УДК 616.98:579.852.13]-097:616-036.882-08 doi:10.25298/2221-8785-2025-23-4-342-346

ОЦЕНКА УРОВНЯ МОЛЕКУЛЫ КЛАССА I ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ, СВЯЗАННОГО С ЦЕПЬЮ А (MICA) У ПАЦИЕНТОВ С КЛОСТРИДИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ОТДЕЛЕНИЯ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ

А. В. Лемеш[1, 2], Р. Э. Якубцевич[1, 2], А. В. Шульга[1]

[1]Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

[2]Гродненская университетская клиника, Гродно, Беларусь

Введение. Открытые в конце XX века гены локуса MIC характеризуются высоким полиморфизмом. Они играют важную роль в процессах межклеточного взаимодействия, участвуют в реализации реакций врожденного и адаптивного иммунитета в качестве лигандов для рецепторов NKG2D, экспрессированных на различных субпопуляциях Т-лимфоцитов. MICA может высвобождаться с поверхности опухолевых и инфицированных клеток после протеолитического расщепления, давая растворимые MICA (sMICA) в сыворотке. В норме MICA определяется в небольшом количестве на поверхности эндотелиальных клеток, фибробластов, моноцитов, синцитиотрофобластов и эпителиальных клеток, особенно в желудочно-кишечном тракте. Однако эта экспрессия повышается во время стрессовых состояний.

Цель. Определить характер экспрессии MICA в слизистой кишечника методом иммуногистохимии, а также уровень sMICA в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа у пациентов отделений анестезиологии и реанимации с клостридиальной инфекцией, индуцированной антибактериальными препаратами группы карбапенемов.

Материал и методы. Материалом для исследования стали биоптаты из пяти разных отделов толстой кишки у 10 пациентов отделения анестезиологии и реанимации (ОАиР) и 9 здоровых пациентов, а также 43 образца сыворотки крови, взятые у пациентов ОАиР с клостридиальной инфекцией на фоне приема карбапенемов. Количественное определение уровня MICA в сыворотке крови проводилось с помощью иммуноферментного анализа, оценка экспрессии MICA в биопсийном материале пациентов осуществлялась методом иммуногистохимии.

Результаты. При оценке экспрессии маркера в биопсийном материале пациентов с клостридиальной инфекцией и группе без патологии толстой кишки наблюдалась более выраженная реакция в слизистой у пациентов с клостридиальной инфекцией. При анализе показателей sMICA были получены следующие результаты: медианное значение составило 35,4 нг/мл; 95% ДИ: 105,6–162,7 нг/мл; 25–75% процентиль 25,9–66,1 нг/мл.

Выводы. Уровень MICA в сыворотке крови, а также в слизистой толстой кишки у пациентов с клостридиальной инфекцией ОАиР повышается при сравнении с контрольной группой.

Ключевые слова: *клостридиальная инфекция, MICA, sMICA, псевдомембранозный колит*

Для цитирования: *Лемеш, А. В. Оценка уровня молекулы класса I главного комплекса гистосовместимости, связанного с цепью А (MICA) у пациентов с клостридиальной инфекцией отделения интенсивной терапии / А. В. Лемеш, Р. Э. Якубцевич, А. В. Шульга // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2025. Т. 23, № 4. С. 342-346. https://doi.org/10.25298/2221-8785-2025-23-4-342-346*

Введение

Многочисленные исследования семейства главного комплекса гистосовместимости (MHC, Major histocompatibility complex), человеческого лейкоцитарного антигена (HLA, Human Leukocyte Antigen) привело к открытию в конце XX века MIC-генов (MHC class I chain related genes). Эта группа неклассических генов HLA, локализованных на коротком плече хромосомы 6 в непосредственной близости от HLA-B [1].

Существует семь локусов MIC от A до G, но только MICA и MICB транскрибируются и имеют высокий полиморфизм. Белки MICA действуют как лиганды для активирующего лектин-подобного рецептора C-типа, члена группы естественных киллеров 2D (NKG2D), который экспрессируется на NK-клетках, γδ Т-клетках и αβ CD8+ Т-клетках. Взаимодействие MICA с NKG2D приводит к активации цитотоксичности, опосредованной антигенспецифическими цитотоксическими Т-лимфоцитами и продукции цитокинов [2].

В норме MICA определяется в небольшом количестве на поверхности эндотелиальных клеток, фибробластов, моноцитов, синцитиотрофобластов и эпителиальных клеток, особенно в желудочно-кишечном тракте [3]. Однако эта экспрессия повышается во время стрессовых состояний, таких как ишемически-реперфузионное повреждение, вирусные инфекции, воспаление, опухолевая трансформация и трансплантация органов [4]. В дополнение к мембраносвязанной форме, MICA может высвобождаться с поверхности опухолевых и инфицированных клеток после протеолитического расщепления, давая растворимые MICA (sMICA) в сыворотке. Связываясь с рецептором NKG2D, растворимые молекулы MICA могут блокировать активацию эффекторных лимфатических клеток, тем самым облегчая уклонение опухолевых или инфицированных клеток от иммунного контроля [5]. У пациентов с некоторыми типами рака сывороточные уровни sMICA повышены, тогда как экспрессия NKG2D на NK

и/или CD8+ Т-клетках снижена. Таким образом, циркулирующий sMICA в кровотоке может играть важную биологическую роль в модуляции и регуляции иммунного ответа [6].

Данные относительно нормальных значений уровня sMICA в сыворотке в доступной литературе неоднозначны и сильно контрастируют между собой. Так, при измерении в одних группах здоровых добровольцев уровень sMICA не обнаруживался совсем, в других группах медианное значение варьировало от 0,039 до 251,5 пг/мл [7, 8, 9]. В представленном исследовании мы описываем результаты пациентов отделения интенсивной терапии с высоким уровнем клостридиальных токсинов, данные которых в доступной литературе ранее не встречались.

Цель исследования

Определить характер экспрессии MICA в слизистой кишечника методом иммуногистохимии, а также уровень sMICA в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа у пациентов отделений анестезиологии и реанимации с клостридиальной инфекцией, индуцированной антибактериальными препаратами группы карбапенемов.

Материал и методы

Материалом для исследования стали биоптаты из пяти разных отделов толстой кишки, полученные при проведении колоноскопии в рамках диагностического обследования у 10 пациентов отделения анестезиологии и реанимации (ОАиР) с клиническими проявлениями инфекции Clostridium difficile на фоне лечения антибактериальными препаратами группы карбапенемов и 9 здоровых пациентов, а также 43 образца сыворотки крови, взятые у пациентов ОАиР с клостридиальной инфекцией на фоне приема карбапенемов.

Количественное определение уровня MICA в сыворотке крови проводилось с помощью набора для иммуноферментного анализа MHC Class I Polypeptide Related Sequence A (MICA) ELISA. Построение калибровочной кривой проводилось на иммуноферментном анализаторе SUNRISE TECAN при длине волны 450 нм.

При проведении морфологического исследования биоптаты из каждого сегмента толстой кишки помещались в отдельный флакон и фиксировались в 10% нейтральном забуференном формалине, дегитратировались при помощи тканевого процессора в батарее спиртов и заключались в парафиновую среду. Из блоков были изготовлены серийные гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые окрашивались гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование материала проводили по стандартной методике с использованием кроличьих поликлональных антител к MICA (FineTest, FNab05176, разведение 1:200) и mouse/rabbit-DAB (Poly-HRP) Detection System (FineTest, IHC0009). Проводились положительные и отрицательные контрольные реакции. В качестве позитивного контроля ИГХ реакции использовали препараты слизистой желудка.

Перед окрашиванием срезы в вертикальном положении помещали в термостат на 60 минут при температуре 60°С. После этого осуществлялась депарафинизация в орто-ксилоле (в батарее из двух емкостей по 10 минут в каждой), регидратация в этиловом спирте нисходящей концентрации (в батарее из трех емкостей по 3 минуты в каждой) и промывание в дистиллированной воде. Предметные стекла со срезами переносили в подогретый демаскировочный буфер (pH 9,0) и помещали в водяную баню при температуре 98°С на 40 минут. После охлаждения до комнатной температуры препараты промывали в растворе трис-буфера при pH 7,4. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы обрабатывали 3% H_2O_2 в течение 30 минут. Для подавления неспецифического связывания антител, устранения фона препараты обрабатывали Protein Blok в течение 60 минут. Инкубацию с первичными антителами осуществляли в течение 12 часов при температуре 4°С. Использовали комплекс mouse/rabbit-DAB (Poly-HRP) Detection System в течение 60 минут при температуре 37°С. Непосредственно перед применением готовили рабочий раствор хромагена из расчета одна капля диаминобензидина на 1 мл азидного буфера (специфический продукт реакции окрашивался в коричневый цвет разной интенсивности). Затем срезы промывали проточной водой, докрашивали гематоксилином Майера по общепринятой методике и заключали в готовую синтетическую монтирующую среду (на основе акриловой смолы). После получения цифрового изображения (микроскоп CX43, камера OPTYKA C-P12) оценивалась экспрессия изучаемого маркера в максимальном количестве непересекающихся полей зрения с использованием объектива ×20 согласно разработанным алгоритмам.

Для оценки количества и степени окрашивания клеток использовали ручной подсчет и программы WCIF ImageJ и Aperio Image Scope. Выраженность экспрессии оценивали полуколичественным способом в баллах: 0 – отрицательная реакция, 1 балл – слабо выраженная, 2 балла – умеренно выраженная, 3 балла – резко выраженная реакция с исследуемыми антителами.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 12.0 для Windows, используя методы описательной и аналитической статистики.

Результаты и обсуждение

При морфологическом исследовании биоптатов нормальной слизистой оболочки толстой кишки из контрольной группы учитывали наличие одинакового просвета крипт, лимфоплазмоцитарная инфильтрация при этом была ограничена верхними участками слизистой оболочки, отсутствовали нейтрофилы в эпителии, допускалось наличие клеток Панета в дне крипт правых отделов толстой кишки (рис. 1Б).

При гистологическом исследовании слизистой при псевдомембранозном колите отмечалось наличие слоистых псевдомембран, состоящих из воспалительного экссудата с фибрином и некротизированными эпителиальными клетками. При малом увеличении экссудат, исходящий из нижележащих крипт, напоминал «извержение вулкана». Подлежащие крипты были расширены, заполнены детритом или слизью с нейтрофилами. Часто наблюдались фибриновые тромбы в просвете сосудов. В некоторых случаях имел место только очаговый активный колит с редкими крипт-абсцессами, но без наличия псевдомембран (рис. 1А).

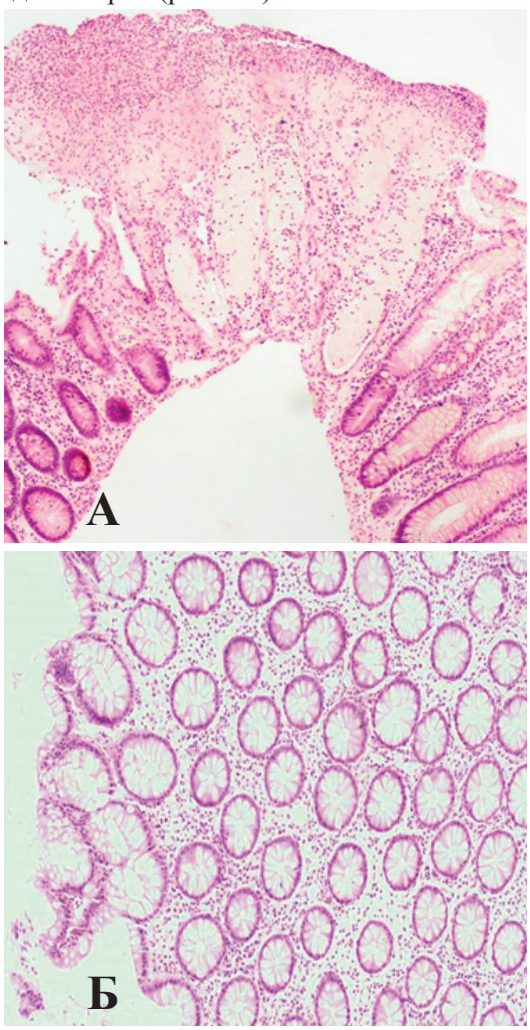

Рисунок 1 – Гистологическая характеристика колита, вызванного клостридиальной инфекцией (А) и биоптатов контрольной группы (Б) (окраска гематоксилином и эозином, ×200)

Figure 1 – Histological characteristics of colitis caused by clostridial infection (A) and biopsies of the control group (B) (hematoxylin and eosin staining, ×200)

При оценке экспрессии маркера в биопсийном материале пациентов с клостридиальной инфекцией и группе без патологии толстой кишки (группа сравнения), наблюдалась более выраженная реакция в слизистой (стромальные клетки, клетки воспалительного инфильтрата) (рис. 2).

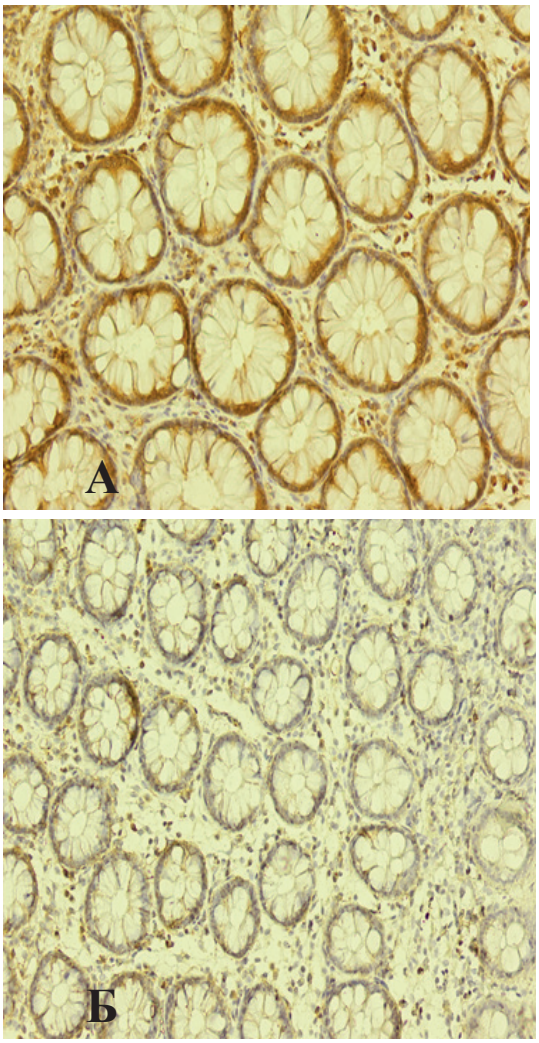

Рисунок 2 – Иммуногистохимическое окрашивание антителами к MICA, хромоген – ДАБ, контроокрашивание ядер – гематоксилин, в слизистой толстой кишки группы (опытной группы) (А) (×200) и контрольной группы (Б) (×100)

Figure 2 – Immunohistochemical staining with antibodies to MICA, chromogen - DAB, counterstaining of nuclei – hematoxylin, in the colon mucosa of the group (experimental group) (A) (×200) and the control group (B) (×100)

Необходимо отметить, что реакция с антителами к MICA в группе с патологией нарастала при оценке биопсий из проксимальных и дистальных отделов кишечника у одного пациента (рис. 3).

При оценке статистически значимых различий среди исследуемых групп проводилось сравнение между медианами экспрессии MICA не в отдельно взятом участке, а кишечнике в целом. При этом экспрессия оценивалась как в эпителии, так и в строме. При анализе было получено статистически значимое различие между показателями контрольной и опытной групп (U=19, p=0,04).

При анализе показателей sMICA были получены следующие результаты: медианное значение составило 35,4 нг/мл; 95% ДИ: 105,6–162,7 нг/мл; 25–75% процентиль 25,9–66,1 нг/мл. Полученные данные свидетель-

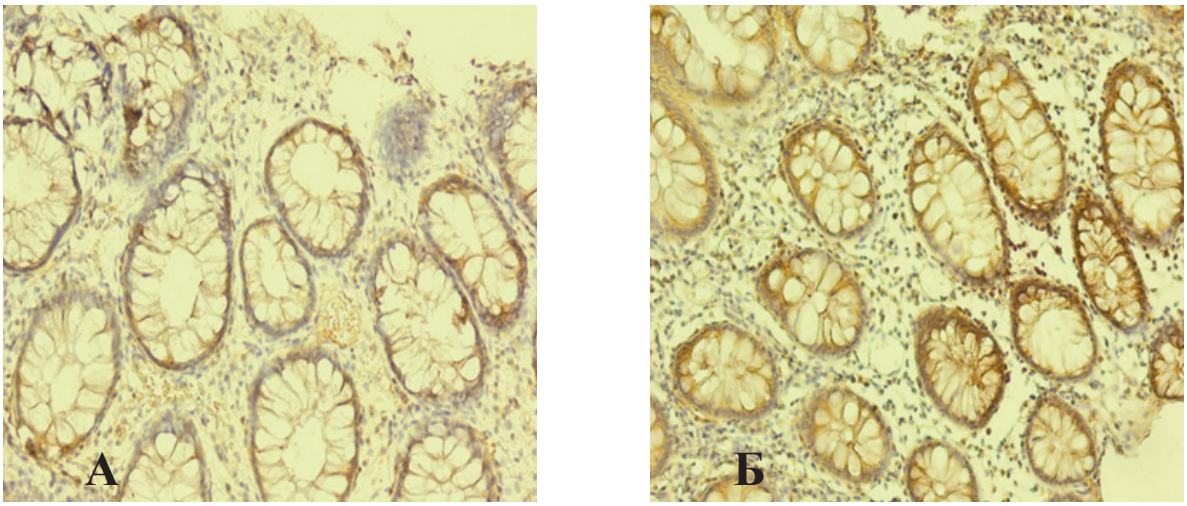

Рисунок 3 – Экспрессия антител к MICA, хромоген – ДАБ, контроокрашивание ядер – гематоксилин, в проксимальных отделах слизистой толстой кишки группы с клостридиальной инфекцией (А) (×200) в дистальных отделах слизистой толстой кишки группы с поражением (Б) (×100)

Figure 3 – Expression of antibodies to MICA, chromogen – DAB, counterstaining of nuclei – hematoxylin, in the proximal parts of the colon mucosa of the group with clostridial infection (A) (×200) in the distal parts of the colon mucosa of the group with damage (B) (×100)

ствуют о том, что повышенное выделение молекул MICA, предположительно из инфицированных/воспалительных клеток, может развиваться при клостридиальной инфекции и приводить к наблюдаемому повышению sMICA в сыворотке. Учитывая литературные данные, результаты предыдущих исследований, в которых отмечались повышение уровня изучаемого маркера при многих, но не всех инфекционных заболеваниях, можно предположить, что степень повышения sMICA потенциально связана либо с патогенами, либо с количеством вовлеченных инфицированных клеток в организме. Соответственно, ингибирование продукции sMICA и/или предотвращение их выхода с поверхности клеток может иметь терапевтический потенциал при лечении и профилактике у пациентов с антибиотик-ассоциированной диареей, вызванной карбапенемами.

Заключение

Настоящим исследованием показано, что применение антибактериальной терапии с использованием антибиотиков группы карбапенемов приводит к повышению уровня MICA в сыворотке крови и слизистой толстой кишки, что может указывать на повреждающее воздействие слизистой кишечника данной группы антибиотиков.

Литература

1. Зайцева, Г. А. Полиморфизм генов MICA и MICB в комплексе MHC / Г. А. Зайцева, А. Н. Киселева, И. В. Парамонов // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Т. 61, № 2. – С. 100-104. – doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-2-100-104. – edn: VZVYFX.
2. Baranwal, A. K. Major histocompatibility complex class I chain-related A (MICA) molecules: relevance in solid organ transplantation / A. K. Baranwal, N. K. Mehra // Front Immunol. – 2017. – Vol. 8. – Art. 182. – doi: 10.3389/fimmu.2017.00182. eCollection 2017.
3. Major histocompatibility complex class I related chain A (sMICA) levels influence graft outcome following renal transplantation / A. K. Baranwal, S. Goswami, D. K. Bhat [et al.] // Hum Immunol. – 2018. – Vol. 79, № 3. – P. 160-165.
4. Salih, H. R. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact / H. R. Salih, S. Holdenrieder, A. Steinle // Front Biosci. – 2008. – Vol. 13. – P. 3448-3456. – doi: 10.2741/2939.
5. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation / V. Groh, J. Wu, C. Yee, T. Spies // Nature. – 2002. – Vol. 419, № 6908. – P. 734-738. – doi: 10.1038/nature01112.
6. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells / V. Groh, R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker [et al.] // Nat Immunol. – 2001. – Vol. 2, № 3. – P. 255-260. – doi: 10.1038/85321.
7. A comparative study of sMICA in various body fluids of diagnosed cervical cancer patients and healthy women / P. A. Pachani, R. R. Godbole, J. Kshersagar [et al.] // Obstet Gynecol Sci. – 2022. – Vol. 65, № 1. – P. 37-45. – doi: 10.5468/ogs.21121.
8. Soluble MICA in malignant diseases / S. Holdenrieder, P. Stieber, A. Peterfi [et al.] // Int J Cancer. – 2006. – Vol. 118, № 3. – P. 684-687. – doi: 10.5468/ogs.21121.
9. Quantification of anti-sperm antibody and soluble MICA/MICB levels in the serum of infertile people of the Li ethnic group in China / X. Wei, Z. Han, B. Ren [et al.] // Int J Clin Exp Med. – 2015. – Vol. 8, № 10. – P. 19274-19281.

References

1. Zaitseva GA, Kiseleva AN, Paramonov IV. Major histocompatibility complex class I chain-related gene A (MICA) and B (MICB) polymorphism. *Russian journal of hematology and transfusiology*. 2016;61(2):100-104. doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-2-100-104. – edn: VZVYFX. (Russian).

2. Baranwal AK, Mehra NK. Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related A (MICA) Molecules: Relevance in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol.* 2017;8:182. doi: 10.3389/fimmu.2017.00182.
3. Baranwal AK, Goswami S, Bhat DK, Kaur G, Agarwal SK, Mehra NK. Soluble Major Histocompatibility Complex Class I related Chain A (sMICA) levels influence graft outcome following Renal Transplantation. *Hum Immunol*. 2018;79(3):160-165. doi: 10.1016/j.humimm.2018.01.001.
4. Salih HR, Holdenrieder S, Steinle A. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Front Biosci*. 2008;13:3448-3456. doi: 10.2741/2939.
5. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002;419(6908):734-738. doi: 10.1038/nature01112.
6. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001;2(3):255-260. doi: 10.1038/85321.
7. Pachani P, Godbole RR, Kshersagar J, Jagdale R, Gosavi A, Patil S, Sharma RK, Joshi MG. A comparative study of sMICA in various body fluids of diagnosed cervical cancer patients and healthy women. *Obstet Gynecol Sci*. 2022;65(1):37-45. doi: 10.5468/ogs.21121.
8. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer*. 2006;118(3):684-687. doi: 10.1002/ijc.21382.
9. Wei X, Han Z, Ren B, Xiao X, Li F, Lin D, Luo B, Fu X, Li C, Xia H, Yu P. Quantification of anti-sperm antibody and soluble MICA/MICB levels in the serum of infertile people of the Li ethnic group in China. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(10):19274-19281.

ASSESSMENT OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I CHAIN-RELATED A (MICA) MOLECULE LEVELS IN INTENSIVE CARE UNIT PATIENTS WITH CLOSTRIDIAL INFECTION

A. V. Lemesh[1, 2], R. E. Yakubtsevich[1, 2], A. V. Shulga[1]

[1]Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

[2]Grodno University Clinic, Grodno, Belarus

Background. The genes of the MIC locus discovered at the end of the 20th century are characterized by high polymorphism. They play an important role in the processes of intercellular interaction, participate in the implementation of innate and adaptive immunity reactions as ligands for the NKG2D receptors expressed on various subpopulations of T-lymphocytes. MICA can be released from the surface of tumor and infected cells after proteolytic cleavage, yielding soluble MICA (sMICA) in serum. MICA is normally detected in low amounts on the surface of endothelial cells fibroblasts monocytes syncytiotrophoblast and epithelial cells especially in the gastrointestinal tract. However this expression increases during stress conditions.

Objective. To determine the nature of MICA expression in the intestinal mucosa using immunohistochemistry, as well as the level of sMICA in the blood serum using enzyme immunoassay in patients of the Anesthesiology and Intensive Care Units with clostridial infection induced by antibacterial drugs of the carbapenem group.

Results. When assessing the marker expression in biopsy material of patients with clostridial infection and a group without colon pathology, a more pronounced reaction in the mucosa was observed in patients with clostridial infection. When analyzing sMICA indicators, the following results were obtained: the median value was 35.4 ng / ml; 95% confidence interval 105.6-162.7; 25-75% percentile 25.9-66.1.

Conclusions. The level of MICA in the blood serum, as well as in the colonic mucosa, in patients with clostridial infection of the AIC units increases when compared with the control group.

***Keywords**. clostridial infection, MICA, sMICA, pseudomembranous colitis.*

***For citation:** Lemesh AV, Yakubtsevich RE, Shulga AV. Assessment of class I major histocompatibility complex-associated chain A (MICA) molecule levels in intensive care unit patients with clostridial infection. Journal of the Grodno State Medical University. 2025;23(4):342-346. https://doi.org/10.25298/2221-8785-2025-23-4-342-346*

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта «Разработка персонифицированного подхода в лечении антибиотик-ассоциированной диареи на основании генетических предикторов ее развития у пациентов с сепсисом» № гос. регистрации 20231275.
Financing. The study was conducted with the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research within the framework of the scientific project “Development of a personalized approach to the treatment of antibiotic-associated diarrhea based on genetic predictors of its development in patients with sepsis” state registration number 20231275.

Об авторах / About the authors
*Лемеш Антон Викторович / Lemesh Anton, e-mail: anton_lemesh@mail.by, ORCID: 0000-0002-9541-6521
Якубцевич Руслан Эдвардович / Yakubtsevich Ruslan, ORCID: 0000-0002-8699-8216
Шульга Андрей Васильевич / Shulga Andrey, ORCID: 0000-0003-1917-1101
** – автор, ответственный за переписку / corresponding author*

Поступила / Received: 06.03.2025 *Принята к публикации / Accepted for publication: 26.06.2025*