

УДК 616-092.19; 617.735

DOI: 10.14427/jipai.2025.2.66

Значение уровней экспрессии гена HIF и количественных уровней клеточного иммунитета в патогенезе прогрессирующих пролиферативных стадий ретинопатии недоношенных (по обзорным и впервые представленным данным собственных исследований)

Л.М. Балашова^{1,3}, Ю.Д. Кузнецова^{2,3}, С.В. Лесовой^{2,3}, М.А. Альварес³, Е.П. Кантаржи^{1,3}, С.Н. Быковская¹, Ж.М. Салмаси¹

¹ ФГАОУ «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

² Российская детская клиническая больница – филиал ФГАОУ «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

³ НП «Международный научно-практический центр пролиферации тканей», Москва

The significance of HIF gene expression levels and quantitative levels of cell immunity in the pathogenesis of progressive proliferative stages of retinopathy of prematurity

L.M. Balashova^{1,3}, Yu.D. Kuznetsova^{2,3}, S.V. Lesovoy^{2,3}, M.A. Alvares³, E.P. Kantargy^{1,3}, S.N. Bykovskaya¹, Dj.M. Salmasi¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Russian Children's Clinical Hospital – branch of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation, Moscow, Russia

Аннотация

Система иммунитета имеет большое значение в развитии и прогрессировании заболеваний человека, в том числе в офтальмологии при ретинопатии недоношенных (РН) – тяжёлом пролиферативном сосудистом заболевании сетчатки, которое представляет значительный риск для недоношенных. Проведено определение уровней клеточного иммунитета и уровней экспрессии гена гипоксию индуцирующего фактора (HIF) в крови при прогрессирующей РН. Подверглись исследованию 38 глаз 19-ти детей с РН и 6-ти детей с односторонней врождённой катарактой (ПЦР – полимеразная цепная реакция – экспрессия HIF в крови); в 208 глазах 106-ти детей с РН (фенотипирование CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low} (T-per), CD3⁺, CD3⁺4⁺, CD3⁺8⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD19⁺ в крови). Возраст пациентов находился в пределах от 1 месяца до 1 года 2 месяцев. В результате статистической обработки была выявлена разница по уровню Т-лимфоцитов среди пациентов и группы контроля доношенных. CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low} и CD3⁺ пониженные были в начальных, связанных с прогрессированием, и при тяжёлом течении ($p<0,05$). При врождённой катаракте повышенная экспрессия гена HIF практически не определялась ($p<0,01$). При РН значения существенно превышали

Summary

In the light of modern concepts of retinopathy of prematurity (ROP), a severe proliferative disease, it is necessary to study in-depth the state of immunity of premature infants. Cell immunity and hypoxia-inducing factor (HIF) gene expression levels were determined in the developing proliferative stages of ROP. Blood samples were analyzed in 38 eyes of 19 children with ROP and 6 children with unilateral congenital cataract. The PCR (polymerase chain reaction) method was used to study HIF levels. The study of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low}, CD3⁺, CD3⁺4⁺, CD3⁺8⁺, NK-cells CD3⁺CD16⁺CD56⁺ B-cells CD19⁺ was also performed in 208 eyes of 106 children with ROP. The age of the patients ranged from 1 month to 1 year and 2 months. As a result of statistical processing, a difference in the level of T-lymphocytes was revealed between the patients and the control group ($p<0.05$), which included full-term infants and premature infants with ROP. At the same time, the lowest values of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺CD127^{low} and CD3⁺ were detected in the initial progressive stages I, II and final stages V of ROP. The expression of the HIF gene in the blood from the congenital cataracts was normal; with ROP values significantly higher ($p<0.01$). Deviations in the links of metabolic processes were found in these patients.

таковые при катаракте. Это указывало на выраженную ишемию в тканях глаз недоношенных. Отмечено, что в случаях далекозашедших пролиферативных стадий РН установлены отклонения в звеньях метаболических процессов, в том числе по степени экспрессии гена HIF, уровню регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^{low}$, уровню NK-клеток $CD3^+CD16^+CD56^+$, В-лимфоцитов ($CD19^+$) у данных пациентов.

Ключевые слова

Ретинопатия недоношенных, $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^{low}$, $CD3^+$, $CD3^+4^+$, $CD3^+8^+$, NK-клетки $CD3^+CD16^+CD56^+$, В-лимфоциты $CD19^+$, регуляторные Т-лимфоциты, ген гипоксию индуцирующего фактора.

Введение

Система иммунитета имеет большое значение в развитии и прогрессировании заболеваний человека, в том числе в офтальмологии при ретинопатии недоношенных (РН) – тяжёлом пролиферативном сосудистом заболевании сетчатки, которое представляет значительный риск для недоношенных детей [1-2]. HIF регулирует обмен O_2 , выработку эритроцитов, ангиогенез и митохондриальный метаболизм. Чувствительная к гипоксии субъединица HIF-1 способствует адаптации тканей к гипоксическим условиям, в том числе стимулируя проангиогенные факторы. Во время ишемической фазы РН экспрессия HIF-1 стимулируется в чувствительной к гипоксии сетчатке, что приводит к избыточной выработке проангиогенных факторов и развитию патологической неоваскуляризации [3-8]. Ранее нами было проведено исследование показателей клеточного иммунитета у детей до 1 года [9-11], где уделено внимание роли вышеперечисленных факторов в развитии РН.

Целью настоящего исследования явился сравнительный анализ уровней Т-лимфоцитов ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^{low}$, $CD3^+$, $CD3^+4^+$, $CD3^+8^+$), NK-клеток $CD3^+CD16^+CD56^+$ и В-лимфоцитов ($CD19^+$ В-cells), а также HIF при РН.

Материалы и методы исследования

В крови 19-ти детей с двусторонней прогрессирующей РН и 6-ти детей с односторонней врождённой катарактой была изучена экспрессия гена HIF (ПЦР). С целью выявления уровней Т- и В-лимфоцитов в крови больных РН всего обследованы 208 глаз 106-ти детей (структура исследования представлена на рисунках 1 и 2). Всего обследовалось 154 глаза у 79-ти пациентов с РН. У 4 из 20 больных с III+ стадией РН прогрессирование процесса было одностороннее. Контрольную группу составили 54 глаза 27-ми

Keywords

Retinopathy of prematurity, $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^{low}$, $CD3^+$, $CD3^+4^+$, $CD3^+8^+$, NK-cells $CD3^+CD16^+CD56^+$, $CD19^+$, B-cells, regulatory T-lymphocytes, hypoxia-inducing factor gene.

доношенных детей, забор 0,5 мл крови производился во время взятия других назначенных врачом анализов крови из вены. Возраст пациентов

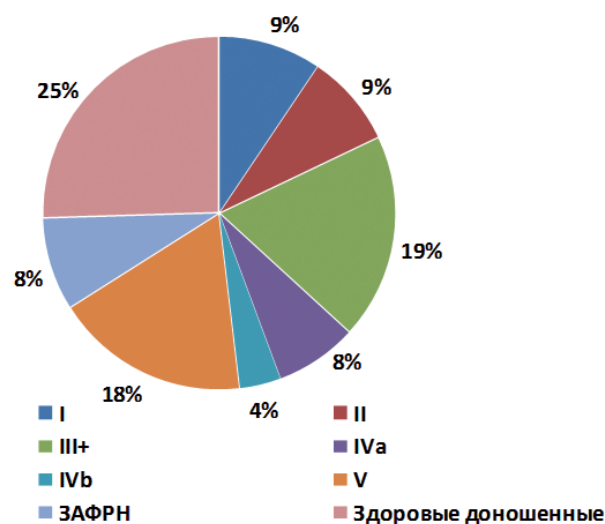


Рис. 1. Распределение детей при исследовании клеточного иммунитета по степени заболевания РН

ЗАФРН – задняя агрессивная форма ретинопатии недоношенных

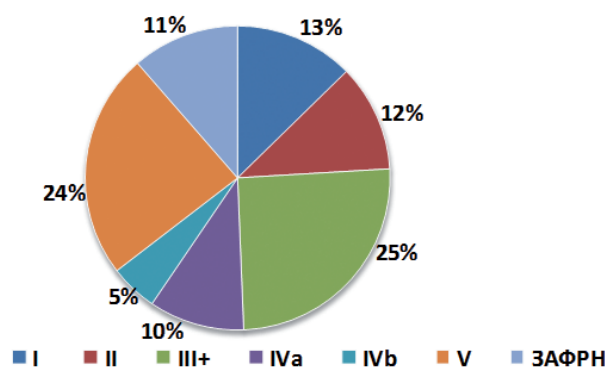


Рис. 2. Распределение детей при исследовании клеточного иммунитета по степени заболевания РН

ЗАФРН – задняя агрессивная форма ретинопатии недоношенных

соответствовал промежутку 1 месяц – 1 год 2 месяца. Забор крови в объёме 0,5 мл производили во время погружения пациента в наркоз до введения лекарственных препаратов.

Кроме стандартного офтальмологического и офтальмоскопического исследования применялось фенотипирование T-cells ($CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^{low}$ (T-reg; T-per), $CD3^+$, $CD3^+4^+$, $CD3^+8^+$), NK-клетки (натуральные киллеры) $CD3^+CD16^+CD56^+$ и B-cells ($CD19^+$) по общепринятой методике.

В процессе исследования использовались также методы статистического анализа. Математическая обработка данных проводилась с использованием современных компьютерных технологий ППП STATISTICA12.0, что связано с его широким распространением в России.

С помощью критерия Колмагорова-Смирнова определялось соответствие изучаемого признака закону нормального распределения. При использовании критериев нормальности было получено, что распределение всех исследуемых признаков можно считать не отличающимися от нормального.

Был выбран наиболее популярный метод решения задач проверки различий средних значений изучаемого признака в исследуемых группах t-критерий Стьюдента для зависимых и независимых групп.

В некоторых случаях был использован модуль «Другие критерии значимости» для оценки различий между двумя коэффициентами корреляции, между двумя средними значениями признаков, между двумя пропорциями.

Достоверными значимыми считались значения различия при $p < 0,05$.

Результаты

На рисунке 3 показана экспрессия гена HIF в крови пациентов с врождённой катарактой, при которой почти все значения, кроме одного (по шкале – 5), находятся ниже градации шкалы 2,0, и недоношенных с РН (по шкале – 8,5 – выше 10) ($p < 0,01$). Несомненно, при ишемическом поражении сетчатки при РН идёт прогрессирование пролиферации, о чём свидетельствуют данные нашего исследования.

Результаты исследования клеточного иммунитета представлены на рисунках 4–11.

Линии тренда показывают направление и динамику изменения величин. Уравнение линии тренда – это формула, которая находит линию, которая лучше всего соответствует точкам данных.



Рис. 3. График уровней экспрессии гена HIF у детей с прогрессирующей РН и катарактой

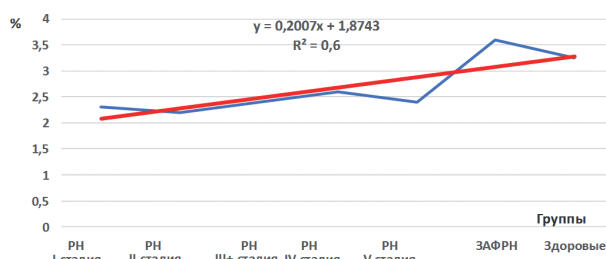


Рис. 4. График построенной полиномиальной линии тренда Линейный тренд $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+CD127^{low}$ здоровых и детей с РН

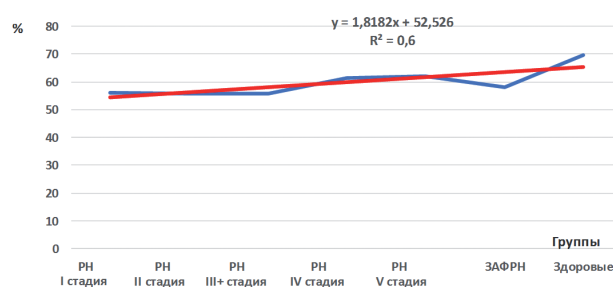


Рис. 5. График построенной полиномиальной линией тренда $CD3^+$ здоровых и детей с РН

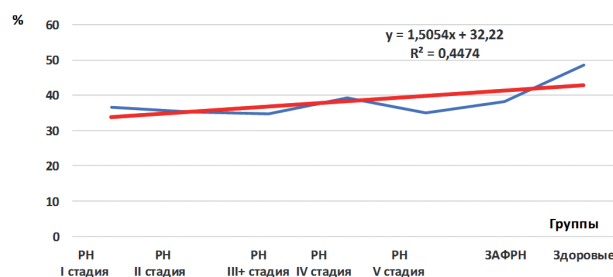


Рис. 6. График построенной полиномиальной линией тренда $CD3^+CD4^+$ здоровых и детей с РН

На полиномиальных линиях тренда, представляющих уровни Т-регуляторов по стадиям заболевания и здоровых, R^2 достигает 0,7 (рис. 4); при анализе уровней $CD3^+$ -клеток и здоровых – достигает 0,6 (рис. 5). При изучении полученных полиномиальных линий тренда для клеток с другими иммунофенотипами и соотношения $CD4^+/CD8^+$ (рисунки 6-10), линии тренда не достигают даже 0,5, следовательно, для этих клеток не показывают динамику изменения величин, то есть не являются информативными.

Далее представлены результаты исследования (р) с использованием современных компьютерных технологий ППП STATISTICA 12.0. На рисунке 11 представлены данные распределения стадий РН по сравнению со здоровыми при исследовании различных иммунофенотипов клеток и их соотношения ($p < 0,05$ – отмечено красными звездочками). Количественные данные на этом рисунке, как и на всех остальных, представлены по вертикали в %. По горизонтали распределены стадии РН, здоровые доношенные.

При сравнении уровней Трег исследуемой патологии и доношенных здоровых (рис. 11) несомненно различие между ЗАФРН (задняя агрессивная форма ретинопатии недоношенных), здоровыми и другими стадиями заболевания – I, II, III+, IV и V ($p < 0,05$). При дополнительном исследовании нами наблюдались также различия между II и IV стадиями РН ($p < 0,05$). Как видно на этом рисунке, при анализе данных $CD3^+$ -клеток наиболее выраженные различия представлены при сравнении I, III+ и ЗАФРН по сравнению со здоровыми ($p < 0,05$). Значимо отличаются по сравнению со здоровыми II, III+, V и ЗАФРН по количеству $CD3^+CD4^+$ -клеток ($p < 0,05$). Данные по процентному соотношению $CD3^+CD8^+$ -клеток не показывает достоверных различий между различными стадиями РН между собой и здоровыми ($p > 0,05$). Имеется достоверное различие по сравнению со здоровыми доношенными по натуральным Т-киллерам ($CD3^+CD16^+CD56^+$) при III+ (в сторону повышения) а также IV и V стадиях (в сторону понижения значений) ($p < 0,05$). При определении В-cells все исследованные стадии РН достоверно отличаются от здоровых доношенных детей, в основном в сторону повышения. И только недоношенные с III+ РН отличаются пониженными значениями по количеству В-клеток крови ($p < 0,05$). Соотношение количества $CD4^+/CD8^+$ не различается между собой при всех стадиях РН и относительно контроля ($p > 0,05$).

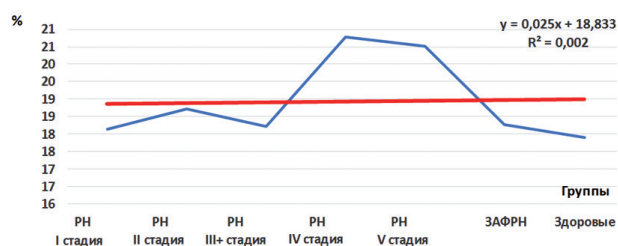


Рис. 7. График построенной полиномиальной линией тренда $CD3^+CD8^+$ здоровых и детей с РН

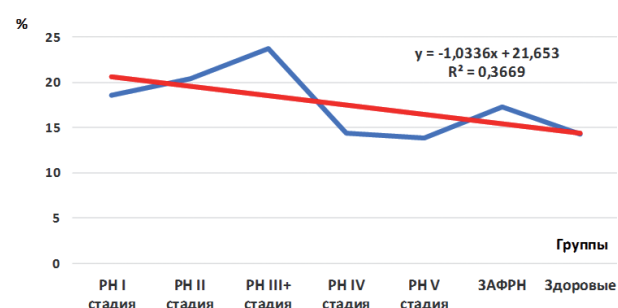


Рис. 8. График построенной полиномиальной линией тренда $CD3^+CD16^+CD56^+$ здоровых и детей с РН

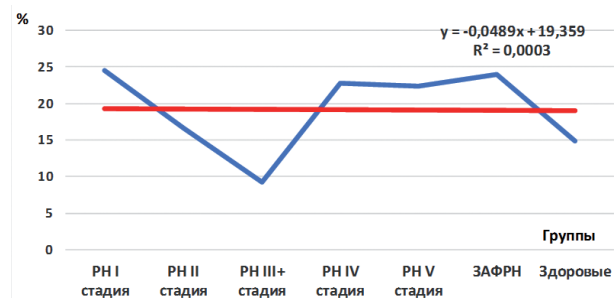


Рис. 9. График построенной полиномиальной линией тренда $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+CD127^{low}$ здоровых и больных с РН

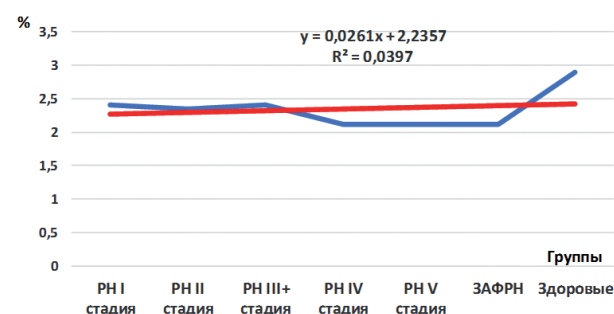


Рис. 10. График построенной полиномиальной линией тренда соотношения $CD4^+/CD8^+$ при РН и у здоровых доношенных

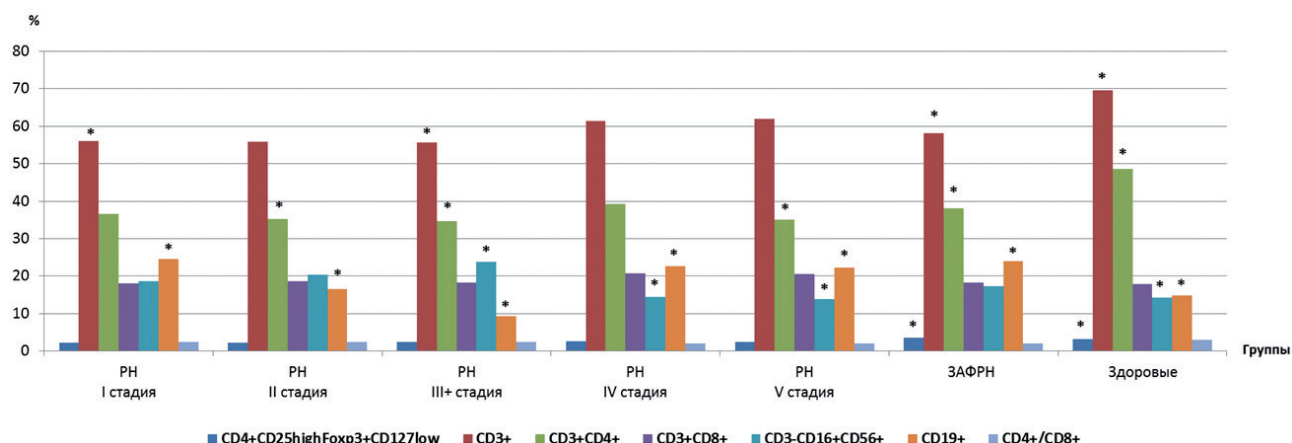


Рис. 11. Данные распределения стадий РН по сравнению со здоровыми при исследовании различных типов клеток и их соотношения

$p < 0,05$ — отмечено красными звездочками

Обсуждение результатов

Наиболее значимая линия тренда ($R^2=0,7$; не считая здоровых $R^2=0,9$) в полиномиальном построении выявилась при исследовании количественных уровней Т-регуляторных клеток $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^{low}$. По показателям определена статистически достоверная разница между стадиями РН и здоровыми. Самые низкие значения Трег обнаружены при РН в I, II и самой тяжёлой V стадии ($p < 0,05$), наиболее высокие – при ЗАФРН (ЗАРН) (они, очевидно, являются относительно повышенными для РН, учитывая пониженную норму Трег у недоношенных детей).

Использование в исследовании Т-клеток $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, НК-клеток $CD3^-CD16^+CD56^+$ может производиться для сравнения, но по стадиям РН они не различаются. Достоверные значения ($p < 0,05$; отмечено красными звёздочками) встречаются только при сравнении с группой здоровых.

В процессе изучения клеток $CD19^+$ (B-cells) значимо выделяется стадия РН III+ (более низкие значения) и показатели здоровых ($p < 0,05$).

Увеличение НК-клеток (натуральных киллеров) $CD3^-CD16^+CD56^+$ при РН III+ стадии может свидетельствовать о рецидиве инфекции или, возможно, заражении другой инфекцией, что можно расценить как предиктор прогрессирования ретинопатии у этих пациентов. При этом наблюдается пониженное количество В-клеток ($CD19^+$), ответственных за гуморальный иммунитет.

Является показательным, что при пониженных количественных уровнях $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^{low}$ (T-reg), $CD3^+$ и высокой экспрессии гена HIF происходит выраженное развитие РН.

Выводы исследования

При возникновении и быстром развитии РН происходит появление повышенной экспрессии гена HIF и наблюдаются значительные отличия ($p < 0,05$) по количественному уровню $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^{low}$ (T-reg), $CD3^+$ между группой контроля (доношенные дети) и недоношенными пациентами с учётом стадий РН. Для наших данных линия тренда лучше всего соответствует данным именно Трег.

При исследовании $CD19^+$ (B-cells) статистически значимо выделяются РН III+ стадия (в сторону понижения значений) и здоровые ($p < 0,05$).

Увеличение натуральных киллеров (NK-cells) ($CD3^-CD16^+CD56^+$) при РН III+ стадии может свидетельствовать о рецидиве инфекции или, возможно, заражении другой инфекцией, что можно расценить как предиктор прогрессирования ретинопатии именно у этих пациентов. При этом наблюдается пониженное количество В-клеток ($CD19^+$), ответственных за гуморальный иммунитет.

Повышенные показатели экспрессии гена HIF, свидетельствующие о тяжёлой ишемии тканей, а, следовательно, её повреждении и представлении иммунной системе организма, к тому же низкий уровень регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^{low}$, не способных регулировать иммунный ответ в достаточной степени, представляют собой значительные факторы патогенеза тяжёлых пролиферативных форм РН.

Определение уровней HIF и регуляторных Т-лимфоцитов $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+CD127^{low}$ мо-

жет входить в скрининговый тест, позволяющий прогнозировать дальнейшее течение ретинопатии недоношенных и, следовательно, способствовать правильному подбору комплексного лечения этого тяжёлого заболевания.

Финансирование. Это исследование не получило какого-либо конкретного гранта от финан-

сирующих агентств в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Было получено согласие от родителей в соответствии с принципами, одобренными этическим комитетом медицинского учреждения.

Литература

1. Балашова Л.М., Быковская С.Н., Кузнецова Ю.Д., и соавт. Количественные и функциональные нарушения показателей клеточного иммунитета у взрослых, соматически здоровых детей и больных ретинопатией недоношенных. Аллергология и иммунология. 2013;14(2):145-146.
2. Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T. Simultaneous analyses of vitreous levels of 27 cytokines in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*. 2009 Nov;116(11):2165-9. doi: 10.1016/j.ophtha.2009.04.026. Epub 2009 Aug 22. PMID: 19700197.
3. Modrzejewska M., Zdanowska O., Połubiński P. The Role of HIF-1α in Retinopathy of Prematurity: A Review of Current Literature. *J Clin Med*. 2024 Jul 10;13(14):4034. doi: 10.3390/jcm13144034.
4. Huang SQ, Cao KX, Wang CL, et al. Decreasing mitochondrial fission ameliorates HIF-1α-dependent pathological retinal angiogenesis. *Acta Pharmacol Sin*. 2024 Jul;45(7):1438-1450. doi: 10.1038/s41401-024-01262-3. Epub 2024 Apr 2. PMID: 38565961; PMCID: PMC11192750.
5. Plastino F, Pesce N.A., André H. MicroRNAs and the HIF/VEGF axis in ocular neovascular diseases // *Acta Ophthalmol*. 2021 Dec;99(8):e1255-e1262. doi:10.1111/aos.14845.
6. Vadlapatla R.K., Vadlapudi A.D., Mitra A.K. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a potential target for intervention in ocular neovascular diseases. *Curr Drug Targets*. 2013 Jul;14(8):919-35. doi:10.2174/13894501113149990015.
7. Uddin MI, Kilburn TC, Duvall CL, et al. Visualizing HIF-1α mRNA in a Subpopulation of Bone Marrow-Derived Cells to Predict Retinal Neovascularization. *ACS Chem Biol*. 2020 Nov 20;15(11):3004-3012. doi: 10.1021/acscchembio.0c00662. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33080135; PMCID: PMC8121337.
8. Балашова Л.М., Кузнецова Ю.Д., Лесовой С.В., и др. Сравнительное исследование количества Т-регуляторных клеток (CD4+CD25highFoxP3+CD127low) у пациентов до 1 года с катарактой, глаукомой и ретинопатией недоношенных (по обзорным данным собственных исследований). *Медицинская иммунология*. 2025;27(1):143-152. doi: https://doi.org/10.15789/1563-0625-ACS-2958.
9. Балашова Л.М., Лесовой С.В., Кузнецова Ю.Д., и др. Многофакторный анализ этиопатогенеза тяжелых пролиферативных стадий ретинопатии недоношенных. Сборник материалов III Российского форума с международным «Пролиферативный синдром в биологии и медицине». 2024:95-105.
10. Лесовой С.В., Серегина Е.А., Вуймо Т.А., и др. Многофакторный анализ патогенеза ранних прогрессирующих стадий ретинопатии недоношенных. *Современные технологии в офтальмологии* 2023;2:30. doi:10.25276/2312-4911-2023-2-30-39.

Сведения об авторах

Балашова Лариса Маратовна – д.м.н., профессор, зав. научно-исследовательской лабораторией детской офтальмологии ФГАОУ РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Генеральный директор, зав. Отделом экспериментальной и клинической офтальмологии Международного научно-практического центра пролиферации тканей. E-mail: blm1962@yandex.ru. ORCID 0000-0001-9349-7092.

Кузнецова Юлия Дмитриевна – к.м.н., врач офтальмологического отделения РДКБ – филиал ФГАОУ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, руководитель детской офтальмологической службы Международного научно-практического центра пролиферации тканей. E-mail: kuznecovay2011@mail.ru. ORCID 0000-0003-4985-7198.

Лесовой Сергей Валерьевич – заведующий офтальмологическим отделением РДКБ – филиал ФГАОУ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, научный сотрудник Отдела экспериментальной и клинической офтальмологии Международного научно-практического центра пролиферации тканей. E-mail: sergforester1@mail.ru. ORCID 0009-0006-9249-5013.

Альварес Мария Артуровна – научный сотрудник Отдела экспериментальной и клинической офтальмологии Международного научно-практического центра пролиферации тканей. E-mail: blm1962@yandex.ru. ORCID 0009-0006-1334-1746.

Кантаржи Елена Петровна – к.б.н., профессор, зав. Отделом статистики Международного научно-практического центра пролиферации тканей. E-mail: elena-kantardgy@yandex.ru. ORCID 0000-0001-7409-5127.

Быковская Светлана Нюневна – д.м.н., профессор, зав. Отделом регенеративной медицины ФГАОУ РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ. ORCID 0009-0005-8853-0317.

Салмаси Жан Мустафаевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии ФГАОУ РНИМУ им. Н.И. Пирогова. E-mail: profjms@yandex.ru. ORCID 000-0001-8524-0019.

Поступила 30.01.2025.