <https://doi.org/10.1089/jir.2011.0092>.
8. Ablasser, A.; Chen, Z. J. *CGAS in Action: Expanding Roles in Immunity and Inflammation. Science* 2019, 363 (6431), eaat8657. <https://doi.org/10.1126/science.aat8657>.

## **МАРКЕРЫ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ НЕЙРОИНФЕКЦИЙ У ДЕТЕЙ**

*Шеметов А.В.*

НГИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России  
avshemetov@mail.ru

### **Аннотация**

**Цель:** Выявление современных методов лабораторной диагностики, позволяющих дифференцировать вирусные и бактериальные нейроинфекционные заболевания у детей и начать наиболее раннюю этиотропную терапию.

**Пациенты и методы:** Исследовано 146 случаев лечения детей в возрасте от 1 месяца до 17 лет, находившихся в ГБУЗ КДКБ им. проф. Ю. Е. Малаховского г. Новокузнецка, с воспалительными заболеваниями центральной нервной системы. Всем пациентам при поступлении проведены следующие лабораторные исследования: клинический анализ крови; диагностическая люмбальная пункция (ЛП); контроль уровня маркера бактериального воспаления – прокальцитонина (ПКТ) и С-реактивного белка.

**Результаты и заключения:** Использование многоуровневой системы контроля гуморальной активности, а также специфических маркеров бактериального воспаления позволяет в ранние сроки дифференцировать бактериальный, туберкулезный, вирусный менингиты, острые вирусные энцефалиты и значительно сократить количество неоправданного назначения (в случаях вирусной этиологии), либо длительность использования антибактериальной терапии.

**Ключевые слова:** менингит, энцефалит, прокальцитонин, маркеры бактериального воспаления.

#### **Annotation**

**Objective:** To identify modern methods of laboratory diagnostics that allow differentiating viral and bacterial neuroinfectious diseases in children and to begin the earliest etiotropic therapy.

**Patients and methods:** 146 cases of treatment of children aged from 1 month to 17 years, who were in the GBUZ KDKB named after Prof. Yu. E. Malakhovsky, Novokuznetsk, with inflammatory diseases of the central nervous system, were studied. All patients received the following laboratory tests: clinical blood analysis; diagnostic lumbar puncture (LP); monitoring of the level of a marker of bacterial inflammation - procalcitonin (PCT) and C-reactive protein.

**Results and conclusions:** The use of a multi-level system for monitoring humoral activity, as well as specific markers of bacterial inflammation, makes it possible to differentiate bacterial, tuberculosis, viral meningitis, acute viral encephalitis in an early period and significantly reduce the number of unjustified prescriptions (in cases of viral etiology), or the duration of use of antibacterial therapy.

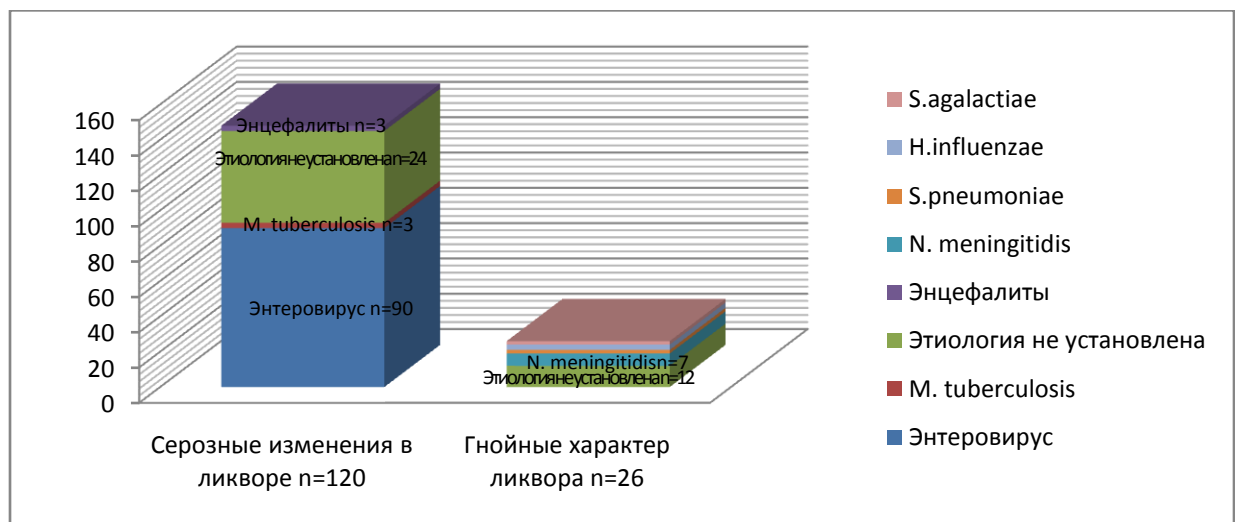
**Key words:** meningitis, encephalitis, procalcitonin, markers of bacterial inflammation.

#### **Введение**

Проблемы дифференциальной диагностики нейроинфекций (НФ) остаются актуальными, несмотря на значительное развитие лабораторно-диагностических возможностей в различных стационарах. Данная группа заболеваний составляют шестую часть причин обращения за первичной медицинской помощью по всему миру. НФ могут приводить к высокой смертности, вызывать тяжелые осложнения вплоть до инвалидизации и это становится тяжелым экономическим бременем для отдельных лиц, семей и системы здравоохранения [1;4;5]

Достоверных статистических данных по инфекционным заболеваниям центральной нервной системы у детей в РФ нам найти не удалось, однако по некоторым данным они составляют около 3% из общего числа инфекционной патологии [1].

Наш собственный опыт (2013-2015гг) показывает что общее число вирусных НФ составило 80%(n=117), из них энтеровирусным менингитом представлены 77% (n=90), энцефалитами около 2%(n=3), бактериальные гнойные менингиты составляют почти 18% (n=26), туберкулезный менингит 2%(n=3). В 20% случаев НФ с серозным характером (n=120) и в 46,1% с гнойным характером (n=26) изменений в спинномозговой жидкости (СМЖ), этиология так и не была выяснена. (Диаграмма №1)



Бактериологические посевы могут быть отрицательны в случае использования АБТ (цефалоспоринов третьего поколения) до забора СМЖ и санация ликвора наступает для N. meningitidis в течение 2 часов, а Str. pneumoniae после 4 часов лечения.[6]. Культуральные методы могут занимать до 3 суток.

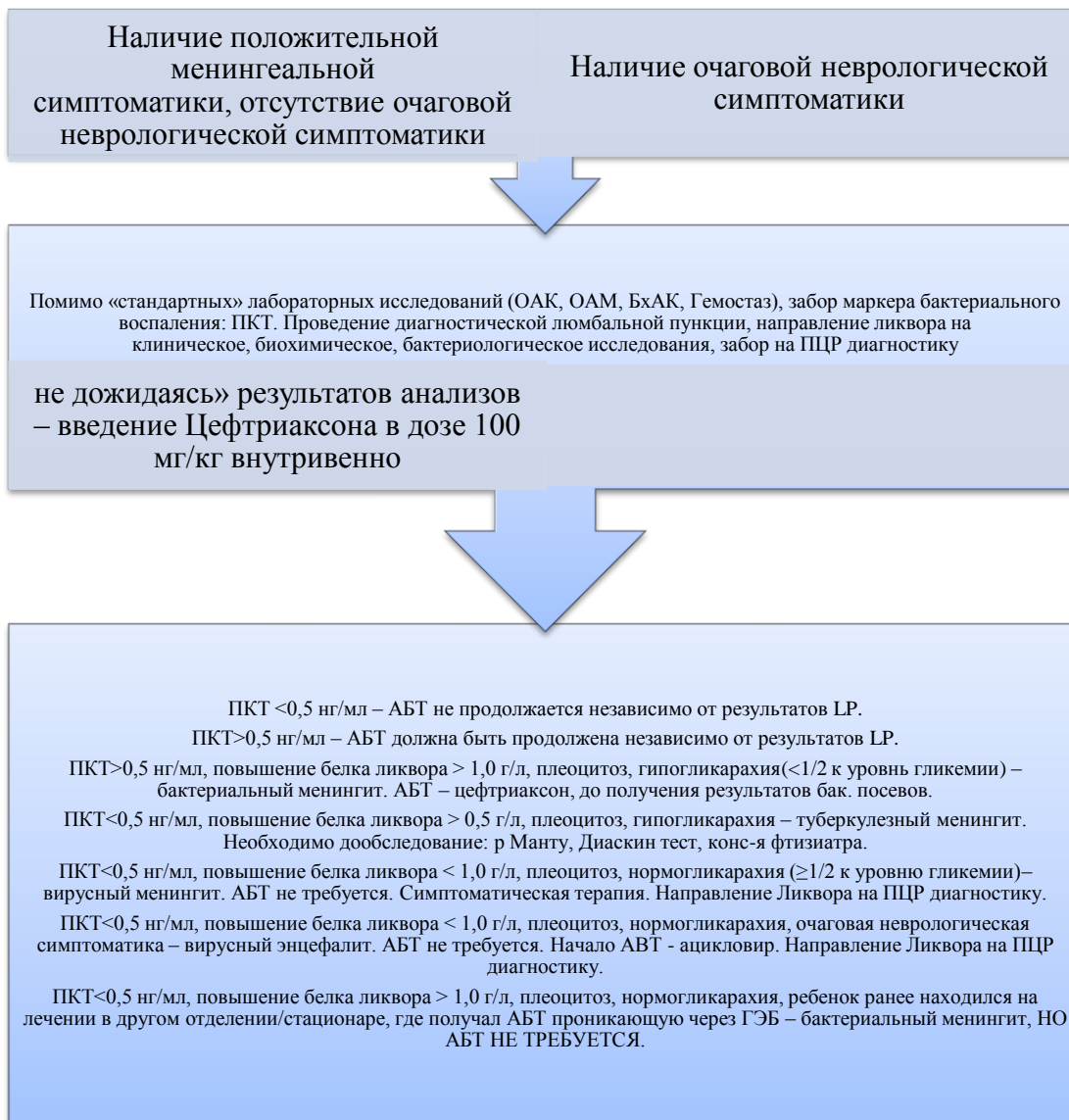
По данным ФГБУ НИИ Детских Инфекций ФМБА России, при бактериальном гнойном менингите в 1 сутки заболевания удалось установить этиологию в 65,7% (ПЦР исследование ЦСЖ), а при вирусных НФ лишь в 3,8% случаев. [2]Бактериоскопия, с окраской СМЖ по Граму, позволяет определить наличие бактерий при их содержании выше  $1 \cdot 10^3$ /мл, положительна примерно у 90% детей с пневмококковым менингитом и 80% с менингококковым менингитом [5].

Определение этиологии заболевания в случае НФ имеет одно из важнейших значений для начала адекватной этиотропной и патогенетической терапии, при этом наиболее важны первые часы поступления пациента в стационар.



## Материалы и методы

На основании данных, полученных в ходе проведения исследования на базе нашей клиники [3], а также опыта иностранных авторов [5], был разработан следующий алгоритм диагностики и лечения:



Исследуемый параметр	ПКТ < 0,5 нг/мл АБТ не продолжается независимо от результатов LP.				ПКТ >0,5 нг/мл АБТ должна быть продолжена независимо от результатов LP.
	белок ликвора				белок ликвора
	> 1,0 г/л	> 0,5 г/л	< 1,0 г/л		> 1,0 г/л
Плеоцитоз	↑	↑	↑	↑	↑
Гликаралия*	N	↓	N	N	↓
Очаговая неврологическая симптоматика	-	-	-	+	-
Диагноз	бактериальный менингит	туберкулезный менингит	вирусный менингит	вирусный энцефалит	бактериальный менингит
Примечания	Ребенок ранее находился на лечении в другом отделении/стационаре, где получал АБТ проникающую через ГЭБ	Необходимо дообследование: р Манту, Диаскин тест, конс-я фтизиатра	Симптоматическая терапия. ПЦР диагностика ликвора.	Начало АБТ - ацикловир. ПЦР диагностика ликвора..	АБТ – цефтриаксон до получения результатов бак. посевов
*нормогликаралия ( $\geq 1/2$ к уровню гликемии)					

Было проанализировано 146 историй болезней пациентов в возрасте 1 месяц – 17 лет, госпитализированных в ГБУЗ КДКБ им. проф. Ю. Е. Малаховского г. Новокузнецка в период 2013-2015гг., с воспалительными заболеваниями ЦНС, в программу диагностики и лечения которых, был включен данный алгоритм.

Всем пациентам при поступлении были проведены: клинический анализ крови; диагностическая люмбальная пункция (с проведением бактериоскопического, бактериологического, биохимического и клинического анализов СМЖ); контроль уровня маркера бактериального воспаления – ПКТ производился иммунохроматографическим полуколичественным экспресс тестом BRAHMS PCT-Q, либо количественным BRAHMS PCT LIA. Подтверждение диагноза энтеровирусного менингита, клещевого энцефалита получено методом ПЦР ликвора. Бактериальная этиология менингита документировалась культуральными исследованиями и характерными изменениями плеоцитоза. Диагностика ТБС менингита проводилась совокупностью методов: бактериологическим, ПЦР, ИФА, окраска на КУМ, диаскин тест, а также исключением прочих этиологических факторов. Результаты наблюдений статистически обработаны с использованием программ MicrosoftOfficeExcel 2007, SPSS® v.17.0, математическая обработка выполнялась по стандартным статистическим алгоритмам.

## Результаты и обсуждение

При использовании в алгоритме исключительно данных Плеоцитоза, Глюкозы и Белка в СМЖ [5], не исключены ошибочные выводы при диагностике. (Табл. 1)

	Туберкулезный менингит	Бактериальный менингит	Серозный менингит	Острый вирусный энцефалит
Белок, г/л	0,615 - 1,48	0,25 - 3,8	0,097 - 2,15	0,415 - 0,678
Цитоз, в мкл	40 - 525	1 - 8533	1 - 1493	19 - 218
Глюкоза СМЖ, ммоль/л	0,7 - 1,1	0 - 4,3	0,7 - 7,3	1,8 - 3,4

Так, например, в одном случае у больного с подтвержденным культуральным методом Менингококковым менингитом, Белок СМЖ составил 0,25 г/л, Цитоз 1 в мкл, а гликарахия 3,2 ммоль/л, при гликемии 5,0 ммоль/л, однако ПКТ при этом >10 нг/мл. У пациента с энтеровирусным менингитом, подтвержденным методом ПЦР диагностики ликвора, белок 1,15 г/л, плеоцитоз 1493 в мкл (Нейтрофилы 93%), гликарахия 3 ммоль/л, пригликемии 4,7 ммоль/л, а уровень ПКТ <0,5 нг/мл.

У двоих больных ситуация была противоположна, ранее они находились на лечении в стационаре 3 и 5 суток, получая соответственно в терапии цефотаксим и меропенем, Белок СМЖ у них составил 0,6-0,7 г/л, Цитоз 85-460 в мкл, а гликарахия 2,2-2,4 ммоль/л, при гликемии 3,0-4,5 ммоль/л, а уровень ПКТ при этом <0,5 нг/мл.

Из общего числа больных, при поступлении исследование ПКТ экспресс методом произведено в 66,2% случаях, количественным методом измерено 33,8% случаев. Уровень ПКТ > 0,5 нг/мл был выявлен в 16,9% случаев.

В группе с уровнем ПКТ в пределах нормы (Табл. 2):

	Возраст, в годах	Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	СОЭ, мм в час	Гликарахия, ммоль/л	Белок, г/л	Цитоз, в мкл	Общее КД, дней	АБТ, дней
Среднее	6,39	13,82	8,53	3,42	0,48	118,43	12,25	2,32
Медиана	6,00	13,30	6,00	3,40	0,40	60,00	12,00	1,00

В группе с повышенным уровнем ПКТ (Табл. 3):

	Возраст, в годах	Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	СОЭ, мм в час	Гликарахия, ммоль/л	Белок, г/л	Цитоз, в мкл	Общее КД, дней	АБТ, дней
Среднее	2,43	16,74	23,42	1,92	1,95	2004,8	14,23	10,23
Медиана	1,00	15,25	21,50	2,00	2,14	1285,0	14,00	10,50

Таким образом, в группе с ПКТ >0,5 нг/мл определяется четкая тенденция к повышению общего уровня гуморальной активности (лейкоцитоза, СОЭ), белка и плеоцитоза СМЖ и снижение гликарахии, кратное удлинение АБТ.

В группе ПКТ<0,5 нг/мл длительность АБТ составила М = 2,32 (Ме=1,0) дней, в 20,5%(n=23) случаев не проводилась вовсе, в 42,9%(n=48), была ограничена однократным введением цефтриаксона.

### **Выводы**

1. Использование в комплексном обследовании НФ специфических маркеров бактериального воспаления позволяет:

- значительно ограничить круг дифференциальной диагностики, упрощая тем самым верификацию этиологического фактора, уже в первые часы от поступления пациента.

- ускорить начало специфической этиотропной терапии.

- ограничить кратность и длительность назначения АБТ.

2. Высокий уровень ПКТ у больных с НФ, при поступлении в стационар, является предиктором более тяжелого течения заболевания с удлинением длительности лечения (КД) и применения АБТ.

### **Список литературы**

1. Скрипченко Н.В., Иванова М.В. и др. Возможности нейрометаболической терапии при нейроинфекциях у детей. Бюллетень медицинских Интернет- конференций 2012. Том 2. №9.

2. Мазаева Е.М., Алексеева Л.А., Скрипченко Н.В., Бессонова Т.В. Лабораторные возможности дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных нейроинфекций у детей. Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения/Выпуск № 2, том 8, 2013. 605-607.

3. Манеров Ф.К., Андриянова О.И., Шеметов А.В., Дронов И.А., Котович М.М., Глушков А.В., Шейн С.Н. Роль прокальцитонина и С-реактивного белка в алгоритме диагностики природы менингитов у детей. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. Номер № 2, 2016. 56-59.

4. *Neurological disorders: public health challenges. World Health Organization. 2006. 95-111.*

5. Kwang Sik Kim. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infectious Diseases* 2010; 10: 32–42

6. Kanegaye J.T., Soliemanzadeh P., Bradley J.S. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. *Pediatrics* 2001; 108: 1169–74.

**СБОРНИК ТРУДОВ**  
**VIII Международной научно-практической конференции**  
**«НОВЫЕ КОНЦЕПЦИИ МЕХАНИЗМОВ ВОСПАЛЕНИЯ,**  
**АУТОИММУНИТЕТА И ИНФЕКЦИЙ»**  
**Казань, Татарстан**  
**31 мая 2022 г.**

**The VIIIth International Meeting**  
**"NEW CONCEPTS ON THE MECHANISMS**  
**OF INFLAMMATION, AUTOIMMUNITY AND INFECTION”**  
**Kazan, Tatarstan, Russia**  
**May, 31, 2022**

Авторская корректура  
Компьютерная верстка: Г.М. Ахмедова  
Технический редактор: к.м.н. Г.М. Ахмедова

Отпечатано в полном соответствии с качеством  
предоставленного электронного оригинал-макета

Формат 60–84. Печать Цифровая 6,75 усл.п.л.

Тираж 100 экз. Заказ № 69

Подписано к печати: 11.02.2022

Редакционно-издательский отдел КГМА  
(420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 36)

ISBN 978-5-9500386-9-3

