

ВЗАИМОСВЯЗИ ИММУНОСУПРЕССОРНЫХ НЕЙТРОФИЛОВ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С СУБКЛИНИЧЕСКИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

**Долгушин И.И., Генкель В.В., Батурина И.Л., Савочкина А.Ю.,
Минасова А.А., Никушкина К.В., Пыхова Л.Р., Кузнецова А.С.,
Шапошник И.И.**

*ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Челябинск, Россия*

Резюме. Последние пятнадцать лет были отмечены стремительным прогрессом в изучении нейтрофилов. Открытие транскрипционной пластичности нейтрофилов, их фенотипической и функциональной гетерогенности способствовали началу активного междисциплинарного изучения роли нейтрофилов при различных хронических воспалительных заболеваниях. Увеличение в системной циркуляции иммуносупрессорных нейтрофилов может наблюдаться не только при сепсисе, но и при хроническом системном воспалении, которое наряду с нарушениями липидного обмена является важнейшим механизмом развития и прогрессирования атеросклероза. Моноциты, дендритные клетки, Т-лимфоциты и нейтрофилы являются ключевыми участниками и модуляторами воспаления при атеросклерозе. Потенциальное значение иммуносупрессорных нейтрофилов в атерогенезе и регуляции воспалительного ответа при атеросклерозе в настоящее время не установлено. Однако, принимая во внимание их возможные эффекты в отношении Т-лимфоцитов и клеток врожденного иммунитета, изучение иммуносупрессорных нейтрофилов в контексте атеросклероза и атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний представляется перспективным направлением.

Цель исследования – изучить взаимосвязи между количеством циркулирующих иммуносупрессорных нейтрофилов и субпопуляционным составом Т-лимфоцитов и моноцитов у пациентов с субклиническим атеросклерозом.

В исследование включали пациентов в возрасте 40-64 лет с субклиническим атеросклерозом периферических артерий. Фенотипирование субпопуляций нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов осуществляли методом проточной цитометрии на аппарате Navios 6/2 (Beckman Coulter).

В исследование были включены 133 пациента, 65 (48,8%) мужчин и 68 (51,2%) женщин. По результатам корреляционного анализа было установлено, что увеличение количества циркулирующих CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов ассоциировалось с увеличением количества регуляторных

Адрес для переписки:

*Генкель Вадим Викторович
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (951) 441-70-61.
E-mail: henkel-07@mail.ru*

Address for correspondence:

*Genkel Vadim V.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (951) 441-70-61.
E-mail: henkel-07@mail.ru*

Образец цитирования:

*И.И. Долгушин, В.В. Генкель, И.Л. Батурина,
А.Ю. Савочкина, А.А. Минасова, К.В. Никушкина,
Л.Р. Пыхова, А.С. Кузнецова, И.И. Шапошник
«Взаимосвязи иммуносупрессорных нейтрофилов и
показателей врожденного и адаптивного иммунитета
у пациентов с субклиническим атеросклерозом» //
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 283-294.
doi: 10.15789/1563-0625-IBI-2463
© Долгушин И.И. и соавт., 2022*

For citation:

*I.I. Dolgushin, V.V. Genkel, I.L. Baturina, A.Yu. Savochkina,
A.A. Minasova, K.V. Nikushkina, L.R. Pykhova,
A.S. Kuznetsova, I.I. Shaposhnik "Interactions between
immunosuppressor neutrophils, innate and adaptive immunity
indexes in the patients with subclinical atherosclerosis",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2022, Vol. 24, no. 2, pp. 283-294.
doi: 10.15789/1563-0625-IBI-2463
DOI: 10.15789/1563-0625-IBI-2463*

Т-лимфоцитов. У пациентов с субклиническим атеросклерозом, у которых абсолютное количество циркулирующих иммуносупрессорных нейтрофилов соответствовало первому квартилю (менее 136 кл/мкл), отмечалось статистически значимо меньшее количество регуляторных Т-лимфоцитов в сравнении с пациентами из 2-4 квартиля. Увеличение количества иммуносупрессорных нейтрофилов ассоциировалось с уменьшением количества классических моноцитов, экспрессирующих TLR4 ($r = -0,335$; $p = 0,004$), а также с уменьшением интенсивности экспрессии TLR2 ($r = -0,268$; $p = 0,023$) на неклассических моноцитах. У пациентов с субклиническим атеросклерозом 40-64 лет увеличение количества иммуносупрессорных CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов ассоциируется с увеличением содержания регуляторных Т-лимфоцитов и неклассических моноцитов, снижением количества классических моноцитов, экспрессирующих TLR4 и снижением интенсивности экспрессии TLR2 на неклассических моноцитах.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, иммуносупрессорные нейтрофилы, адаптивный иммунитет, атеросклероз

INTERACTIONS BETWEEN IMMUNOSUPPRESSOR NEUTROPHILES, INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY INDEXES IN THE PATIENTS WITH SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS

Dolgushin I.I., Genkel V.V., Baturina I.L., Savochkina A.Yu., Minasova A.A., Nikushkina K.V., Pykhova L.R., Kuznetsova A.S., Shaposhnik I.I.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The last fifteen years have been marked by rapid progress in the study of neutrophils. The discovery of transcriptional plasticity of neutrophils, their phenotypic and functional heterogeneity contributed to launching active interdisciplinary studies on the role of neutrophils in various chronic inflammatory diseases. Increased systemic circulation of immunosuppressive neutrophils can be observed not only in sepsis, but also in chronic systemic inflammation, which, along with disorders of lipid metabolism, is the major mechanism of atherosclerosis development and progression. Monocytes, dendritic cells, T lymphocytes and neutrophils are key participants and modulators of inflammation in atherosclerosis. Potential significance of immunosuppressive neutrophils in atherogenesis and regulation of inflammatory response in atherosclerosis has not been currently established. However, taking into account their possible effects upon T lymphocytes and innate immunity cells, the study of immunosuppressive neutrophils seems promising in the context of atherosclerosis and atherosclerotic cardiovascular diseases. The purpose of this study was to evaluate relationship between the numbers of circulating immunosuppressive neutrophils and subpopulations of T cells and monocytes in the patients with subclinical atherosclerosis.

The study enrolled patients aged 40-64 years with subclinical atherosclerosis of peripheral arteries. Subpopulations of neutrophils, lymphocytes and monocytes were phenotyped by flow cytometry using “Navios 6/2” (Beckman Coulter).

133 patients, 65 (48.8%) males and 68 (51.2%) females were included into the study. Correlation analysis showed that increased number of circulating CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} neutrophils was associated with increased number of regulatory T lymphocytes. The patients with subclinical atherosclerosis and absolute numbers of circulating immunosuppressive neutrophils within the first quartile (<136 cells/ μ L) had a statistically significantly lower number of regulatory T lymphocytes compared with patients in the 2-4 quartiles. An increase in immunosuppressive neutrophils was associated with decreased number of classical monocytes expressing TLR4 ($r = -0.335$; $p = 0.004$), and a decrease in TLR2 surface expression intensity ($r = -0.268$; $p = 0.023$) on the non-classical monocytes.

In patients with subclinical atherosclerosis of 40-64 years old, an increase in immunosuppressive CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} neutrophils was associated with increase in regulatory T lymphocytes and non-classical monocytes, as well as decrease in classic monocytes expressing TLR4, and lower intensity of TLR2 expression on the non-classical monocytes.

Keywords: neutrophils, immunosuppression, T cells, monocytes, atherosclerosis

Введение

Последние пятнадцать лет были отмечены стремительным прогрессом в изучении нейтрофилов [11]. Открытие транскрипционной пластичности нейтрофилов, их фенотипической и функциональной гетерогенности способствовали началу активного междисциплинарного изучения роли нейтрофилов при различных хронических воспалительных заболеваниях [1, 2, 4, 10, 17]. Важным проявлением функциональной пластичности нейтрофилов является их участие в регуляции как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа [21, 42]. При этом комплексное взаимодействие нейтрофилов и других клеток врожденного и адаптивного иммунитета может иметь своим результатом не только активацию воспалительного ответа, но и иммуносупрессию и резольцию воспаления [29].

В 2010 году в исследовании на здоровых волонтерах, подвергшихся внутривенному введению липополисахарида *E. coli*, была описана субпопуляция зрелых циркулирующих нейтрофилов, демонстрирующих способность ингибировать пролиферацию Т-лимфоцитов и Т-клеточный иммунный ответ [25, 26, 35]. В настоящее время установлены несколько механизмов, посредством которых нейтрофилы данного подтипа могут реализовывать свои иммуносупрессорные и иммуномодулирующие эффекты: 1) опосредованное миелопероксидазой ингибирование активации дендритных клеток с последующим снижением активации и пролиферации CD4⁺Т-лимфоцитов; 2) супрессия активации Т-лимфоцитов посредством MAC-1 зависимого высвобождения H₂O₂ в иммунологический синапс между нейтрофилом и Т-лимфоцитом; 3) активация апоптоза Т-лимфоцитов через ось PD-L1/PD-1; 4) индукция регуляторных Т-лимфоцитов и синтез противовоспалительных цитокинов [20, 25, 39].

Предполагается, что увеличение в системной циркуляции иммуносупрессорных нейтрофилов может наблюдаться не только при сепсисе, но и при хроническом системном воспалении, которое наряду с нарушениями липидного обмена является важнейшим механизмом развития и прогрессирования атеросклероза [13, 29, 33]. Моноциты, дендритные клетки, Т-лимфоциты и нейтрофилы являются ключевыми участниками и модуляторами воспаления при атеросклерозе [30]. Потенциальное значение иммуносупрессорных нейтрофилов в атерогенезе и регуляции воспалительного ответа при атеросклерозе в настоящее время не установлено. Однако, принимая во внимание их возможные эффекты в отношении Т-лимфоцитов и клеток врожденно-

го иммунитета, изучение иммуносупрессорных нейтрофилов в контексте атеросклероза и атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний (АССЗ) представляется перспективным направлением. **Целью исследования** являлось изучение взаимосвязей между количеством циркулирующих иммуносупрессорных нейтрофилов и субпопуляционным составом Т-лимфоцитов и моноцитов у пациентов с субклиническим атеросклерозом.

Материалы и методы

В исследование включали пациентов в возрасте 40-64 лет с субклиническим атеросклерозом периферических артерий, установленным по результатам проведения дуплексного сканирования артерий каротидного бассейна и артерий нижних конечностей. Критерием атеросклеротического поражения указанных сосудистых бассейнов являлось обнаружение атеросклеротической бляшки [3, 36].

При включении в исследование все пациенты подписывали информированное согласие. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 10 от 27.10.2018). Критериями невключения в исследование и/или исключения из исследования являлись следующие клинические состояния: установленные ранее АССЗ (цереброваскулярная болезнь в анамнезе; ишемическая болезнь сердца; заболевание периферических артерий; реваскуляризация коронарных или периферических артерий); тяжелые нарушения функции печени и почек (снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) менее 30 мл/мин/1,73 м²); злокачественные новообразования; установленные ХВЗ; острые воспалительные или инфекционные заболевания в предшествующие 28 дней.

Определяли следующие лабораторные показатели: общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС ЛНП), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицериды (ТГ), гликированный гемоглобин, креатинин с последующим расчетом скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле СКД-ЕРІ, высокочувствительный С-реактивный белок (вчСРБ).

Фенотипирование субпопуляций нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов осуществляли методом проточной цитометрии на аппарате Navios 6/2 (Beckman Coulter) с использованием конъюгатов моноклональных антител: CD3 (PE-eFluor 610, eBioscience), CD4 (APC, eBioscience), CD8 (PE-Cy5.5, Invitrogen), CD19 (FITC, eBioscience), CD11b (FITC, eBioscience), CD127 (FITC,

eBioscience), CD14 (PerCP-Cy5.5, eBioscience), CD16-PE-Cy7.0 (Invitrogen, США), CD62L-PE (Beckman Coulter, США), CD282 (Alexa Flour 647, BioLegend, США), CD284 (PE, BioLegend, США). Экспрессию TLR2 и TLR4 на CD14⁺CD16⁻ моноцитах (классические моноциты), CD14⁺CD16⁺ моноцитах (промежуточные моноциты), CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитах (неклассические моноциты) определяли по средней интенсивности флуоресценции. Фенотипирование нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов проводили в цельной крови с детекцией не менее 30 000 событий. Стратегия гейтирования субпопуляций нейтрофилов была подробно описана нами ранее [9].

Анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистического анализа данных IBM SPSS Statistics, версия 18. Качественные переменные описывали абсолютными и относительными частотами (процентами). Количественные переменные описывали медианой (Me) с указанием интерквартильного интервала (Q_{0,25}-Q_{0,75}) в случае несоответствия распределения величины нормальному, средним (M) и стандартным отклонением (SD) — в случае нормального распределения величины. В целях определения взаимосвязей показателей использовали корреляционный анализ Спирмена. Для оценки значимости различий между двумя группами использовали критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при критическом уровне значимости 0,05.

Результаты

В исследование были включены 133 пациента, 65 (48,8%) мужчин и 68 (51,2%) женщин. Клиническая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Результаты проточной цитофлуорометрии представлены в таблице 2.

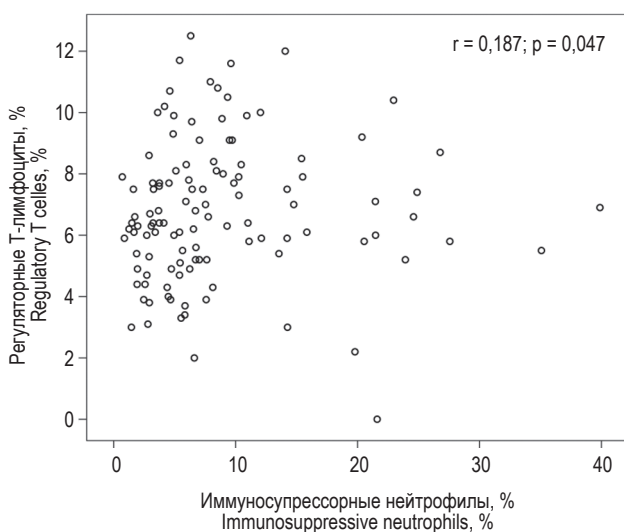
По результатам корреляционного анализа было установлено, что увеличение количества циркулирующих CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов ассоциировалось с увеличением количества регуляторных Т-лимфоцитов (см. рис. 1).

Кроме того, у пациентов с субклиническим атеросклерозом, у которых абсолютное количество циркулирующих иммуносупрессорных нейтрофилов соответствовало первому квартилю (менее 136 кл/мкл), отмечалось статистически значимо меньшее количество регуляторных Т-лимфоцитов (см. рис. 2), в сравнении с пациентами из 2-4 квартиля.

При анализе взаимосвязей иммуносупрессорных нейтрофилов с моноцитами различных субпопуляций были установлены прямые корреляционные связи между количеством CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов и неклассических моноцитов (см. рис. 3).

Увеличение количества иммуносупрессорных нейтрофилов ассоциировалось с уменьшением количества классических моноцитов, экспрессирующих TLR4 ($r = -0,335$; $p = 0,004$), а также с уменьшением интенсивности экспрессии TLR2

А (А)



Б (В)

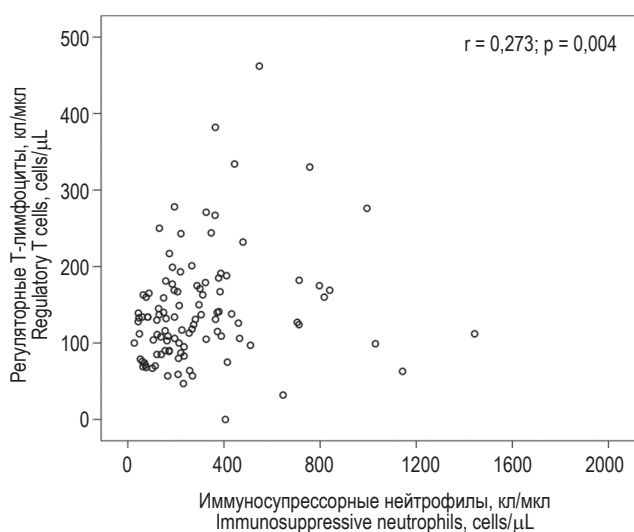


Рисунок 1. Взаимосвязи между количеством (в относительных (А) и абсолютных (Б) значениях) иммуносупрессорных нейтрофилов и регуляторных Т-лимфоцитов

Figure 1. Relationships between the number (in relative (A) and absolute (B) values) of immunosuppressed neutrophils and regulatory T lymphocytes

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF PATIENTS

Показатели / Parameters	Пациенты / Patients (n = 133)
Возраст, лет, Ме (ИИ) Age, years, Me (IQR)	52,0 (46,0-57,0)
ИМТ, кг/м², Ме (ИИ) BMI, kg/m ² , Me (IQR)	26,9 (24,3-30,3)
Ожирение, n (%) Obesity, n (%)	37 (27,8)
Абдоминальное ожирение, n (%) Abdominal obesity, n (%)	73 (54,8)
Курение, n (%) Smoking, n (%)	23 (17,3)
СД 2 типа, n (%) Type 2 diabetes mellitus, n (%)	7 (5,26)
Артериальная гипертензия (АГ), n (%) Hypertension, n (%)	75 (56,4)
Субклинический атеросклероз артерий каротидного бассейна, n (%) Subclinical carotid atherosclerosis, n (%)	117 (87,9)
Субклинический атеросклероз артерий нижних конечностей, n (%) Subclinical atherosclerosis of lower limb arteries, n (%)	86 (64,6)
Дезагреганты, n (%) Antiplatelets, n (%)	19 (14,3)
Бета-адреноблокаторы, n (%) Beta-blockers, n (%)	26 (19,5)
Ингибиторы РААС, n (%) RAAS-inhibitors, n (%)	42 (31,6)
Диуретики, n (%) Diuretics, n (%)	16 (12,0)
Статины, n (%) Statins, n (%)	35 (26,3)
Пероральные сахароснижающие препараты, n (%) Antidiabetics medications, n (%)	7 (5,26)
ОХС, ммоль/л, Ме (ИИ) TC, mmol/l, Me (IQR)	5,87 (4,98-6,62)
ХС ЛНП, ммоль/л, Ме (ИИ) LDL-cholesterol, mmol/l, Me (IQR)	3,65 (2,96-4,38)
ХС ЛВП, ммоль/л, Ме (ИИ) HDL-cholesterol, mmol/l, Me (IQR)	1,35 (1,19-1,61)
ТГ, ммоль/л, Ме (ИИ) TG, mmol/l, Me (IQR)	1,30 (1,00-1,80)
вчСРБ, мг/л, Ме (ИИ) HsCRP, mg/l, Me (IQR)	2,52 (1,37-3,13)
Гликированный гемоглобин, %, Ме (ИИ) Glycated hemoglobin, %, Me (IQR)	5,73 (5,27-6,05)
СКФ, мл/мин/1,73 м², Ме (ИИ) GFR, ml/min/1.73 m ² , Me (IQR)	69,5 (61,0-86,0)

Примечание. ИМТ – индекс массы тела; СД – сахарный диабет; РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система; ОХС – общий холестерин; ХС ЛНП – холестерин липопротеинов низкой плотности; ХС ЛВП – холестерин липопротеинов высокой плотности; ТГ – триглицериды; вчСРБ – высокочувствительный С-реактивный белок; СКФ – скорость клубочковой фильтрации; Ме – медиана; ИИ – интерквартильный интервал.

Note. BMI, body mass index; RAAS, renin-angiotensin-aldosterone system; TC, total cholesterol; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; TG, triglycerides; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; GFR, glomerular filtration rate; Me, median; IQR, interquartile range.

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

TABLE 2. FLOW CYTOMETRY RESULTS

Показатели / Parameters	Пациенты / Patients (n = 133)
CD16^{hi}CD11b^{hi}CD62L^{hi} (зрелые нейтрофилы) CD16 ^{hi} CD11b ^{hi} CD62L ^{hi} (mature neutrophils)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	3009,0 (2332,0-3524,0)
Относительные значения, % Relative values, %	89,8 (83,4-93,2)
CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} (иммуносупрессорные нейтрофилы) CD16 ^{hi} CD11b ^{lo} CD62L ^{br} (immunosuppressive neutrophils)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	221,0 (136,0-379,0)
Относительные значения, % Relative values, %	6,61 (4,01-10,90)
CD3⁺ (Т-лимфоциты) CD3 ⁺ (T lymphocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	1408 (1193-1780)
Относительные значения, % Relative values, %	74,9 (68,5-79,9)
CD19⁺ (В-лимфоциты) CD19 ⁺ (B lymphocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	233,0 (164,0-319,5)
Относительные значения, % Relative values, %	11,9 (9,13-14,60)
CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперы) CD3 ⁺ CD4 ⁺ (T helpers)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	910,0 (722,5-1138,0)
Относительные значения, % Relative values, %	46,5 (41,7-51,9)
CD3⁺CD8⁺ (Т-цитотоксические) CD3 ⁺ CD8 ⁺ (T cytotoxic)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	487,0 (356,5-648,0)
Относительные значения, % Relative values, %	25,3 (19,6-29,6)
CD4⁺CD25⁺CD127⁻ (Т-лимфоциты регуляторные) CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ (T regulatory lymphocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	131,5 (98,0-168,5)
Относительные значения, % Relative values, %	6,50 (5,30-7,93)
CD14⁺⁺CD16⁻ (классические моноциты) CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ (classical monocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	157,0 (59,0-349,2)
Относительные значения, % Relative values, %	46,0 (13,1-74,6)
CD14⁺⁺CD16⁺ (промежуточные моноциты) CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ (intermediate monocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	55,0 (21,0-240,0)

Таблица 2 (окончание)
 Table 2 (continued)

Показатели / Parameters	Пациенты / Patients (n = 133)
Относительные значения, % Relative values, %	12,6 (4,24-51,00)
CD14⁺CD16⁺⁺ (неклассические моноциты) CD14⁺CD16⁺⁺ (non-classical monocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	28,0 (15,0-49,0)
Относительные значения, % Relative values, %	6,30 (3,49-9,71)
CD14⁺⁺CD16⁻TLR2⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	90,5 (18,0-375,0)
Относительные значения, % Relative values, %	17,4 (4,19-93,80)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	47,1 (8,59-72,90)
CD14⁺⁺CD16⁻TLR4⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	295,5 (96,5-406,0)
Относительные значения, % Relative values, %	65,9 (29,9-93,4)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	5,97 (1,87-17,20)
CD14⁺⁺CD16⁺TLR2⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	393,0 (225,7-485,0)
Относительные значения, % Relative values, %	82,3 (53,4-98,0)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	35,8 (9,92-48,90)
CD14⁺⁺CD16⁺TLR4⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	403,5 (211,7-503,0)
Относительные значения, % Relative values, %	94,4 (48,9-98,6)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	6,69 (1,85-11,70)
CD14⁺CD16⁺⁺TLR2⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	344,5 (201,2-467,0)
Относительные значения, % Relative values, %	87,3 (47,1-98,3)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	16,1 (5,75-24,00)
CD14⁺CD16⁺⁺TLR4⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	433,0 (339,5-530,0)
Относительные значения, % Relative values, %	95,6 (87,1-98,3)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	6,77 (3,71-8,83)

Примечание. кл/мкл – клеток в 1 микролитре; усл. ед. – условные единицы.
 Note. cells/ μ L, cells in 1 microliter; c. u., conventional units.

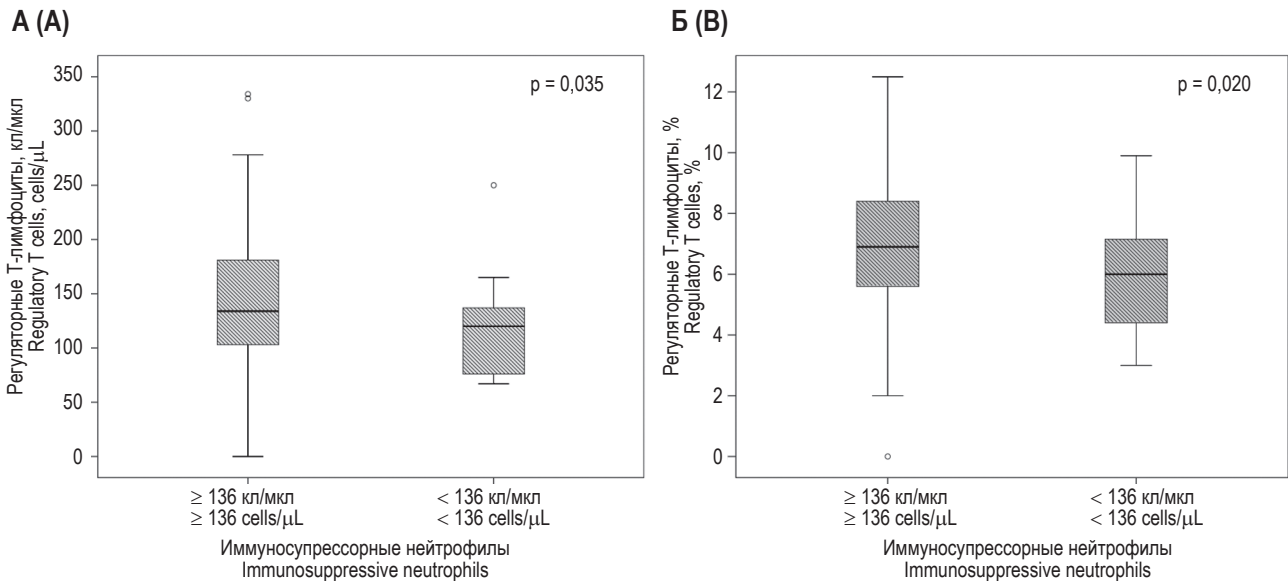


Рисунок 2. Абсолютное (А) и относительное (Б) содержание регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов из первого квартиля по количеству иммуносупрессорных нейтрофилов

Figure 2. Absolute (A) and relative (B) counts of regulatory T lymphocytes in patients from the first quartile of immunosuppressed neutrophils

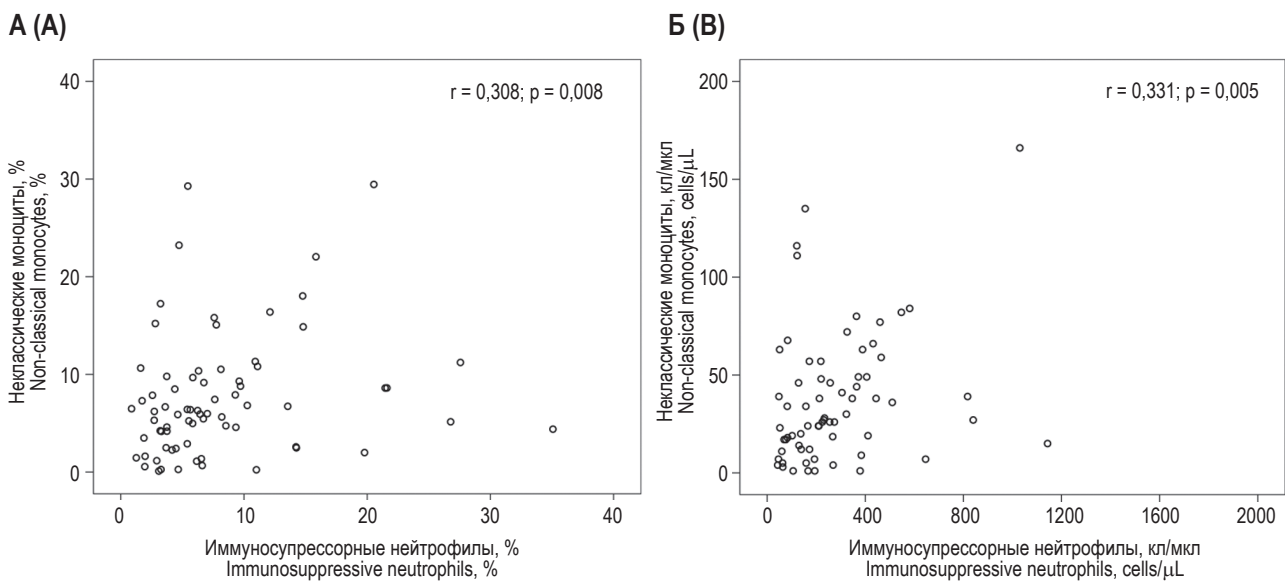


Рисунок 3. Взаимосвязи между количеством (в относительных (А) и абсолютных (Б) значениях) иммуносупрессорных нейтрофилов и неклассических моноцитов

Figure 3. Relationships between the numbers (in relative (A) and absolute (B) values) of immunosuppressed neutrophils and non-classical monocytes

($r = -0,268$; $p = 0,023$) на неклассических моноцитах.

Обсуждение

Изучение иммуносупрессорных нейтрофилов в настоящее время наиболее активно ведется в области онкоиммунологии. Иммуносупрессорные нейтрофилы, находящиеся как в системной циркуляции, так и составляющие локальное

микроокружение опухоли, рассматриваются как активные участники канцерогенеза, подавляющие противоопухолевую активность других иммунных клеток и детерминирующие развитие резистентности к ингибиторам контрольных точек иммунитета [8, 12]. Несмотря на то, что важная роль нейтрофилов в развитии атеросклероза и атеротромбоза на сегодняшний день не подлежит сомнению, данные о возможной роли иммуносупрессорных нейтрофилов в регуляции воспали-

тельного ответа при атеросклерозе практически отсутствуют [16, 34].

Основными результатами представленного исследования являются: 1) у пациентов 40–64 лет с субклиническим атеросклерозом иммуносупрессорные CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилы составляют в среднем 6,61% от общего пула циркулирующих нейтрофилов; 2) увеличение иммуносупрессорных нейтрофилов ассоциируется с увеличением количества регуляторных Т-лимфоцитов; 3) количество иммуносупрессорных нейтрофилов прямо коррелирует с количеством неклассических моноцитов, обратно — с количеством классических моноцитов, экспрессирующих TLR4 и интенсивностью экспрессии TLR2 на неклассических моноцитах.

Ранее в нескольких исследованиях было показано, что одним из механизмов нейтрофил-индуцированной иммуносупрессии является опосредованная моноцитарными дендритными клетками стимуляция дифференцировки регуляторных Т-лимфоцитов [7, 32]. Другим возможным механизмом индукции регуляторных Т-лимфоцитов является зависимость от нейтрофильной аргиназы-1 активация сигнальных путей ROR t, ROR и mTOR [18, 24, 41]. Согласно современным представлениям, при атеросклерозе наблюдается снижение количества регулярных Т-лимфоцитов и нарушение их функций [5]. Увеличение регулярных Т-лимфоцитов, связанное с влиянием CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов, потенциально может являться атеропротективным фактором с самостоятельным клиническим значением, что требует подтверждения в проспективных исследованиях. В экспериментальных исследованиях применение адоптивной клеточной терапии с использованием васкулотропных Т-регуляторных лимфоцитов, гиперэкспрессирующих CX3CR1, приводило к уменьшению прогрессирования атеромы, уменьшению содержания в ней липидного компонента и увеличению содержания соединительной ткани [6].

Моноциты и макрофаги являются доминирующим типом клеток врожденного иммунитета в атероме [40]. Биологические функции неклассических моноцитов и их роль в патогенезе хронических воспалительных заболеваний окончательно не установлены [22]. Более того, экспериментальные исследования, в которых изучались эффекты неклассических моноцитов на развитие и прогрессирование атеросклероза, продемонстрировали конфликтующие результаты [22]. Циркулирующие классические моноциты являются основным подтипом циркулирующих моноцитов, мигрирующих в сосудистую стенку и атерому

по мере развития атеросклероза [27]. Активация сигнальных путей, связанных с TLR4, экспрессирующимися на моноцитах, приводит к стимуляции их хемокинеза и миграции в ткани, в т.ч. в сосудистую стенку [19]. Интенсивность экспрессии TLR2 и TLR4 на циркулирующих моноцитах может репрезентировать активность системного воспаления и тяжесть хронических воспалительных заболеваний [38]. Таким образом, активация TLR2- и TLR4-сигналинга, безусловно, является провоспалительным и проатерогенным фактором [14]. Возможно, установленное нами снижение количества классических моноцитов, экспрессирующих TLR4, и уменьшение экспрессии TLR2 на неклассических моноцитах, ассоциирующееся с количеством иммуносупрессорных нейтрофилов, также является демонстрацией их лимитирующих воспаление функций и потенциальных атеропротективных эффектов. Неклассические моноциты, вероятно, в меньшей степени способны к экстравазации и миграции в атерому и описываются как «патрулирующие» сосуды клетки, играющие ключевую роль в детекции повреждений сосудистой стенки и поддержании сосудистого гомеостаза [22, 28]. Ряд исследователей обозначают неклассические моноциты как «воспалительные» моноциты, что во многом связано с их возможностью продуцировать провоспалительные цитокины, в ряде случаев превышающую таковую у классических моноцитов [15, 23, 31]. С другой стороны, установлено, что неклассические моноциты после миграции в ткани могут трансформироваться в противовоспалительные M2-макрофаги, способствующие стабилизации атеромы [37]. Несмотря на то, что во многих клинических исследованиях увеличение количества неклассических моноцитов прямо коррелировало с тяжестью атеросклеротического поражения сосудов, целый ряд исследователей рассматривает как атеропротективную субпопуляцию моноцитов, чье увеличение является ответом на повреждение, направленным на его лимитирование [22].

Заключение

У пациентов с субклиническим атеросклерозом 40–64 лет увеличение количества иммуносупрессорных CD16^{hi}CD11b^{lo}CD62L^{br} нейтрофилов ассоциируется с увеличением содержания регуляторных Т-лимфоцитов и неклассических моноцитов, снижением количества классических моноцитов, экспрессирующих TLR4, и снижением интенсивности экспрессии TLR2 на неклассических моноцитах.

Список литературы / References

1. Долгушин И.И. Нейтрофильные гранулоциты: новые лица старых знакомых // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 30-37. [Dolgushin I.I. Neutrophil granulocytes: new faces of old acquaintances. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 30-37. (In Russ.)]
2. Кузнецова А.С., Долгушина А.И., Савочкина А.Ю., Сумеркина В.А., Никушкина К.В., Емельянова Н.Б., Хайдукова И.В. Функциональная активность нейтрофилов у больных с атеросклеротическими стенозами чревного ствола // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 1. С. 35-41. [Kuznetsova A.S., Dolgushina A.I., Savochkina A.Yu., Sumerkina V.A., Nikushkina K.V., Emelyanova N.B., Khaidukova I.V. The functional activity of neutrophils in patients with atherosclerotic stenosis of the celiac trunk. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 1, pp. 35-41. (In Russ.)]
3. Кухарчук В.В., Ежов М.В., Сергиенко И.В., Арабидзе Г.Г., Бубнова М.Г., Балахонова Т.В., Гуревич В.С., Качковский М.А., Коновалов Г.А., Константинов В.О., Малышев П.П., Покровский С.Н., Соколов А.А., Сумароков А.Б., Горнякова Н.Б., Обрезан А.Г., Шапошник И.И. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. российские рекомендации, VII пересмотр // Атеросклероз и дислипидемии, 2020. Т. 38, № 1. С. 7-40. [Kukharchuk V.V., Ezhov M.V., Sergienko I.V., Arabidze G.G., Bubnova M.G., Balakhonova T.V., Gurevich V.S., Kachkovsky M.A., Kononov G.A., Konstantinov V.O., Malyshev P.P., Pokrovsky S.N., Sokolov A.A., Sumarokov A.B., Gornyakova N.B., Obrezan A.G., Shaposhnik I.I. Diagnosis and correction of lipid metabolism disorders to prevent and treat atherosclerosis. russian recommendations, VII revision. *Ateroskleroz i dislipidemii = Atherosclerosis and Dyslipidemia*, 2020, Vol. 38, no. 1, pp. 7-40. (In Russ.)]
4. Осиков М.В., Бойко М.С., Симонян Е.В., Ушакова В.А. Иммуотропные эффекты витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозиторий при экспериментальном язвенном колите // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 497-508. [Osikov M.V., Boyko M.S., Simonyan E.V., Ushakova V.A. Immunotropic effects of vitamin D3 in original rectal suppositories in experimental ulcerative colitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 497-508. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IEO-2176.
5. Baardman J., Lutgens E. Regulatory T Cell metabolism in atherosclerosis. *Metabolites*, 2020, Vol. 10, no. 7, 279. doi: 10.3390/metabo10070279.
6. Bonacina F., Martini E., Svecla M., Nour J., Cremonesi M., Beretta G., Moregola A., Pellegatta F., Zampoleri V., Catapano A.L., Kallikourdis M., Norata G.D. Adoptive transfer of CX3CR1 transduced-T regulatory cells improves homing to the atherosclerotic plaques and dampens atherosclerosis progression. *Cardiovasc. Res.*, 2021, Vol. 117, no. 9, pp. 2069-2082.
7. Drifte G., Dunn-Siegrist I., Tissières P., Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.*, 2013, Vol. 41, no. 3, pp. 820-832.
8. Faget J., Peters S., Quantin X., Meylan E., Bonnefoy N. Neutrophils in the era of immune checkpoint blockade. *J. Immunother. Cancer*, 2021, Vol. 9, no. 7, e002242. doi: 10.1136/jitc-2020-002242.
9. Genkel V., Dolgushin I., Baturina I., Savochkina A., Kuznetsova A., Pykhova L., Shaposhnik I. Associations between hypertriglyceridemia and circulating neutrophil subpopulation in patients with dyslipidemia. *Int. J. Inflamm.*, 2021, Vol. 2021, 6695468. doi: 10.1155/2021/6695468.
10. Grieshaber-Bouyer R., Radtke F.A., Cunin P., Stifano G., Levescot A., Vijaykumar B., Nelson-Maney N., Blaustein R.B., Monach P.A., Nigrovic P.A.; ImmGen Consortium. The neutrotime transcriptional signature defines a single continuum of neutrophils across biological compartments. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 2856. doi: 10.1038/s41467-021-22973-9.
11. Gwyer Findlay E. We need to talk about neutrophils. *Immunology*, 2021, Vol. 164, no. 4, pp. 655-656.
12. Hedrick C.C., Malanchi I. Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021. Online ahead of print. doi: 10.1038/s41577-021-00571-6.
13. Hong L.Z., Xue Q., Shao H. Inflammatory markers related to innate and adaptive immunity in atherosclerosis: implications for disease prediction and prospective therapeutics. *J. Inflamm. Res.*, 2021, Vol. 14, pp. 379-392.
14. Huang R., Hu Z., Chen X., Cao Y., Li H., Zhang H., Li Y., Liang L., Feng Y., Wang Y., Su W., Kong Z., Melgiri N.D., Jiang L., Li X., Du J., Chen Y. The transcription factor SUB1 is a master regulator of the macrophage TLR response in atherosclerosis. *Adv. Sci. (Weinh)*, 2021, Vol. 8, no. 19, e2004162. doi: 10.1002/advs.202004162.
15. Kapellos T.S., Bonaguro L., Gemünd I., Reusch N., Saglam A., Hinkley E.R., Schultze J.L. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, pp. 2035. doi: 10.3389/fimmu.2019.02035.
16. Klopff J., Brostjan C., Eilenberg W., Neumayer C. Neutrophil extracellular traps and their implications in cardiovascular and inflammatory disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 2, 559. doi: 10.3390/ijms22020559.
17. Kvedaraitė E. Neutrophil-T cell crosstalk in inflammatory bowel disease. *Immunology*, 2021, Vol. 164, no. 4, pp. 657-664.

18. Li Y., Wang W., Yang F., Xu Y., Feng C., Zhao Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Commun. Signal.*, 2019, Vol. 17, no. 1, 147. doi: 10.1186/s12964-019-0471-y.
19. Liu Z., Jiang Y., Li Y., Wang J., Fan L., Scott M.J., Xiao G., Li S., Billiar T.R., Wilson M.A., Fan J. TLR4 Signaling augments monocyte chemotaxis by regulating G protein-coupled receptor kinase 2 translocation. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 2, pp. 857-864.
20. Lok L.S.C., Clatworthy M.R. Neutrophils in secondary lymphoid organs. *Immunology*, 2021, Vol. 164, no. 4, pp. 677-688.
21. Minns D., Smith K.J., Findlay E.G. Orchestration of adaptive T cell responses by neutrophil granule contents. *Mediators Inflamm.*, 2019, Vol. 10, 8968943. doi: 10.1155/2019/8968943.
22. Narasimhan P.B., Marcovecchio P., Hamers A.A.J., Hedrick C.C. Nonclassical monocytes in health and disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2019, Vol. 37, pp. 439-456.
23. Ożańska A., Szymczak D., Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand. J. Immunol.*, 2020, Vol. 92, no. 1, e12883. doi: 10.1111/sji.12883.
24. Pang B., Zhen Y., Hu C., Ma Z., Lin S., Yi H. Myeloid-derived suppressor cells shift Th17/Treg ratio and promote systemic lupus erythematosus progression through arginase-1/miR-322-5p/TGF- β pathway. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2020, Vol. 134, no. 16, pp. 2209-2222.
25. Pillay J., Kamp V.M., van Hoffen E., Visser T., Tak T., Lammers J.W., Ulfman L.H., Leenen L.P., Pickkers P., Koenderman L. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 1, pp. 327-336.
26. Pillay J., Ramakers B.P., Kamp V.M., Loi A.L., Lam S.W., Hietbrink F., Leenen L.P., Tool A.T., Pickkers P., Koenderman L. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, Vol. 88, no. 1, pp. 211-220.
27. Robbins C.S., Chudnovskiy A., Rauch P.J., Figueiredo J.L., Iwamoto Y., Gorbatov R., Etzrodt M., Weber G.F., Ueno T., van Rooijen N., Mulligan-Kehoe M.J., Libby P., Nahrendorf M., Pittet M.J., Weissleder R., Swirski F.K. 2012. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6Chigh monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*, 2012, Vol. 125, no. 2, pp. 364-374.
28. Robinson A., Han C.Z., Glass C.K., Pollard J.W. Monocyte regulation in homeostasis and malignancy. *Trends Immunol.*, 2021, Vol. 42, no. 2, pp. 104-119.
29. Rosales C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front. Physiol.*, 2018, Vol. 20, no. 9, 113. doi: 10.3389/fphys.2018.00113
30. Roy P., Orecchioni M., Ley K. How the immune system shapes atherosclerosis: roles of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021. Online ahead of print. doi: 10.1038/s41577-021-00584-1.
31. Sampath P., Moideen K., Ranganathan U.D., Bethunaickan R. Monocyte subsets: phenotypes and function in tuberculosis infection. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1726. doi: 10.3389/fimmu.2018.01726.
32. Scapini P., Cassatella M.A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 5, pp. 710-719.
33. Schäfer S., Zerneck A. CD8⁺ T cells in atherosclerosis. *Cells*, 2020, Vol. 10, no. 1, 37. doi: 10.3390/cells10010037.
34. Silvestre-Roig C., Braster Q., Ortega-Gomez A., Soehnlein O. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2020, Vol. 17, no. 6, pp. 327-340.
35. Silvestre-Roig C., Hidalgo A., Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*, 2016, Vol. 127, no. 18, pp. 2173-2181.
36. Sprynger M., Rigo F., Moonen M., Aboyans V., Edvardsen T., de Alcantara M.L., Brodmann M., Naka K.K., Kownator S., Simova I., Vlachopoulos C., Wautrecht J.C., Lancellotti P; EACVI Scientific Documents Committee. Focus on echovascular imaging assessment of arterial disease: complement to the ESC guidelines (PARTIM 1) in collaboration with the Working Group on Aorta and Peripheral Vascular Diseases. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging*, 2018, Vol. 19, no. 11, pp. 1195-1221.
37. Thomas G., Tacke R., Hedrick C.C., Hanna R.N. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2015, Vol. 35, no. 6, pp. 1306-1316.
38. Torres-Ruiz J., Carrillo-Vazquez D.A., Padilla-Ortiz D.M., Vazquez-Rodriguez R., Nuñez-Alvarez C., Juarez-Vega G., Gomez-Martin D. TLR expression in peripheral monocyte subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies: association with clinical and immunological features. *J. Transl. Med.*, 2020, Vol. 18, no. 1, 125. doi: 10.1186/s12967-020-02290-3.
39. Vlkova M., Chovancova Z., Nechvatalova J., Connelly A.N., Davis M.D., Slanina P., Travnickova L., Litzman M., Grymova T., Soucek P., Freiburger T., Litzman J., Hel Z. Neutrophil and granulocytic myeloid-derived suppressor cell-mediated T cell suppression significantly contributes to immune dysregulation in common variable immunodeficiency disorders. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 202, no. 1, pp. 93-104.
40. Willemsen L., de Winther M.P. Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies. *J. Pathol.*, 2020, Vol. 250, no. 5, pp. 705-714.

41. Wu H., Zhen Y., Ma Z., Li H., Yu J., Xu Z.G., Wang X.Y., Yi H., Yang Y.G. Arginase-1-dependent promotion of TH17 differentiation and disease progression by MDSCs in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.*, 2016, Vol. 8, no. 331, 331ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.aae0482.

42. Xu Y., Zhang Q., Zhao Y. The functional diversity of neutrophils and clustered polarization of immunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 11, pp. 1212-1214.

Авторы:

Долгушин И.И. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, директор научно-исследовательского института иммунологии, президент ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Генкель В.В. — к.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Батурина И.Л. — к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Савочкина А.Ю. — д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики, главный научный сотрудник научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Минасова А.А. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Никושкина К.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Пыхова Л.Р. — старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Кузнецова А.С. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Шапошник И.И. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Dolgushin I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of Russia, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Microbiology, Virology, Immunology, Director, Research Institute of Immunology, President, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Genkel V.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Propedeutics of Internal Diseases, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Baturina I.L., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Savochkina A.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Main Research Associate, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Minasova A.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Nikushkina K.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Pykhova L.R., Senior Lecturer, Department of Microbiology, Virology and Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Kuznetsova A.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Hospital Therapy, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Shaposhnik I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Propedeutics of Internal Diseases, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation