

ISSN 1563-0625 (print)  
ISSN 2313-741X (online)

Том 25, № 2. С. 227-426

2023

Официальный журнал  
Санкт-Петербургского Регионального Отделения  
Российской Ассоциации  
Аллергологов и Клинических Иммунологов

# МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

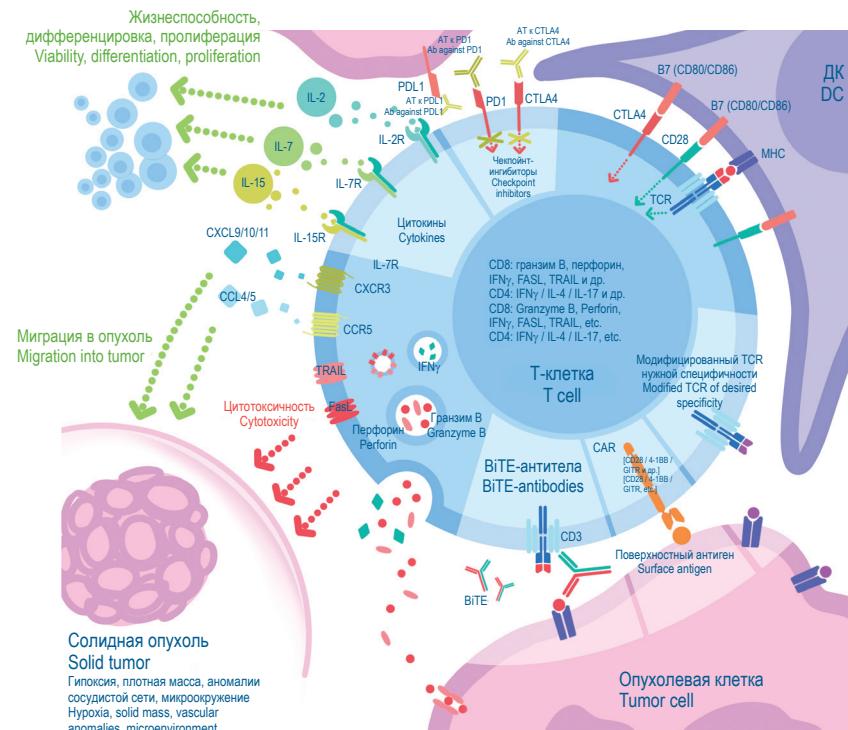


Рисунок 1. Использование потенциала эффекторных Т-лимфоцитов для борьбы с солидными опухолями

Примечание. На рисунке представлены молекулы, вовлеченные в процессы активации/анергии Т-клеток, цитотоксичности, пролиферации и дифференцировки, миграции в очаг воспаления и опухолевой инфильтрации. Представлены технологии воздействия на перечисленные эндогенные процессы, использующиеся для усиления противоопухолевого ответа, такие как использование блокаторов чекпойнт-молекул (антитела (AT) к PD1, PDL1, CTLA4) биспецифических BiTE-антител, получение химерного антигенного рецептора (CAR), молекулярное клонирование TCR-рецептора заданной специфичности, цитокинотерапия.

Эффективность монотерапии каждого из перечисленных подходов ограничена при применении к солидным опухолям ввиду таких факторов, как иммunoисупрессивное микроокружение опухоли, плотность опухолевой стромы, гипоксия и появление аномальных сосудистых сетей внутри опухоли.

Figure 1. Using the potential of effector T lymphocytes to fight solid tumors

Note. The figure shows the molecules involved in the processes of T cell activation/anergy, cytotoxicity, proliferation and differentiation, migration to the focus of inflammation, and tumor infiltration. Technologies for influencing the listed endogenous processes used to enhance the antitumor response are presented, such as the use of checkpoint molecule blockers (antibodies (Ab) against PD1, PDL1, CTLA4) of bispecific BiTE antibodies, the production of a chimeric antigen receptor (CAR), and molecular cloning of a TCR receptor of a given specificity, cytokine therapy.

The effectiveness of monotherapy of each of these approaches is limited when applied to solid tumors due to factors such as the immunosuppressive tumor microenvironment, tumor stroma density, hypoxia, and the appearance of abnormal vascular networks within the tumor.

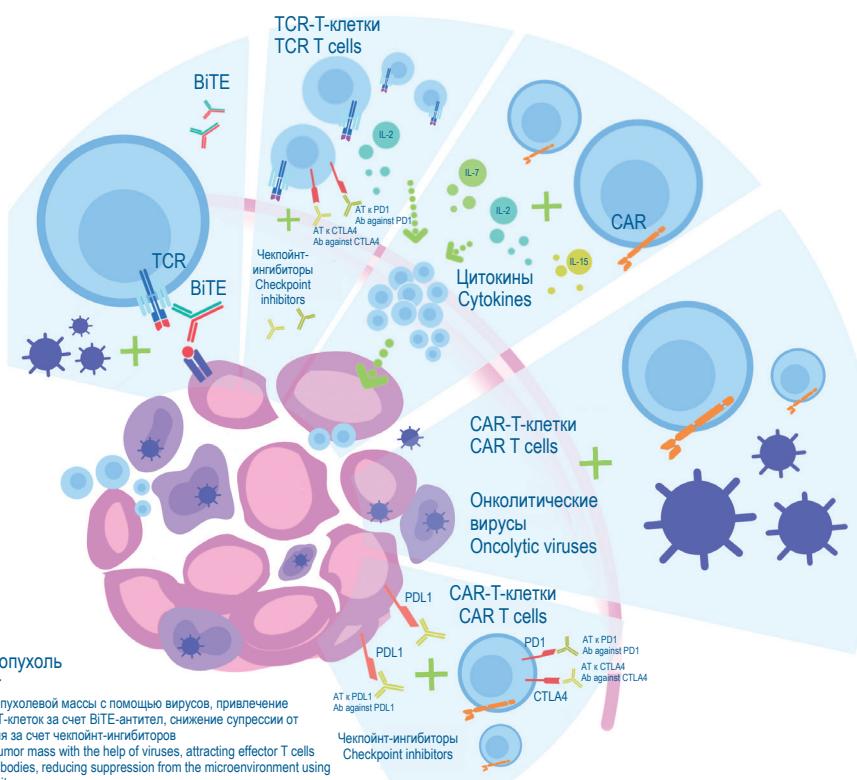


Рисунок 2. Комбинированная иммунотерапия солидных опухолей

Примечание. Совмещение различных подходов к Т-клеточной противоопухолевой иммунотерапии позволяет добиться более выраженных результатов в отношении борьбы с солидными опухолями.

Figure 2. Combined immunotherapy for solid tumors

Note. The combination of different approaches to T cell antitumor immunotherapy makes it possible to achieve more pronounced results in the fight against solid tumors.

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
РОССИЙСКОЙ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕРГОЛОГОВ И КЛИНИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГОВ  
(СПб РО РААКИ)

# МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

март-апрель

**2023, том 25**

**№ 2**

---

Основан в марте 1999 года

## **Главный редактор**

**Фрейдлин Ирина Соломоновна** – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

## **Заместитель главного редактора**

**Тотолян Арг Артемович** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии, Санкт-Петербург, Россия

## **Редакционная коллегия**

**Горячкина Людмила Александровна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической аллергологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

**Кашкин Кирилл Павлович** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

**Козлов Владимир Александрович** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

**Корнева Елена Андреевна** – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

**Мазуров Вадим Иванович** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, президент Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова Минздрава России, заведующий кафедрой терапии и ревматологии имени Э.Э. Эйхвальда, Санкт-Петербург, Россия

**Караулов Александр Викторович** – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии, Москва, Россия

**Недоспасов Сергей Артурович** – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии МГУ им. М.В. Ломоносова и заведующий отделом молекулярной иммунологии в Институте физико-химической биологии им. Белозерского МГУ, Москва, Россия

## **Ответственный секретарь:**

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spbraaci.ru

## **Редактор перевода:**

д.м.н. Чухловин А.Б.

## **Редактор электронной версии:**

Ерофеева В.С.

## **Редакция:** тел./факс (812) 233-08-58

## **Адрес для корреспонденции:**

197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

**Электронная версия:** [www.mimmutn.ru](http://www.mimmutn.ru); [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

© Медицинская иммунология

Журнал зарегистрирован Северо-Западным региональным управлением Государственного комитета РФ по печати 26 марта 1999 г. Свидетельство о регистрации № П 3612.

Министерством РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций 30 июня 2003 г.

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №ФС77-60436 30 декабря 2014 г.

Данный материал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 License.

Издательство «Человек»

199004, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О., 26, оф. 3.

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

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 28.03.2023 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 028

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

199178, Санкт-Петербург, 8-я линия В.О., 83, корп. 1, Литер А

Тел.: (812) 950-10-99.

**С 2001 года журнал «Медицинская иммунология» регулярно входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.**

**С 2016 года журнал «Медицинская иммунология» включен в международную базу SCOPUS.**

**Пинегин Борис Владимирович** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунодиагностики и иммунокоррекции ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

**Симбирцев Андрей Семенович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель Государственного НИИ особо чистых биопрепараторов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Смирнов Вячеслав Сергеевич** – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель Медико-биологического научно-производственного комплекса «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

**Черных Елена Рэмовна** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Новосибирск, Россия

## **Редакционный совет**

**Ласунская Елена** – доктор медицинских наук, профессор, Государственный университет Северной Флориды, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

**Мароди Ласло** – доктор медицинских наук, профессор, Университет Дебрецена, Медицинский научный центр, Отдел инфекционной и педиатрической иммунологии, Дебрецен, Венгрия

**Михалек Ярослав** – доктор медицинских наук, Университет города Брно, заведующий кафедрой фармакологии медицинского факультета, Брно, Чехия

**Роггенбук Дирк** – доктор медицинских наук, профессор, Университет Лаузиц «University of Applied Sciences», Зенфтенберг, Германия

**Сеонг Сеунг-Йонг** – доктор медицинских наук, Национальный Университет, руководитель кафедры микробиологии и иммунологии, Сеул, Корея

**Тендлер Евгений** – доктор медицинских наук, Медицинский центр Рамбам, Отдел клинической биохимии, Хайфа, Израиль

**Фейст Евгений** – доктор медицинских наук, Университет Гумбольдта, клиника «Шарите», руководитель отделения ревматологии и клинической иммунологии, Берлин, Германия

**Халдояниди Софья** – доктор медицинских наук, профессор, Институт молекулярных исследований, Сан-Диего, Калифорния, США

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,  
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH  
(SPb RAACI)

---

# **MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA**

March-April

**2023, volume 25**

---

**No. 2**

Published since March 1999

## **Editor-in-Chief**

**Irina S. Freidlin** – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

## **Deputy Editor-in-Chief**

**Areg A. Totolian** – PhD, MD, Professor, RAS full member, Saint Petersburg Pasteur Institute, Director, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

## **Editorial Board**

**Ludmila A. Goriachkina** – PhD, MD, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Clinical Allergology, Chief, Moscow, Russian Federation

**Kirill P. Kashkin** – PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

**Vladimir A. Kozlov** – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Scientific Director, Novosibirsk, Russian Federation

**Elena A. Korneva** – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Pathology and Pathophysiology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

**Vadim I. Mazurov** – PhD, MD, Professor, RAS full member, Northwestern State Medical University, President, Department of Therapy and Rheumatology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

**Alexander V. Karaulov** – PhD, MD, Professor, RAS full member, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Department of Clinical Immunology and Allergology, Chief, Moscow, Russia

**Sergei A. Nedospasov** – PhD, Professor, RAS full member, Lomonosov State University, Department of Immunology, Chief, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Department of Molecular Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

**Boris V. Pinegin** – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnostics and Immunotherapy, Chief, Moscow, Russian Federation

**Andrei S. Simbirtsev** – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Scientific Director, St. Petersburg, Russian Federation

**Viacheslav S. Smirnov** – PhD, MD, Professor, "Cytomed" Ltd., Director on Science, St. Petersburg, Russian Federation

**Elena R. Chernykh** – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Deputy-director on Science, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Chief, Novosibirsk, Russian Federation

## **Editorial Council**

**Eugen Feist** – PD, MD, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Free University and Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany

**Sophia Khaldoyanidi** – PhD, MD, Associate Member, Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA, USA

**Elena Lasunskaya** – PhD, MD, Associated Professor, Laboratory of Biology of Recognition, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil

**László Maródi** – PhD, MD, Professor, Department of Infectious and Pediatric Immunology, University of Debrecen Medical and Health Science Centre, Debrecen, Hungary

**Jaroslav Michálek** – PhD, MD, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

**Dirk Roggenbuck** – PhD, MD, Professor, Lausitz University of Applied Sciences, Senftenberg, Germany

**Seung-Yong Seong** – PhD, MD, Seoul National University, Associate Dean for Planing, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

**Yevgeny Tendler** – PhD, MD, Department of Clinical Biochemistry, Rambam Medical Center, Haifa, Israel

## *Managing Editor:*

Natalia Rakitianskaia  
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

## *Translation editor:*

Alexey B. Chukhlovin, PhD, MD

## *Online version editorial manager:*

Erofeeva V.S.

**Editorial Office: phone/fax** +7 812 233-08-58

## **Address for correspondence:**

197101, St. Petersburg, P.O. Box 130.

**Electronic version:** [www.mimmmun.ru](http://www.mimmmun.ru); [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

Broadcasting and Mass media of the Russian Federation, June 30, 2003.

Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (ROSKOMNADZOR)

Certificate on registration of mass media PI №FS77-60436, December 30, 2014

This material is distributed under the Creative Commons Attribution 4.0 License.

Chelovek Publishing House

199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyi ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

Phone/fax: (812) 325-25-64.

Passed for printing 28.03.2023. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 25. Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 8 line of Vasilievsky Island, 83/1-A

Phone: (812) 950-10-99

**Since 2001, the Medical Immunology Journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific Journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science.**

**Since 2016, the Medical Immunology Journal is included into international SCOPUS database.**

## СОДЕРЖАНИЕ

### Обзоры

Ибрагимов Б.Р., Скибо Ю.В., Абрамова З.И.

АУТОФАГИЯ И LC3-АССОЦИИРОВАННЫЙ ФАГОЦИТОЗ: СХОДСТВА И РАЗЛИЧИЯ ..... 233

Шевченко Ю.А., Назаров К.В., Сенников С.В.

КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ФЕТО-МАТЕРИНСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ ..... 253

Кузнецова М.С., Шику Хироши, Карапулов А.В., Сенников С.В.

СОВРЕМЕННЫЕ Т-КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИММУНОТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ ..... 271

### Оригинальные статьи

Булавинцева Т.С., Юшков Б.Г., Данилова И.Г., Абидов М.Т.

ВЛИЯНИЕ МАКРОФАГОВ НА ИНСУЛИНСИНТЕЗИРУЮЩУЮ СИСТЕМУ В НОРМЕ И ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ ..... 287

Лебедева А.И., Гареев Е.М., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С., Муслимов С.А., Попов С.В.

АЛЛОГЕННЫЙ БИОМАТЕРИАЛ – ИНГИБИТОР ФИБРОЗА В ИШЕМИЧЕСКИ ПОВРЕЖДЕННОМ МИОКАРДЕ ..... 301

Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Мовчан Л.В., Зафранская М.М., Шман Т.В.

ВЛИЯНИЕ АЗИТРОМИЦИНА НА МИГРАЦИЮ НК-КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ

БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ ..... 309

Черевко Н.А., Худякова М.И., Климов В.В., Новиков П.С., Никитина А.А., Березовская К.В., Кошарова Н.С., Денисов А.А.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФЕНОТИПЫ ТЕЧЕНИЯ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА ..... 319

Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И., Черных В.В., Ермакова О.В., Трунов А.Н.

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ MMP2, MMP3, MMP9 И ТКАНЕВЫХ

ИНГИБИТОРОВ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ TIMP1, TIMP2 У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ ..... 331

Мохонова Е.В., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., Новиков Д.В., Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Неумоина М.В., Трошина Т.А.,

Шутова И.В., Новиков В.В.

УРОВЕНЬ АУТОАНТИТЕЛ В КРОВИ ИНФИЦИРОВАННЫХ *H. PYLORI* БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ ..... 339

Пичугова С.В., Лагерева Ю.Г., [Бейкин Я.Б.]

ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ЭЯКУЛЯТА У ПОДРОСТКОВ С ВАРИКОЦЕЛЕМ ..... 349

Студеникина А.А., Михайлова Е.С., Архипов С.А., Вараксин Н.А., Прокура А.В., Аутеншлюс А.И.

БИОМАРКЕРЫ КРОВИ И МАРКЕР ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ..... 357

Ерешенко А.А., Гусакова О.А., Мигачева Н.Б., Гильмиярова Ф.Н., Лямин А.В.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИСХОДА ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ КОРИ У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ ..... 367

Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Боброва З.В., Орлова Е.А., Крылов А.С., Мосейкин И.А.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ПЕРЕУТОМЛЕНИЯ

В СПОРТЕ ..... 377

### Краткие сообщения

Цыпленкова Е.С., Вязовая Е.А., Даниленко Е.Д.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК НА АКТИВНОСТЬ МЫШИНЫХ СПЛЕНОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ  
ЦИТОМЕТРИИ ..... 387

Сысоева Г.М., Гамалей С.Г., Есина Т.И., Даниленко Е.Д.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО  
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА ..... 395

Пивоварова Л.П., Осипова И.В., Аристкина О.Б., Орлова О.В.

НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ У ПОСТРАДАВШИХ С ОЖОГОВОЙ ТРАВМОЙ ..... 403

Галиев Р.С., Дробленков А.В.

ГИПОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ВЫСОКОГОРЬЯ И ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЗАКОН ..... 409

Радыгина Т.В., Сорокина Е.Г., Петричук С.В., Купцова Д.Г., Курбатова О.В., Потапов А.С., Афанасьев С.А.

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗЫ CD39 В РЕГУЛЯТОРНЫХ  
Т-КЛЕТКАХ У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА ..... 415

Правила для авторов ..... 423

Авторский указатель ..... 426

Предметный указатель ..... 426

## CONTENTS

### Reviews

Ibragimov B.R., Skibo Yu.V., Abramova Z.I.

AUTOPHAGY AND LC3-ASSOCIATED PHAGOCYTOSIS: SIMILARITIES AND DIFFERENCES ..... 233

Shevchenko Yu.A., Nazarov K.V., Sennikov S.V.

CELLULAR MECHANISMS FOR MAINTENANCE OF FETOMATERNAL TOLERANCE DURING PREGNANCY ..... 253

Kuznetsova M.S., Shiku Hiroshi, Karaulov A.V., Sennikov S.V.

MODERN T CELL TECHNOLOGIES FOR IMMUNOTHERAPY OF SOLID TUMORS ..... 271

### Original articles

Bulavintseva T.S., Yushkov B.G., Danilova I.G., Abidov M.T.

INFLUENCE OF MACROPHAGES ON THE INSULINSYNTHESIZING SYSTEM UNDER NORMAL CONDITIONS  
AND IN ALLOXAN DIABETES ..... 287

Lebedeva A.I., Gareev E.M., Afanasyev S.A., Kondratyeva D.S., Muslimov S.A., Popov S.V.

ALLOGENEIC BIOMATERIAL: A FIBROSIS INHIBITOR IN ISCHEMIC MYOCARDIAL DAMAGE ..... 301

Kadushkin A.G., Tahanovich A.D., Movchan L.V., Zafranskaya M.M., Shman T.V.

EFFECT OF AZITHROMYCIN ON MIGRATION OF PERIPHERAL BLOOD NK CELLS FROM PATIENTS WITH CHRONIC  
OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE ..... 309

Cherevko N.A., Khudiakova M.I., Klimov V.V., Novikov P.S., Nikitina A.A., Berezovskaya K.V., Koshkarova N.S., Denisov A.A.

CLINICAL-IMMUNOLOGICAL PHENOTYPES OF THE AUTISTIC SPECTRUM DISORDERS ..... 319

Shevchenko A.V., Prokofiev V.F., Konenkov V.I., Chernykh V.V., Ermakova O.V., Trunov A.N.

COMPLEX STUDIES ON GENE POLYMORPHISMS OF MMP2, MMP3, MMP9 MATRIX METALLOPROTEINASES AND TIMP1,  
TIMP2 TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES IN THE PATIENTS WITH PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA ..... 331

Mokhonova E.V., Lapin V.A., Melentyev D.A., Novikov D.V., Neumoina N.V., Perfilova K.M., Neumoina M.V.,  
Troshina T.A., Shutova I.V., Novikov V.V.

AUTOANTIBODY LEVELS IN BLOOD OF H. PYLORI-INFECTED PATIENTS WITH CHRONIC GASTRITIS ..... 339

Pichugova S.V., Lagereva Yu.G., [Beikin Ya.B.]

EVALUATION OF CYTOKINE PROFILE OF EJACULATE IN ADOLESCENTS WITH VARICOCELE ..... 349

Studenikina A.A., Mikhaylova E.S., Arkhipov S.A., Varaksin N.A., Proskura A.V., Autenshlyus A.I.

BLOOD BIOMARKERS AND KI-67 PROLIFERATION MARKER IN BREAST CANCER ..... 357

Ereshchenko A.A., Gusyakova O.A., Migacheva N.B., Gilmiyarova F.N., Lyamin A.V.

OUTCOME PREDICTION OF THE MEASLES VACCINATION IN HEALTHCARE EMPLOYEES ..... 367

Myagkova M.A., Petrochenko S.N., Bobrova Z.V., Orlova E.A., Krylov A.S., Moseikin I.A.

STUDY OF HUMORAL IMMUNITY INDICES FOR ASSESSING PHYSICAL EXHAUSTION IN SPORTS ..... 377

### Short communications

Tsyplenkova E.S., Vyazovaya E.A., Danilenko E.D.

STUDYING THE EFFECT OF DOUBLE-STRANDED RNA UPON ACTIVITY OF MOUSE SPLENOCYTES USING FLOW  
CYTOMETRY ..... 387

Sysoeva G.M., Gamaley S.G., Esina T.I., Danilenko E.D.

IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE-MACROPHAGE  
COLONYSTIMULATING FACTOR ..... 395

Pivovarova L.P., Osipova I.V., Ariskina O.B., Orlova O.V.

NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN THE PATIENTS WITH BURN INJURY ..... 403

Galiev R.S., Drobilenkov A.V.

HYPOSENSITIZING EFFECT OF HIGH ALTITUDE AND IMMUNOGENETIC LAW ..... 409

Radygina T.V., Sorokina E.G., Petrichuk S.V., Kuptsova D.G., Kurbatova O.V., Potapov A.S., Afanasyeva S.A.

EVALUATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF CD39 ECTONUCLEOTIDASE IN REGULATORY T CELLS  
IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES ..... 415

Instructions to Authors ..... 423

Author index ..... 426

Subject index ..... 426

# АУТОФАГИЯ И LC3-АССОЦИИРОВАННЫЙ ФАГОЦИТОЗ: СХОДСТВА И РАЗЛИЧИЯ

Ибрагимов Б.Р., Скибо Ю.В., Абрамова З.И.

Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

**Резюме.** Ранее аутофагия представлялась в качестве механизма, используемого клеткой при дефиците питательных веществ, необходимого для сохранения гомеостаза. Результаты исследований последнего десятилетия показали, что аутофагия является более сложным, неоднозначным механизмом, активация которого зависит от природы стимула, типа иммунных клеток и конечного результата. И каноническая и схожая с ней молекулярно, но имеющая свои отличительные черты неканоническая аутофагия являются ключевыми процессами в защите организма от проникновения внутриклеточных патогенов, поддержание в клетке необходимого уровня питательных веществ и удаление поврежденных органелл и клеток. Каноническая аутофагия, вероятно, развилась как гомеостатический ответ на клеточный стресс и недостаток питательных веществ, а неканоническая — в ответ на давление воспаления. Неканоническая аутофагия, именуемая в дальнейшем LC3-ассоциированный фагоцитоз (LAP), сочетает в себе молекулярный механизм фагоцитоза с механизмом аутофагии, характеризующейся поглощением экзогенных патогенов, формированием фагосомы (лапосом) и усиленным слиянием с лизосомами, с последующей деградацией содержащего.

Существуют различия в процессах не канонической и схожей с ней по своему механизму действия канонической аутофагии. Наличие Р13К комплексов в обоих процессах, утилизация и деградация не нужных для клетки и организма «груза» внутри самой клетки за счет лизосомальной органеллы (лизосомы), воздействие практически одних и тех же белков делают механизмы схожими. Однако различия в запуске процессов, разновидность самих Р13К-комплексов (у аутофагии Р13К III класса 1-го и 2-го типа, а у LAP Р13К III класса 3-го типа), использование активных форм кислорода при LAP, разновидность использования регуляторных белков в процессах (при аутофагии это ULK1, FIP200, ATG13, Ambra1, WIPI2, ATG14; а при LC3-ассоциированном фагоцитозе это Rubicon и NOX2), разное количество слоев в мембранный структуре, в которой происходит лизис (двуихмембранный аутофаголизосома и одномембранный лапосома) четко подчеркивают разновидность канонической и не канонической аутофагии. Разность выполняемых задач, а именно разновидность мишней для утилизации (при аутофагии внутриклеточные патогены, дисфункциональные белки и органеллы, а при LAP внеклеточные патогены, апоптотические тельца, бактерии и др.) делают данные механизмы совершенно разными по своему значению.

#### Адрес для переписки:

Ибрагимов Булат Рафисович  
Институт фундаментальной медицины и биологии  
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный  
университет»  
420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань,  
ул. Кремлевская, 18.  
Тел.: 8 (999) 132-70-75.  
E-mail: [ibragimov94@inbox.ru](mailto:ibragimov94@inbox.ru)

#### Address for correspondence:

Bulat R. Ibragimov  
Institute of Fundamental Medicine and Biology,  
Kazan (Volga Region) Federal University  
18 Kremlevskaya St  
Kazan  
420008 Republic of Tatarstan  
Russian Federation  
Phone: +7 (999) 132-70-75.  
E-mail: [ibragimov94@inbox.ru](mailto:ibragimov94@inbox.ru)

#### Образец цитирования:

Б.Р. Ибрагимов, Ю.В. Скибо, З.И. Абрамова  
«Аутофагия и LC3-ассоциированный фагоцитоз:  
сходства и различия» // Медицинская иммунология,  
2023. Т. 25, № 2. С. 233-252.  
doi: 10.15789/1563-0625-AAL-2569

© Ибрагимов Б.Р. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

#### For citation:

B.R. Ibragimov, Yu.V. Skibo, Z.I. Abramova “Autophagy and LC3-associated phagocytosis: similarities and differences”, Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 233-252.  
doi: 10.15789/1563-0625-AAL-2569

© Ibragimov B.R. et al., 2023  
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-AAL-2569

В совокупности новые данные указывают на то, что аутофагия как каноническими, так и неканоническими путями превратилась в механизм защиты хозяина, способный противостоять иммунологическому и патогенному стрессу и опосредовать иммунологическую толерантность как к внутриклеточным, так и к внеклеточным угрозам. В представленном обзоре обсуждаются принципиальные молекулярные отличия каждого из механизмов, а также их роли в иммунитете с учетом последних литературных данных.

*Ключевые слова: аутофагия, LC3-ассоциированный фагоцитоз, LC3, Beclin-1, Vps34, аутоиммунитет, воспаление*

## AUTOPHAGY AND LC3-ASSOCIATED PHAGOCYTOSIS: SIMILARITIES AND DIFFERENCES

Ibragimov B.R., Skibo Yu.V., Abramova Z.I.

*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation*

**Abstract.** Previously, autophagy was termed as a mechanism used by the cells with a lack of essential nutrients supporting homeostasis. Over the decade of studies, autophagy proved to be a more complex, ambiguous mechanism. Its activation depends on the nature of stimulus, type of immune cells and the final result. Both canonical and non-canonical autophagy, being similar in molecular events, but showing their own distinctive features, are key processes in protecting the body from penetration of intracellular pathogens, maintaining the required level of nutrients in the cell, and removing damaged organelles and cells. Canonical autophagy probably evolved as a homeostatic response to cellular stress and nutritional deficiencies, whereas non-canonical autophagy emerged as a response to suppression of inflammation. Non-canonical autophagy, hereinafter referred to as LC3-associated phagocytosis (LAP), combines the molecular mechanism of phagocytosis with an autophagy mechanism characterized by ingestion of exogenous pathogens, formation of phagosomes (laposomes) and enhanced fusion with lysosomes, followed by degradation of their contents.

Significant differences were found between the processes of LAP- and canonical autophagy, which are similar in its mechanism of action. The presence of PI3K complexes in both processes, utilization and intracellular degradation of the “cargo” which is not required for the cells and organism proceeding in the lysosomes, and involvement of almost the same proteins provide similarity of their mechanisms. However, there are differences in the initiation of the processes, e.g., different types of PI3K complexes (in autophagy, PI3K III class 1 and 2 types; in LAP PI3K III, class 3 type), usage of reactive oxygen species in LAP, different types of regulatory proteins involved (ULK1, FIP200, ATG13, Ambr1, WIPI2, ATG14 in autophagy; and Rubicon and NOX2 in LC3-associated phagocytosis), different number of layers in the membrane structure in which lysis occurs (double-membrane autophagolysosome and single-layer membrane in laposomes) clearly depict the variety of canonical and non-canonical autophagy. The two pathways are directed for different types of biological objects, i.e., intracellular pathogens, dysfunctional proteins and organelles in autophagy, and extracellular pathogens, apoptotic bodies, bacteria, utilized in LAP, thus making these mechanisms completely different in their significance.

Collectively, the new data indicate that autophagy performed via both canonical and non-canonical pathways, has evolved into a host defense mechanism capable of resisting immunological and pathogenic stress and mediating immunological tolerance to both intra- and extracellular threats. The present review discusses fundamental molecular differences between these mechanisms, as well as their role in immunity, based on the latest literature data.

*Keywords: autophagy, LC3-associated phagocytosis, LC3, Beclin-1, Vps34, autoimmunity, inflammation*

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров (Приоритет-2030).

### Введение

#### Каноническая аутофагия

Аутофагия – эволюционно клеточный путь, представляющий собой лизис белков и других клеточных компонентов, необходимый для создания источников питательных веществ и огра-

ничения повреждений во время метаболического стресса (голодание, тепловой шок, окислительный стресс, накопление поврежденных или дисфункциональных органелл) (Martinez, 2011). Отсутствие аминокислот или факторов роста приводит к ингибированию рецептора рапамицина (mTOR), что приводит к запуску аутофагии. Во время аутофагии формируется *de novo* двойной мембранный компартмент, называемый аутофагосомой. Аутофагосома поглощает цитоплазматический материал и доставляет его для лизиса в лизосому (рис. 1).

Одним из первых этапов формирования двойной структуры является активация мультипротеинового комплекса (комплекс PI3K/Vps34/Beclin 1/Ambra 1) за счет снижения активности mTOR. Этот комплекс негативно регулируется Bcl-2 белком. Обычно контролируемые mTOR сигналы, индуцирующие аутофагию (такие как лишение питательных веществ), запускают активацию AMPK, чья киназная активность одновременно ингибирует mTOR и активирует преинициаторный комплекс (ULK1/2, ATG13, FIP200). Затем этот комплекс активирует комплекс PI3K класса

III, состоящий из VPS34 и Beclin-1, а также ATG14 или UVRAG. Комплекс PI3K класса III продуцирует фосфатидилинозитол-3-фосфат (PI3P), который действует как сигнал рекрутирования для нижестоящих убиквитин-подобных систем конъюгации, системы ATG12/ATG5 и системы LC3-PE (рис. 2).

Дальнейший рост аутофагосомы регулируется двумя убиквитино-подобными конъюгациями ATG5/12 и LC3. Комплекс Beclin-1/VPS34 дополняет изолирующую мембрану комплексом ATG5/12/16, который образуется при взаимодействии ковалентно-связанного ATG5/12 с ATG16. Параллельно второй убиквитино-подобный комплекс LC3 расщепляется до укороченной молекулы LC3-I с помощью ATG4. Затем LC3-I конъюгирует с липидным фосфатидилэтаноламином (PE), что приводит к образованию LC3-II белка. Комплекс ATG5/12/16 обеспечивает сайты стыковки для LC3-фосфатидилэтаноламина (LC3-II), представляющий собой вторую убиквитино-подобную конъюгацию.

Привлечение LC3-II белка способствует наращиванию мембранны до тех пор, пока она не зам-

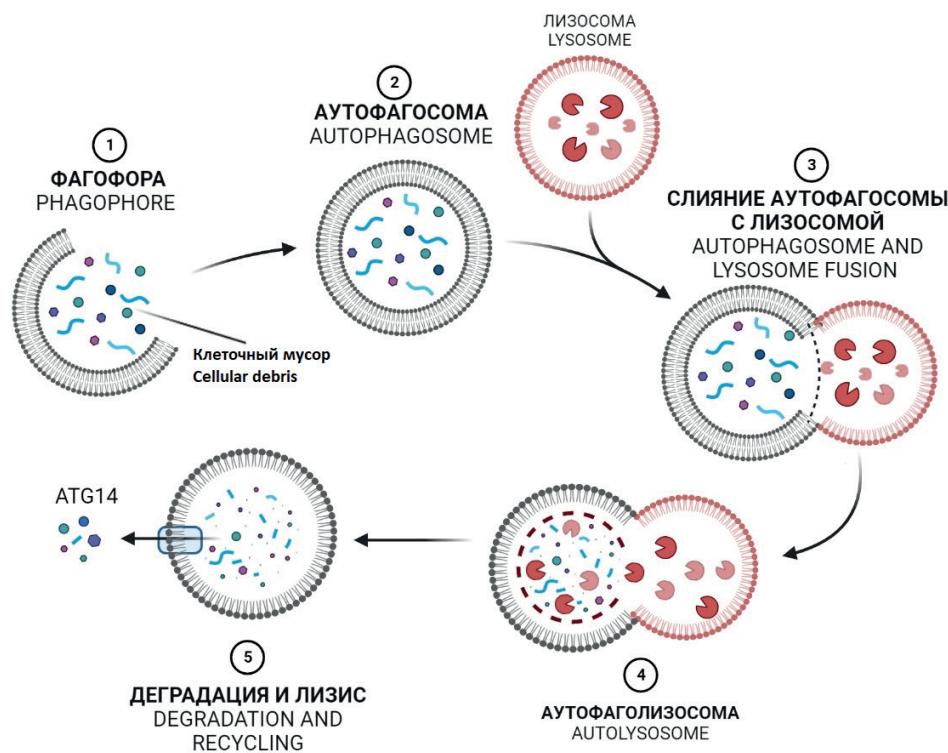


Рисунок 1. Механизм канонической аутофагии [21]

Примечание. Аутофагия представляет собой многоэтапный процесс, который включает инициацию, образование мембранны и фагофора, расширение фагофора, слияние с лизосомой и деградацию, которые, соответственно, регулируются белками, связанными с аутофагией (ATG).

Figure 1. Mechanism of canonical autophagy [21]

Note. Autophagy is a multistep process that includes initiation, membrane nucleation and phagophore formation, phagophore expansion, fusion with the lysosome, and degradation, which correspondingly are regulated by multiple proteins, referred to as autophagy-related proteins (ATGs).

кнется, образуя вокруг материала, подлежащего удалению, новую органеллу с двойной мембраной. Далее происходит слияние аутофагосомы с лизосомой, содержащей кислые гидролазы под действием которых происходит расщепление клеточного груза (белков, органелл). При критическом уровне клеточного стресса происходит полное расщепление содержимого цитозоля, что приводит к ее гибели [1].

#### Неканоническая аутофагия

В то время как каноническая аутофагия считается неспецифическим процессом, который изолирует и разрушает содержимое цитоплазмы в большом количестве, механизм аутофагии также может быть избирательно направлен на внутренние клеточные субстраты. Избирательная аутофагия может быть запущена для различных

стимулов, таких как поврежденные органеллы (митофагия для митохондрий), макромолекулы (липофагия для липидов) [38], внутрицитоплазматические микробы (ксенофагия) [51] или фагоцитированные частицы, такие как апоптотические клетки или внеклеточные патогены (LC3-ассоциированный фагоцитоз или LAP) [16, 45].

LC3-ассоциированный фагоцитоз (LAP) идентифицирован как феномен, отличающийся от канонической аутофагии [16]. Данный процесс протекает в фагоцитарных и дендритных клетках (рис. 3).

В LAP отсутствует классическая двухмембранный аутофагосома, вместо этого образуется одно-мембранный структура, за счет присоединения MAPLC3B белка (LC3-I) к фосфатидилэтанола-

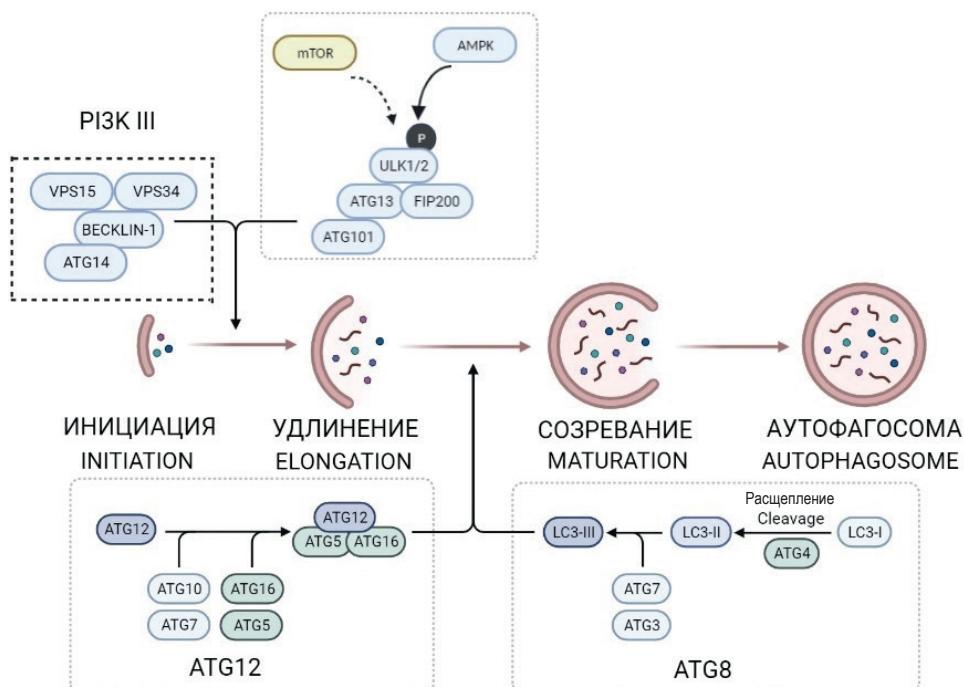


Рисунок 2. Механизм созревания аутофагосомы при канонической аутофагии [21]

Примечание. ATG собираются в несколько комплексов: комплекс инициации Unc-51-подобной киназы 1 (ULK1; Atg1 у дрожжей), комплекс зародышебразования PI3K класса III и комплекс, связывающий фосфатидилинозитол-3-фосфат (PI3P), который обеспечивает образование аутофагосом и включает системы конъюгации ATG12 и связанных с белками LC3/γ-аминомасляной кислоты (LC3/GABARAPs; Atg8 в дрожжах). В системе конъюгации ATG12 присоединяется к ATG5, который затем присоединяется к ATG16L1. Затем комплекс ATG12–ATG5–ATG16L1 способствует конъюгации LC3, в результате чего LC3 расщепляется протеазой ATG4 с образованием LC3-I, который затем конъюгирует с фосфатидилэтаноламином (PE) с образованием LC3-II. Этот конъюгат включается в преаутофагосомные и аутофагосомные мембранны, где LC3 может взаимодействовать с грузовыми рецепторами, которые содержат LC3-взаимодействующие мотивы (LIR).

Figure 2. Mechanism of autophagosome maturation in canonical autophagy [21]

Note. ATGs assemble into several complexes: the Unc-51-like kinase 1 (ULK1; Atg1 in yeasts) initiation complex, the class III PI3K nucleation complex and the phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P)-binding complex, which directs the distribution of the machinery that enables autophagosome formation, and includes the ATG12 and the microtubule-associated protein light chain 3/γ-aminobutyric acid receptor-associated proteins (LC3/GABARAPs; Atg8 in yeasts) conjugation systems. In the ATG12 conjugation system, ATG12 is attached to ATG5, which is then attached to ATG16L1. The ATG12–ATG5–ATG16L1 complex then promotes conjugation of LC3, whereby LC3 is cleaved by the protease ATG4 to form LC3-I, which is then conjugated with phosphatidylethanolamine (PE) to form LC3-II. This conjugate is incorporated into pre-autophagosomal and autophagosomal membranes, where LC3 can interact with cargo receptors, which harbour LC3-interacting motifs (LIRs).

мину и, как недавно выяснилось, фосфатидилсерину, на единственной окружающей мемbrane фагосомы. В отличие от канонической аутофагии, LAP не зависит от преинициаторного ком-

плекса ULK1/ULK2/mTOR [46]. LAP запускается поверхностными рецепторами: лектины C-типа, рецепторы IgG и Toll-подобные рецепторы, фосфатидилсериновые рецепторы (Tim-4) или ре-

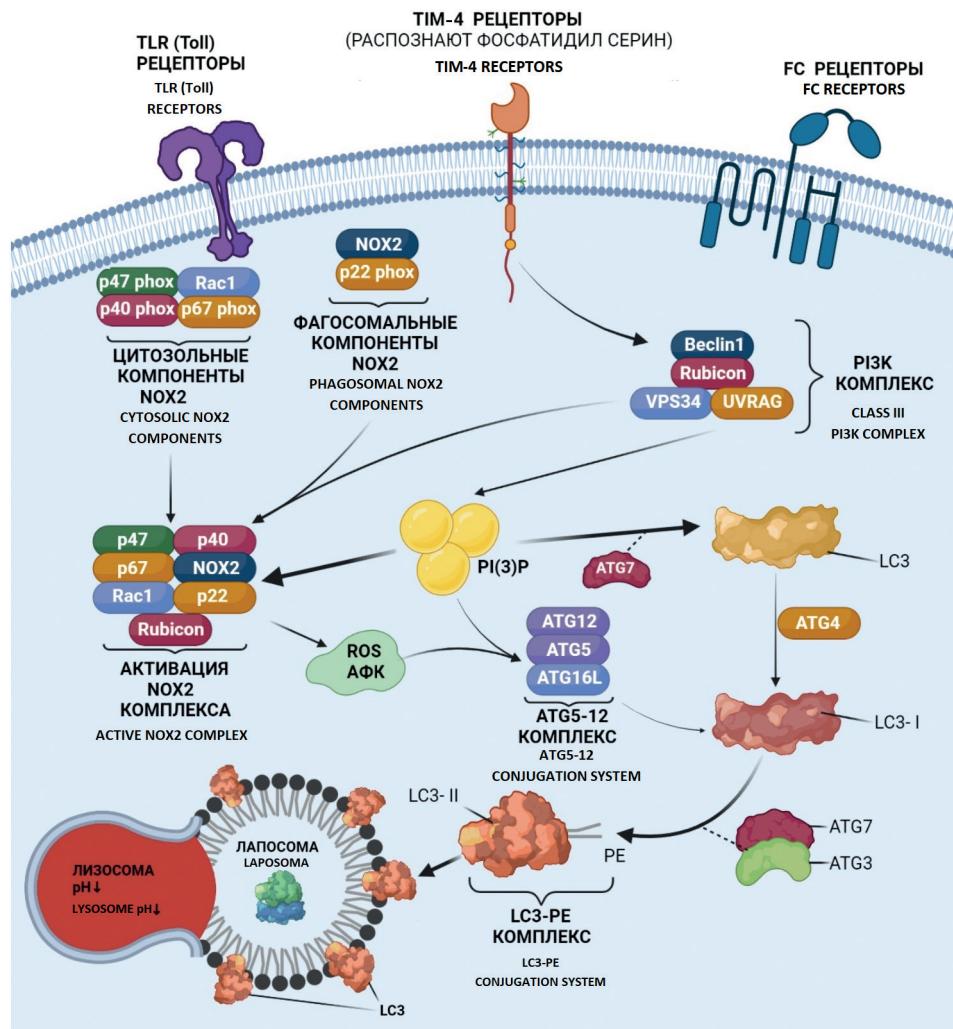


Рисунок 3. Механизм LC3-ассоциированного фагоцитоза [73]

Примечание. При поглощении стимулов, которые задействуют Toll-подобные рецепторы (TLR), рецепторы фосфатидилсерина или рецепторы Fc (FCR), компоненты пути LAP рекрутируются на лапосому, содержащую груз. Комплекс PI3K класса III, состоящий из Beclin-1, VPS34, UVrag и Rubicon, рекрутируется в TLR-вовлеченный фагосому. PI(3)P выполняет две функции: рекрутирование нижестоящих систем конъюгации (система конъюгации ATG5-12 и система конъюгации LC3-PE) и стабилизация комплекса NOX2 для производства АФК. Активный комплекс NOX2 собирается при взаимодействии с рецептором, когда цитозольные компоненты NOX2 (p47phox, p40phox, p67phox и Rac1) присоединяются к фагосомальным компонентам NOX2 (NOX2 и p22phox) в лапосоме. Следует отметить, что взаимодействие Рубикона также необходимо для стабилизации комплекса NOX2. И АФК, и PI(3)P (необходимы для последующей сборки и перемещения LC3-II на одиночную мембрану лапосомы), а LC3-II необходим для слияния с лизосомой и созревания лапосомы.

Figure 3. Mechanism of LC3-associated phagocytosis [73]

Note. Upon engulfment of stimuli that engage Toll-like receptors (TLR), phosphatidylserine receptors (PtdSer-R), or Fc receptors (FCR), components of the LAP pathway are recruited to the cargo-containing LAPosome. The Class III PI3K complex, composed of Beclin-1, VPS34, UVrag, and Rubicon, assembles and associates with the vesicle and is critical to the sustained and localized production of PI(3)P at the LAPosome. PI(3)P serves two roles—the recruitment of the downstream conjugation systems (ATG5-12 Conjugation System and LC3-PE Conjugation System) and the stabilization of the NOX2 complex for the production of ROS. The active NOX2 complex is assembled upon receptor engagement when cytosolic NOX2 components (p47phox, p40phox, p67phox, and Rac1) join phagosomal NOX2 components (NOX2 and p22phox) at the LAPosome. Of note, Rubicon interaction is also required for the stabilization of the NOX2 complex. Both ROS and PI(3)P are required for the subsequent lipidation and translocation of LC3-II to the single membrane of the LAPosome, and LC3-II is required for fusion to the lysosome and maturation of LAPosome.

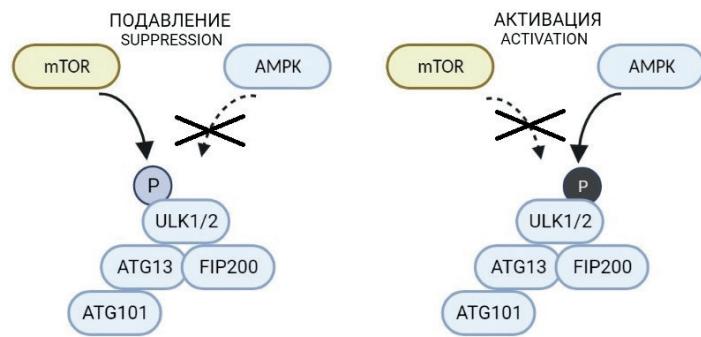


Рисунок 4. Механизм запуска канонической аутофагии [21]

Примечание. Ингибирование mTORC1 приводит к увеличению активности киназы ULK1/2. Затем ULK1/2 фосфорилирует ATG13 и FIP200, которые являются критическими субъединицами киназного комплекса ULK1/2.

Figure 4. Canonical autophagy trigger mechanism [21]

Note. Inhibition of mTORC1 results in increased ULK1/2 kinase activity. ULK1/2 then phosphorylates ATG13 and FIP200, which are critical subunits of the ULK1/2 kinase complex.

цепторы Fc (FCR) [25]. Участие белков аутофагии ускоряет созревание фагосом и способствует снижению выживаемости интернализованных патогенов. При LAP белки, связанные с механизмом аутофагии (Beclin1, VPS34, LC3-II), быстро рекрутируются в TLR-вовлеченнную фагосому. Сборка комплекса PI3K, состоящего из Beclin-1, VPS34, UVAG и Rubicon, имеет решающее значение для локализации PI(3)P комплекса на фагосоме. Далее PI(3)P способствует встраиванию систем конъюгации (ATG5/ATG12 и LC3-PE (LC3-II)) и стабилизации комплекса NOX2 для производства активных форм кислорода (АФК). Зависимость LAP от активных форм кислорода (АФК), продуцируемых НАДФН-оксидазой NOX2, является очередной отличительной чертой от аутофагии. Активные формы кислорода и PI(3)P необходимы для перемещения LC3-II на одиночную мембрану фагосомы. Белок LC3-II способствует слиянию фагосомы с лизосомой, с дальнейшим созреванием аутофаголизосомы и деградации клеточного груза и апоптотических телец.

#### Отличительные черты механизмов запуска канонической и неканонической аутофагии

Аутофагия запускается в ответ на метаболические стрессы, такие как голодание, тепловой шок, окислительный стресс, накопление поврежденных или дисфункциональных органелл и белков. Отсутствие аминокислот или факторов роста приводит к ингибированию рецептора рапамицина (mTOR), который участвует в передаче сигналов рецептора фактора роста, гипоксии, в регуляции уровня АТФ. Затем комплекс преинициации аутофагии ULK1/ATG13/FIP200/ATG101 освобождается от своего mTOR опосредованного ингибирования, что приводит к биосинтезу аутофагосом [19]. ULK1-дефицитные клетки демонстрируют снижение биогенеза аутофагосом и дефект аутофагии в ответ на недо-

статок питательных веществ (Chan, 2007). Важно отметить, что mTOR ингибирует аутофагию в условиях способствующих росту, это опосредовано его ингибирующим действием на активность киназы гомологов Atg1 [62]. Подавление TOR-киназы осуществляется сигналами при недостатке питательных веществ (рис. 4).

Противоположную роль рецептора рапамицина (mTOR) выполняет аденоозит-5-монофосфатная(AMP)-активируемая протеинкиназа (AMPK). Активация AMPK, в отличие от mTOR, не ингибирует аутофагию, а участвует в ее запуске. AMP-активируемая протеинкиназа (AMPK) представляет собой высококонсервативный гетеротримерный киназный комплекс, состоящий из каталитической ( $\alpha$ ) субъединицы и двух регуляторных ( $\beta$  и  $\gamma$ ) субъединиц. AMPK активируется в условиях энергетического стресса, когда уровни внутриклеточного АТФ снижаются, а внутриклеточный AMP увеличивается, как это происходит при недостатке питательных веществ или гипоксии [31].

LC3-ассоциированный фагоцитоз, в отличие от аутофагии, не зависит от ULK1-комплекса. Данный процесс запускается поверхностными рецепторами, среди которых образ-распознающие рецепторы, такие как TLRs, Dectin-1, Dectin-2 и Mac-1/CR3/интегрины ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , 2), рецепторы IgG, такие как Fc $\gamma$ R, и рецепторы, распознающие мертвые клетки, такие как Tim-4 [25].

#### Факторы, запускающие LC3-ассоциированный фагоцитоз

Toll-подобные рецепторы (TLR) активируют различные защитные механизмы в фагоцитах, включая созревания фагосом, с участием белков канонической аутофагии. Частица, взаимодействующая с TLR на макрофаге во время фагоцитоза, запускает быстрое рекрутирование маркера аутофагосомы LC3. Это происходит при участии

белков, которые присутствуют в канонической аутофагии [63].

Toll-подобный рецептор-9 (TLR9) представляет собой рецептор, участвующий во врожденном восприятии внеклеточных ДНК в эндосомах фагоцитов. Это происходит за счет активации различных сигнальных путей, необходимых для стимулирования выработки провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа (IFN). После стимуляции TLR9 белок аутофагии LC3 и киназа IKK $\alpha$  встраиваются в эндосому, содержащую TLR9. Привлечение IKK $\alpha$  и LC3 к данным эндосомам происходит без участия белков необходимых для формирования классических аутофагосом, характерных для канонической аутофагии. Также было обнаружено, что данное привлечение происходит с участием ATG5 и без участия FIP200, характерных для аутофагии [24].

После стимуляции связанный с лигандом TLR9 димеризуется и рекрутирует сигнальный адаптер MyD88 и нижестоящие сигнальные молекулы, включая IRAK4, E3-лигазу и TRAF6. Аутоубиквитинирование TRAF6 опосредует рекрутирование TAK1 и его регуляторных белков TAB2/3, которые фосфорилируют и активируют IKK $\beta$ . Это индуцирует опосредованную NF- $\kappa$ B транскрипцию провоспалительных генов (эндосома NF- $\kappa$ B). Активация TLR9 также запускает ATG5-зависимое рекрутирование LC3 на эндосомальную мембрану посредством процесса LAP. IKK $\alpha$  рекрутируется в LC3 через домены LIR-2 и LIR-3. AP-3 необходим для образования родственной лизосом органеллы, несущей LAMP2. Рекрутирование IKK $\alpha$  на связанную с мембраной LC3 приближает эту киназу к IRF7, где она фосфорилирует IRF7 и активирует транскрипцию гена IFN I типа.

Помимо перечисленных рецепторов LC3-ассоциированный фагоцитоз запускают рецепторы семейства Dectin. Dectin-1 представляет собой рецептор (рецептор лектина С-типа), который необходим для врожденных иммунных ответов против грибков. Dectin-1 связывается  $\beta$ -глюканами на клеточной стенке грибов и запускает фагоцитоз, выработку активных форм кислорода НАДФН-оксидазой (NOX2) и выработку воспалительных цитокинов и хемокинов, которые способствуют иммунным реакциям хозяина против грибков. В дополнение к своей роли во врожденных антимикробных реакциях на грибы, Dectin-1 влияет на адаптивные иммунные реакции посредством стимуляции продукции IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-23 [44].

Строение рецептора Dectin-1 схоже с рецепторами Т-клеток, В-клеток и с рецепторами Fc, но в отличие от них имеет один остаток цитоплазматического тирозина, который при распознавании патогена фосфорилируется киназами семейства Src. Эти киназы вызывают активацию НАДФН-

оксидазы (NOX2-комплекс), что приводит к вы-свобождению антимикробного АФК.

Dectin-2 обладает исключительной специфичностью к маннозе, так как все идентифицирован-ные гликановые лиганды грибов содержат ман-нозу. Связывание Dectin-2 с грибами активирует сигнальный путь тирозинкиназы (Syk) и иммуно-модуляцию дендритных клеток, включая после-дующую продукцию цитокинов [37]. Механизм запуска LC3-ассоциированного фагоцитоза с участием рецептора Dectin-2 идентичен механизму запуска с участием рецептора Dectin-1 и так же вовлекается путем активации NOX2-комплекса.

Кроме того, LAP запускается путем взаи-модействия рецептора Tim-4 либо с мертвыми клетками, на поверхности которых есть фос-фатидилсерин (PtdSer), либо с липосомами со-держащими PtdSer. Фосфатидилсерин основной липидный компонент внутренней части цито-плазматической мембраны, который экспонируется во внешнюю часть клеточной поверхности во время апоптоза и действует как сигнал для привлечения макрофагов. Таким образом, ре-цептор Т-клеточного домена иммуноглобулина и Tim-4 взаимодействуют с фосфатидилсерином, находящимся на мертвой клетке или на апоп-тотическом тельце, тем самым запуская LC3-ассоциированный фагоцитоз [43].

Рецепторы-мусорщики представляют собой большое семейство рецепторов клеточной по-верхности, которые участвуют в широком диа-пазоне биологических функций. Первоначально они были классифицированы на основе их спо-собности связываться с модифицированными липопротеинами низкой плотности. Они распоз-нают и удаляют разнообразные лиганды, вклю-чая эндогенные и модифицированные молекулы хозяина DAMS (молекулярные структуры, ассо-циированные с повреждениями) и микробные патогены PAMP (молекулярные структуры, ассо-циированные с патогенами).

Фосфатидилсерин, экспонированный на по-верхности клетки, функционирует как эндо-генные структуры, связанные с повреждениями. Липиды по всей плазматической мембране рас-пределены асимметрично. PtdSer локализован исключительно на внутренней стороне плаз-матической мембраны. Во время апоптоза рас-пределение фосфатидилсерина нарушается и он экспонируется на внешнюю сторону мембраны и окисляется. Поглощение апоптотической клетки путем LC3-ассоциированного фагоцитоза в ряде литературных источниках именуется как эффе-ритоз.

Tim-4 является одним из наиболее хорошо оха-рактеризованных рецепторов фосфатидилсери-на. Tim-4 первоначально был идентифицирован как белок, который взаимодействует с Tim-1, ре-гулируя таким образом пролиферацию Т-клеток.

Tim-4 состоит из относительно короткого цитоплазматического хвоста и внеклеточной области, содержащей IgV и домен муцина. Tim-4 привязывает апоптотические клетки к фагоцитам во время эфферацитоза, но сам не передает сигналы. Предполагается, что Tim-4 образует трехмерный комплекс с фибронектином 1 (Fn1) и интегринами, который обеспечивает эффективное распознавание апоптотических клеток и опосредует их поглощение за счет действия интегринов. Помимо роли Tim-4 в эфферацитозе, Tim-4 рецептор может способствовать инфекции патогенов. Патогены имитируют апоптотические клетки, воздействуя на PtdSer на своей клеточной мембране, делая его восприимчивым к Tim-4 рецептору фагоцитирующих клеток. Таким образом, Tim-4 активно участвует в фагоцитозе апоптотических клеток, а также используется вирусами для пассивного проникновения в клетку PtdSer-зависимым способом.

#### Отличительные черты механизма инициации канонической и неканонической аутофагии

Недавние исследования описали три комплекса PI3K класса III (PI3KC3), которые действуют во время аутофагии. PI3KC3 обычно содержат VPS34, катализитические субъединицы Beclin-1 и VPS15 (также называемый p150). Специфичность PI3KC3 определяется PI3KC3 различными сложными компонентами, которые связывают Beclin-1 [69].

Первый PI3KC3, содержащий ATG14, необходим для аутофагии, вызванной голоданием, и нацелен на формирование аутофагосом. Кроме того, было показано, что ATG14 увеличивает продукцию фосфатидилинозитол-3-фосфата с помощью VPS34, указывая на то, что во время канонической аутофагии ATG14 служит как агентом регуляции, так и регулятором активности PI3KC3. Известно, что простой фосфатидилинозитол-3-фосфат выполняет важные функции в эндоцитарном и фагоцитарном транспорте и необходим для аутофагических путей. При аутофагии фосфатидилинозитол-3-фосфат может формировать платформу для биогенеза аутофагосом [5].

Второй PI3KC3 лишен ATG14, но содержит UVAG (ген, которого связан с устойчивостью к ультрафиолетовому излучению), Beclin-1-связывающий белок, являясь частью липид-киназного комплекса PI3KC3, способствует взаимодействию Beclin-1/VPS34, а также активности VPS34 [41]. UVAG и Beclin-1 взаимозависимо индуцируют аутофагию. UVAG-опосредованная активация Beclin-1/PI3KC3 способствует аутофагии. Роль UVAG-содержащего PI3KC3 была противоречивой, так как некоторые исследования подтвердили его роль в формировании аутофагосом, в то время как другие исследования оспаривали эту роль и скорее подчеркивали роль PI3KC3 в эндоцитозе, переносе

эндосом, созревании аутофагосом через его взаимодействие с классом C-VPS/HOPS [68].

В случае аутофагии преинициаторный комплекс, состоящий из белков WIPI и ATG2, связывается с фосфатидилинозитол-3-фосфатом, образующийся в мемbrane-мишени. Связываясь как с фосфатидилинозитол-3-фосфатом, так и ATG16L1, комплекс WIPI/ATG2 рекрутирует комплекс конъюгации LC3, состоящий из систем конъюгации ATG12 и LC3, что приводит к присоединению LC3 к мемbrane мишени.

Третий PI3KC3 содержит как UVAG, так и Rubicon. Этот комплекс является негативным регулятором аутофагии, взаимодействуя на множестве стадий аутофагического пути. Этот ингибирующий комплекс частично индуцируется основным регулятором аутофагии mTORC1. В условиях, богатых питательными веществами, mTORC1 связывает и фосфорилирует UVAG, усиливая ассоциацию UVAG с Rubicon и ингибируя аутофагию [34].

Rubicon, первоначально идентифицированный как партнер по связыванию с Beclin-1, локализующийся на ранних и поздних эндоцитах, был описан так же, как и партнер по связыванию с VPS34 через его домен RUN. Это взаимодействие ингибировало активность липидкиназы VPS34 и образование аутофагосом [69, 80]. Клетки, дефицитные по Rubicon, демонстрируют повышенную активность с увеличением ATG16L. Тем не менее, Rubicon также играет роль в ингибировании стадии созревания аутофагосом, поскольку клетки с дефицитом Rubicon показывают более высокое соотношение аутофаголизосом по отношению к аутофагосомам [29].

Rubicon-дефицитные клетки подвергаются нормальному уровню фагоцитоза, но не могут рекрутировать LC3-II на лапосому [45]. Комплекс PI3KC3, содержащий Rubicon/UVAG, перемещается в аутофагососому, не зависимо от активности преинициаторного комплекса. Эта ассоциация или стабильность всего комплекса PI3KC3 в аутофаголизосоме зависит от присутствия VPS34, поскольку потеря VPS34 приводит к потере Beclin-1, UVAG и Rubicon из аутофагосомы. Хотя Rubicon ингибирует активность липидкиназы VPS34 во время канонической аутофагии, клетки с дефицитом Rubicon не могут продуцировать значительное количество фосфатидилинозитол-3-фосфата в ответ на стимулы запуска LC3-ассоциированного фагоцитоза [46].

Следующее фундаментальное отличие заключается в том, что генерация активных форм кислорода необходима для LAP, но необязательна для аутофагии [17]. Для производства активных форм кислорода необходим Rubicon, который выполняет стабилизацию NOX2-комплекса.

NOX2 представляет собой большой комплекс, состоящий из интегральных мембранных компонентов (gp91<sup>phox</sup> и p22<sup>phox</sup>) и цитозольных субъединиц (p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> и Rac1/2). Сборка активного комплекса NOX2 происходит при взаимодействии рецепторов. Цитозольные компоненты NOX2 (p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> и Rac1) присоединяются в фагосоме к фагосомальным компонентам NOX2 (NOX2 и p22<sup>phox</sup>) [46]. НАДФН-оксидаза комплекса NOX2 в ответ на соответствующие сигнальные события, такие как передача сигналов, от рецепторов FcγR и TLR, собирается на зарождающейся фагосомальной мембране и генерирует супероксид путем переноса электронов от цитозольного НАДФН к кислороду в просвете фагосомы [58]. Супероксид обладает высокой реакционной способностью и вместе с образующимися из него активными формами кислорода непосредственно убивает микробы и другие патогены. В дополнение к своему прямому противомикробному действию NOX2-генерируемые АФК оказывают и другие действия, включая регуляцию pH, активацию каскада передачи сигналов. Мутация с потерей функции в компонентах НАДФН-оксидазы NOX2 приводит к хроническим гранулематозным болезням, тяжелому иммунодефициту, характеризующемуся восприимчивостью к бактериальным и грибковым патогенам [26].

Rubicon напрямую взаимодействует с p22<sup>phox</sup> NOX2, необходимого для оптимальной продукции АФК. В отсутствие АФК рекрутирование нижестоящих компонентов LAP, таких как ATG16L1, ATG7 и LC3-II, нарушается. Rubicon выполняет функцию активации и стабилизации комплекса NOX2, поскольку фосфатидилинозитол-3-фосфат, продуцируемый Rubicon-содержащим PI3PKC3, способствует сборке комплекса NOX2, а Rubicon связывает и стабилизирует p22<sup>phox</sup> [48].

#### Отличительные черты LC3 комплекса канонической и неканонической аутофагии

Как при LAP, так и при аутофагии привлечение белков к мембранам является ключевым процессом, который приводит к последующей деградации патогена. Комплекс конъюгации LC3, состоящий из систем конъюгации ATG12 и LC3, одинаков для аутофагии и LAP. Но механизмы, направляющие комплекс конъюгации LC3 к мемbrane мишени, различаются между аутофагией и LAP. В отличие от обычного пути аутофагии, где LC3 включается в двухмембранный фагосому, при LAP LC3 белок рекрутируется непосредственно в одномембранный фагосому. Во время канонической аутофагии ATG8 конъюгируются с фосфатидилэтаноламином (РЕ) исключительно в двухмембранных аутофагосомах, за счет этого происходит удлинение мембранны и закрытие фагофора [30]. При неканонической аутофагии ATG8 конъюгируется с одной мембраной, эн-

долизосомными компартментами, такими как фагосомы, эндосомы или вакуоли. Этот процесс протекает с конъюгацией ATG8 с одиночными мембранами и включает альтернативную конъюгацию как с фосфатидилэтаноламином, так и фосфатидилсерином (рис. 5) [16].

Как было сказано ранее, в аутофагии рост аутофагосомы регулируется двумя убиквитино-подобными системами конъюгации. Одна из систем нуждается в убиквитино-подобном белке LC3-I, а другая состоит из ATG5/12/16. Убиквитино-подобная система конъюгации, состоящая из ATG7, ATG3 и ATG5/12/16 обеспечивает ковалентное связывание глицина с липидом (фосфатидилэтаноламином), через амидную связь с его головной группой. ATG16L действует как критический молекулярный узел, направляя каноническую и неканоническую аутофагию в разных сайтах через разные домены. Во время канонической аутофагии ATG16L рекрутируется для образования аутофагосом через свой спиральный домен, который взаимодействует с WIPI2 и FIP200, тем самым делая сайт конъюгации с ATG8 специфичным. Цитозольная форма LC3-I конъюгируется с фосфатидилэтаноламином (РЕ) и в этой форме (LC3-II) она встраивается в растущую мембрану аутофагосомы. Перед слиянием аутофагосом с лизосомами LC3-II, расположенный на внешней аутофагосомной мембране, высвобождается путем деконъюгации фосфатидилэтаноламина из LC3 за счет протеолитической активности ATG4. А LC3-II, связанный с внутренней мембраной, сохраняется, но в последствии расщепляется кислыми гидролазами внутри аутофаголизосомы [15, 54].

В LC3-ассоциированном фагоцитозе, подобно канонической аутофагии, ATG7 и ATG10 опосредуют конъюгацию ATG5 с ATG12 в ассоциацию с ATG16L1 с образованием стабилизирующего мультимерного комплекса. Конъюгация LC3-II с РЕ возможна благодаря ATG7 и ATG3 [46].

Не так давно было обнаружено, что помимо конъюгации ATG8 с фосфатидилэтаноламином, в LC3-ассоциированном фагоцитозе происходит конъюгация ATG8 с фосфолипидом – фосфатидилсерином. Фосфатидилсерин также несет аминогруппу в своей головной части, которая может быть конъюгирована с ATG8.

Фосфатидилсерин, расположенный на мембране аутофаголизосомы, на заключительной стадии LAP, возможно, выполняет ту же функцию, что и при апоптозе, подавая сигнал на деградацию аутофаголизомы. Т. е. при апоптозе, клетка с фосфатидилсерином на наружной мембране находится вне фагоцитарной клетки, а при LAP аутофаголизосома с фосфатидилсерином находится внутри клетки.

Таким образом, самое принципиальное отличие заключается в механизме активации про-

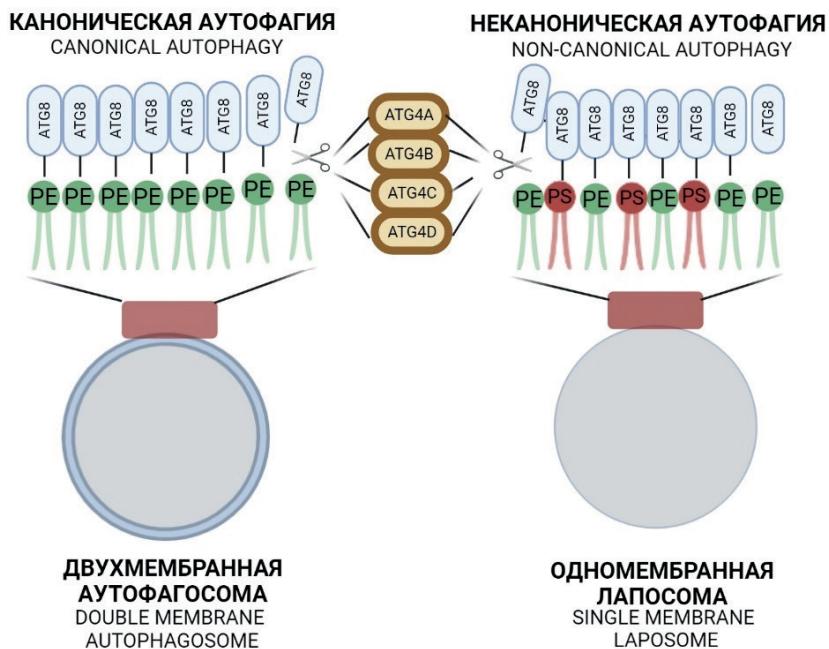


Рисунок 5. Схематичное изображение сформировавшихся структур (автофагосома, лапосома) канонической и неканонической аутофагии [16]

Примечание. Аутофагия – это фундаментальный кatabолический процесс, в котором используется уникальная посттрансляционная модификация – конъюгация белка ATG8 с фосфатидилэтаноламином (PE). При LAP конъюгацией ATG8 протекает с одночными мембранами и включает альтернативную конъюгацию как с фосфатидилэтаноламином, так и фосфатидилсерином (PS).

Figure 5. Schematic representation of the formed structures (autophagosome, laposome) of canonical and non-canonical autophagy [16]

Note. Autophagy is a fundamental catabolic process that uses a unique post-translational modification, the conjugation of ATG8 protein to phosphatidylethanolamine (PE). In LAP, ATG8 conjugation occurs with single membranes and involves alternative conjugation to both phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine (PS).

цессов. Каноническая аутофагия индуцируется киназами mTOR и ULK преинициаторным комплексом, в то время как неканоническая запускается поверхностными рецепторами. Далее запускается PI3KС3, в канонической аутофагии содержащий WIPI и ATG2, а в неканонической аутофагии содержащий Rubicon.

Второе фундаментальное отличие: необходимость генерации активных форм кислорода NOX2-комплексом в LC3-ассоциированном фагоцитозе, что отсутствует в канонической аутофагии.

Следующее отличие заключается в составе ли- зосомальной структуры: в аутофагии это белок фосфатидилэтаноламин, а в неканонической – фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин. При аутофагии формируется двумембранный структура, а в неканонической аутофагии однослойная мембрана.

#### Роль аутофагии и LC3-ассоциированного фагоцитоза в развитии иммунного ответа

Аутофагия, в первую очередь ее неканоническая форма, выполняет четыре основные роли в иммунной системе: удаление внутриклеточных

патогенов (фагоцитоз), участие в секреторном пути (высокий уровень IL-1 $\alpha$ , секрецируемый макрофагами, стимуляция провоспалительных цитокинов) [6], развитие лимфоцитов (активация Т-клеток путем презентации антигенов через молекулы I, II главного комплекса гистосовместимости (МНС), находящихся в макрофагах) и провоспалительная передача сигналов. Все эти процессы взаимосвязаны с фагоцитирующими клетками и с LC3-ассоциированным фагоцитозом [74].

#### LC3-ассоциированный фагоцитоз в защите от инфекционных патогенов

Аутофагия выполняет защитную функцию от эндогенных патогенов, в то время как LC3-ассоциированный фагоцитоз участвует в деградации экзогенных патогенов. По данным литературы, LAP, а не классическую аутофагию, идентифицировали как основной защитный путь, осуществляемый макрофагами в результате деградации бактериальных, дрожжевых патогенов, клеток опухли и антигенов. LAP играет роль в распознавании и удалении мертвых клеток. LAP играет роль в распознавании и удалении мертвых

клеток. Утилизацию выполняют специализированные клетки фагоциты (макрофаги, дендритные клетки).

Фагоциты используют многочисленные Tim4-рецепторы, которые непосредственно распознают фосфатидилсерин или внеклеточные фосфатидилсериновые мостиевые молекулы [43]. У мышей с дефицитом этих рецепторов часто развиваются аутоиммунные заболевания, подобные симптомам системной красной волчанки (СКВ). Для лиц с СКВ характерно наличие апоптотических телец вследствие нарушения их клиренса, что приводит к развитию аутоиммунитета. Таким образом, поглощение и деградация апоптотических клеток является важным процессом поддержания гомеостаза. Неканоническая аутофагия требуется для эффективной деградации апоптотической клетки, а при отсутствии LAP происходит увеличение противовоспалительных цитокинов.

Другим примером LAP в иммунной системе является его участие при развитии инфекционных заболеваний [48]. На примере *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* было обнаружено, что дефицит ATG5 участующего в LAP, снижает устойчивость клетки хозяина, в то время как дефицит ATG13, гена, ответственного за преинициаторный комплекс аутофагии, не выявил существенных изменений в ответ на внешний иммунный патоген. Данное явление указывает на распознавание макрофагами патогенного *Salmonella*, которое не зависит от запуска аутофагии, и что макрофаги нацелены на патоген LC3-ассоциированным фагоцитозом [28].

Активация NOX2-комплекса и НАДФН-оксидазы является ключевым событием фагоцитоза в уничтожении патогенов в фагоцитирующих лейкоцитах. НАДФН-оксидаза, входящая в комплекс NOX2, характерная для LAP, необходима для образования АФК, который в свою очередь несет потенциально повреждающие свойства против внутриклеточных патогенов. НАДФН-оксидаза неактивна в покоящихся макрофагах и нейтрофилах, и активируется при передаче сигналов врожденного иммунитета через Toll-подобный рецепторный путь при проникновении микробов [76]. Роль НАДФН-оксидазы в защите от патогенов также иллюстрируется при хронической грануломатозной болезни, характеризующаяся грибковыми и бактериальными инфекциями, возникающей из-за нефункциональной НАДФН-оксидазы в фагоцитах [47]. НАДФН-оксидаза собирается на зарождающейся фагосомальной мемbrane и генерирует супероксид путем переноса электронов кислорода от цитозольного НАДФН. Супероксид обладает высокой реакционной способностью и вместе с образующимися из него АФК убивает патогены. Помимо своего прямого противомикробного

действия активные формы кислорода, генерируемые комплексом NOX2, участвуют в регуляции pH фагосом и уровня ионов калия, активации каскадов передачи сигналов и изменении экспрессии генов [35]. Мутации с потерей функции в компонентах НАДФН-оксидазы комплекса NOX2 приводят к хронической грануломатозной болезни и тяжелому иммунодефициту, характеризующемуся восприимчивостью к бактериальным и грибковым патогенам.

LAP приводит к более эффективному созреванию фагосом, чем обычный фагоцитоз. Участие белков аутофагии приводит к ускоренному созреванию фагосом и снижению выживаемости интраназированных патогенов.

Таким образом, LAP включает: конвергенцию фагоцитоза и аутофагического механизма; усиление противомикробных свойств аутолизосом по сравнению со стандартными фаголизосомами, участвующими в фагоцитозе; обнаружение микробных патогенов путем распознавания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов врожденного иммунитета за счет участия Toll-подобных рецепторов (TLR); взаимосвязь ATG5 с гидролазными ферментами (ГТФазы) [80].

#### Роль аутофагии и LC3-ассоциированного фагоцитоза в секреторном пути

Процесс фагоцитоза и секреторный путь имеют много общих функций, включая перенос везикул и слияние мембран. Пути канонической и неканонической аутофагии, в частности их белки, также играют роль в секреторных путях. К примеру, у мышей с дефицитом белка ATG5 наблюдается высокий уровень IL-1 $\alpha$ , секрецируемый макрофагами *in vitro* и *in vivo*, что приводит к чрезмерным воспалительным реакциям. LAP играет двойную роль в борьбе с туберкулезом: антибактериальную и противовоспалительную. У мышей, инфицированных *M. tuberculosis* в отсутствие белка ATG5, наблюдалось увеличение бациллярной нагрузки и чрезмерное воспаление легких, характеризующееся нейтрофильной инфильтрацией и реакцией IL-17 с повышенными уровнями IL-1 $\alpha$ . В то же время у макрофагов с нормальной работой ATG5 демонстрировался клеточно-автономный фенотип гиперсекреции IL-1 $\alpha$ , тогда как Т-клетки проявляли склонность к поляризации IL-17 во время неспецифической активации или при повторной стимуляции микробактериальными антигенами [6].

Ингибиование LAP в антигенпрезентирующих клетках приводит к повышенной секреции IL-1 $\beta$  *in vitro*. А индукция неканонической аутофагии снижает секрецию IL-1 $\beta$  *in vivo* [23]. Недавно было показано, что регуляция АФК контролирует секрецию другого провоспалительного цитокина, фактора ингибирования миграции макрофагов (MIF) [12]. Это согласуется с тем, что дефекты в первую очередь не в канонической ау-

тофагии, а в LAP приводят к увеличению секреции провоспалительных цитокинов [39, 74].

#### Роль аутофагии и LAP в провоспалительной передаче сигналов

Недавние исследования показывают взаимосвязь между аутофагией и активацией ядерного фактора каппа-легкой цепи активированных В-клеток (NF-κB). Например, активация NF-κB, опосредованная Т-клеточным рецептором, модулируется Bcl-10. Это происходит в ассоциации с адаптером аутофагии p62/SQSTM1 [56]. Адаптер-

ный белок Bcl-10 является критически важным медиатором передачи сигналов от Т-клеточного рецептора к NF-κB. Предполагается, что деградация Bcl-10 путем аутофагии снижает активацию Т-клеточного рецептора NF-κB. Участие TCR способствует полиубиквитинированию K63 Bcl-10, вызывая ассоциацию Bcl-10 с адаптером аутофагии p62. В совокупности эти данные показывают, что селективная деградация белка Bcl-10 путем аутофагии представляет собой внутренний гомеостатический путь, который модулирует

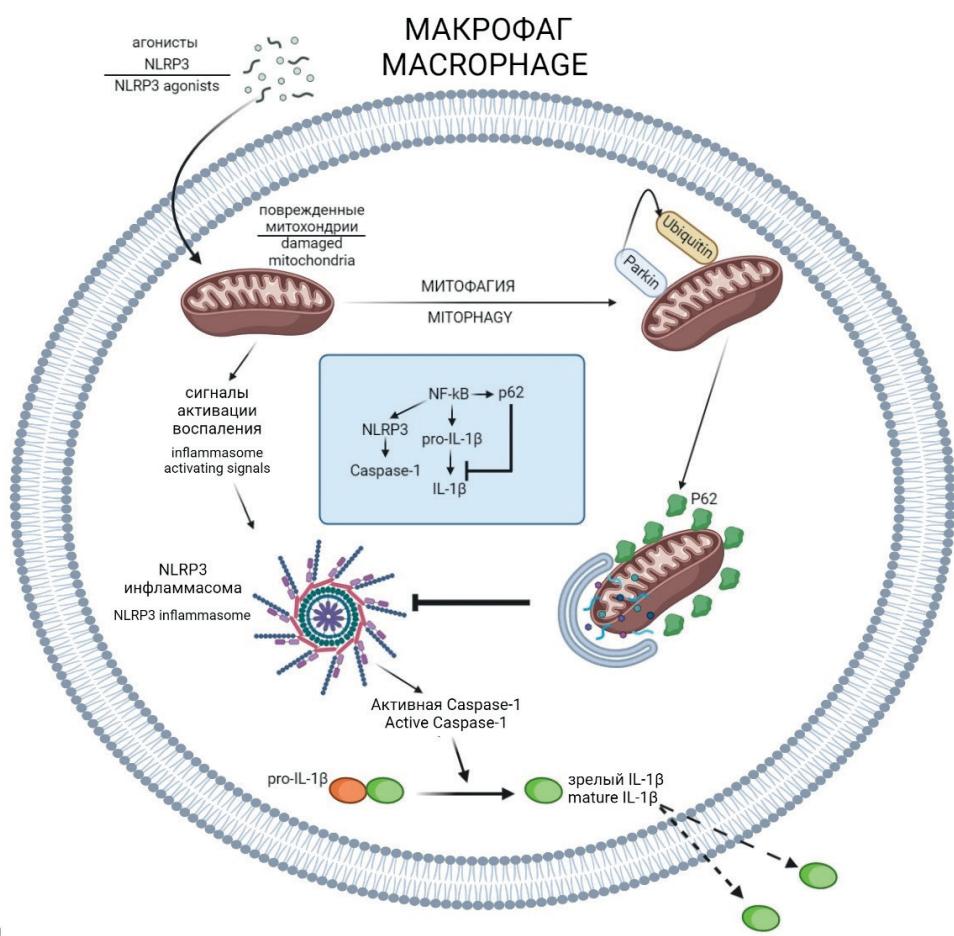


Рисунок 6. Влияние NF-κB на активацию воспаления путем устранения поврежденных митохондрий через аутофагию [81]

Примечание. Поврежденные митохондрии подвергаются паркинзалимовой убиквитиновой конъюгации и специфически распознаются p62, что индуцирует их митофагический клиренс. Абляция p62, специфичная для макрофагов, вызывает выраженное накопление поврежденных митохондрий и чрезмерное IL-1β-зависимое воспаление, усиливая гибель макрофагов. Следовательно, путь «NF-κB-p62-митофагия» представляет собой присущую макрофагам регуляторную петлю, посредством которой NF-κB сдерживает свою собственную активность, способствующую воспалению, и организует самоограничивающийся ответ хозяина, который поддерживает гомеостаз и способствует восстановлению тканей.

Figure 6. Influence of NF-κB on the activation of inflammation by eliminating damaged mitochondria through autophagy [81]

Note. Damaged mitochondria undergo Parkin-dependent ubiquitin conjugation and are specifically recognized by p62, which induces their mitophagic clearance. Macrophage-specific p62 ablation causes pronounced accumulation of damaged mitochondria and excessive IL-1β-dependent inflammation, enhancing macrophage death. Therefore, the “NF-κB-p62-mitophagy” pathway is a macrophage-intrinsic regulatory loop through which NF-κB restrains its own inflammation-promoting activity and orchestrates a self-limiting host response that maintains homeostasis and favors tissue repair.

передачи сигналов TCR к NF-кВ в эффекторных Т-клетках. Этот гомеостатический процесс может защитить Т-клетки от неблагоприятных последствий неограниченной активации NF-кВ, таких как клеточное старение.

В макрофагах SQSTM1/p62-зависимый клиренс поврежденных митохондрий модулирует активацию NLRP3-инфламмасомы. Удаление комплекса SQSTM1/p62 приводит к повышенной активации инфламмасомы и перепроизводству IL-1 $\beta$  (рис. 6) [81].

NF-кВ – ключевой активатор воспаления, инициирует активацию NLRP3-инфламмасомы, индуцируя экспрессию про-IL-1 $\beta$  и NLRP3.

Однако NF-кВ также предотвращает чрезмерное воспаление и сдерживает активацию NLRP3-инфламмасом. NF-кВ проявляет свою противовоспалительную активность, индуцируя накопление SQSTM1/p62. Внешние стимулы, активирующие NLRP3, запускают форму повреждения митохондрий, которая не зависит от каспазы-1. Далее происходит высвобождение прямых активаторов воспаления NLRP3, включая активные формы кислорода. Поврежденные митохондрии подвергаются убиквитиновой коньюгации и специфически распознаются p62, что индуцирует митофагический клиренс. Удаление p62 вызывает выраженное накопле-

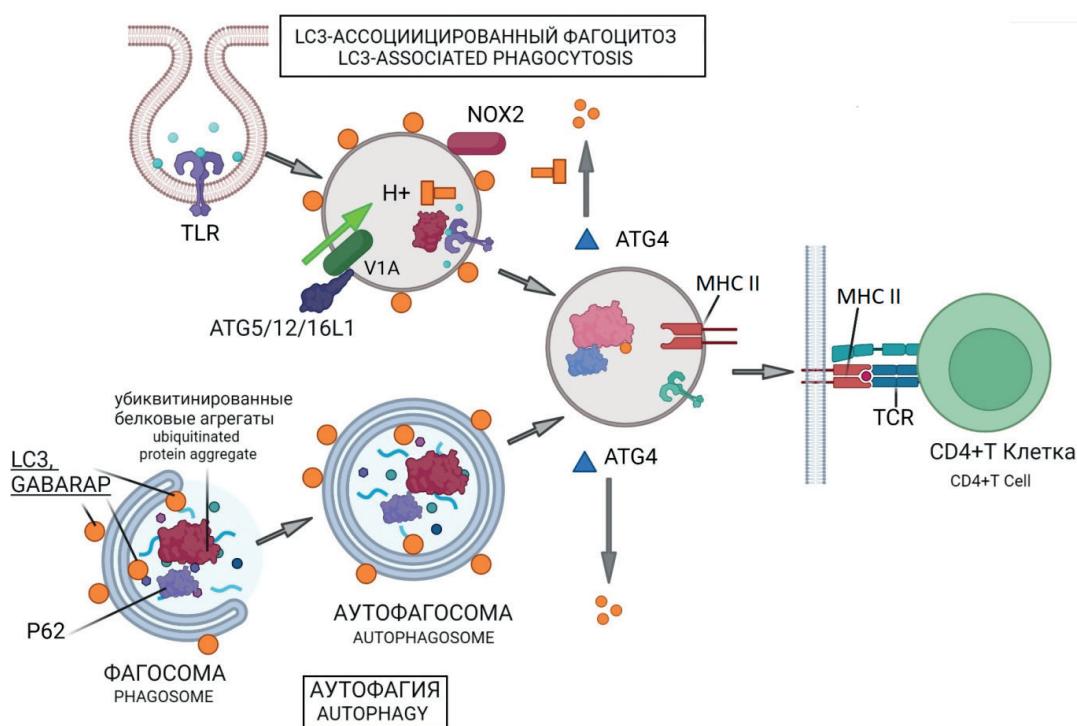


Рисунок 7. Презентация антигена для молекул главного комплекса гистосовместимости II класса с помощью канонической и неканонической аутофагии [52]

Примечание. Во время LC3-ассоциированного фагоцитоза (LAP) груз взаимодействует с определенными рецепторами, такими как Toll-подобные рецепторы (TLR), включая TLR2. Это осуществляется благодаря слиянию комплекса LC3 с вакуолярной субъединицей ATФазы V1A. Ассоциированные с LC3 фагосомы в конечном итоге сливаются с компартментами, содержащими MHC класса II (MHC II). В них их груз расщепляется и загружается на молекулы MHC класса II, которые затем транспортируются на клеточную поверхность для CD4+T-клеток.

Макроаутофагия доставляет внутриклеточные антигены, такие как агрегаты убиквитинированных белков, которые рекрутируются в фагофоры рецепторами аутофагии, такими как p62, с аутофагосомами к MHC II. Затем эти внутриклеточные антигены также могут быть расщеплены лизосомальными гидролазами для загрузки на молекулы MHC класса II.

Figure 7. Antigen presentation for major histocompatibility complex class 2 molecules using canonical and non-canonical autophagy [52]

Note. During LC3 associated phagocytosis (LAP) the cargo engages certain receptors, such as Toll-like receptors (TLRs), including TLR2. This leads to the recruitment of the LC3 lipidation machinery (ATG5/12/16L1) via the vacuolar ATPase subunit V1A. LC3 associated phagosomes eventually fuse with MHC class II containing compartments (MHC II). In these their cargo is degraded and loaded onto MHC class II molecules which are then transported to the cell surface for CD4+T cell stimulation. Macroautophagy delivers intracellular antigens, such as ubiquitinylated protein aggregates that are recruited into phagophores by autophagy receptors such as p62, with autophagosomes to MHC II. These intracellular antigens can then also be broken down by lysosomal hydrolases for loading onto MHC class II molecules.

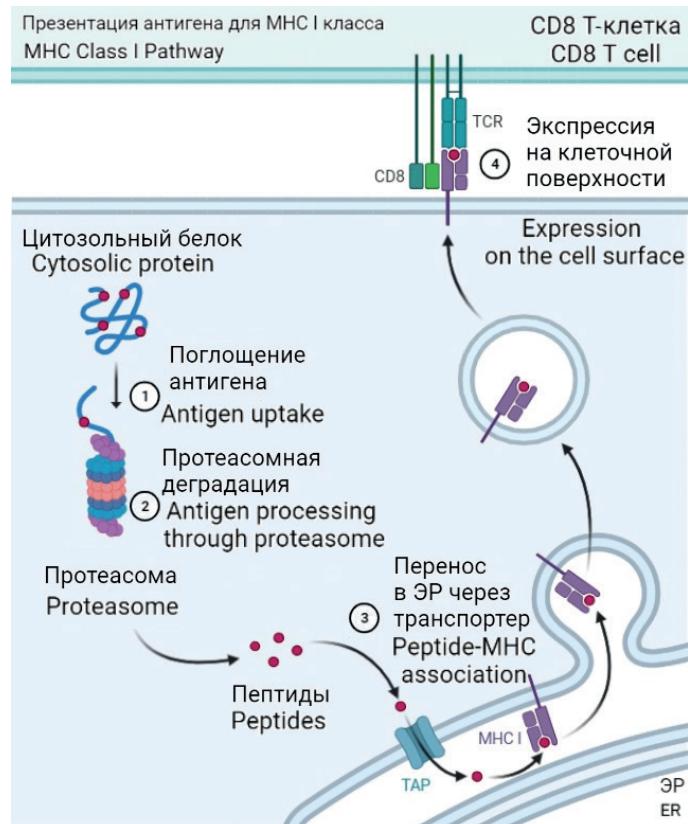


Рисунок 8. Презентация антигена для МНС I класса [14]

Примечание. Эндогенно синтезированные белки и дефектные рибосомные продукты превращаются в пептиды в цитозоле протеасомными и цитозольными протеазами. Затем пептиды транспортируются транспортером, осуществляемым с процессингом антигена (TAP), в эндоплазматический ретикулум, где комплекс загрузки пептидов (PLC) реализуется пептидом, TAP, МНС класса I,  $\beta$ 2-микроглобулином ( $\beta$ 2m) и другими вспомогательными белками. Нагруженные молекулы МНС класса I транспортируются на поверхность клетки в секреторных везикулах.

Figure 8. Antigen presentation for MHC class I [14]

Note. Endogenously synthesized proteins and defective ribosomal products (DRiPs) are processed to peptides in the cytosol by the proteasome and cytosolic proteases. Peptides are then transported by transporter associated with antigen processing (TAP) to the ER where the peptide loading complex (PLC) is formed by a peptide, TAP, MHC class I,  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2m) and other assistant proteins. Loaded MHC class I molecules are transported to the cell surface in secretory vesicles.

ние поврежденных митохондрий и чрезмерное IL-1 $\beta$ -зависимое воспаление, усиливая гибель макрофагов.

Эти данные свидетельствуют о том, что аутофагия может модулировать выживаемость и провоспалительную передачу сигналов многими путями, включая активацию NF- $\kappa$ B во многих типах клеток. Поскольку аутофагия играет несколько ролей в иммунной системе, нарушение канонической и неканонической аутофагии влияет на развитие аутоиммунитета.

#### Презентация внутриклеточного антигена для МНС II класса при участии канонической аутофагии

Механизм аутофагии стимулирует как внутри-, так и внеклеточное представление антигена для ограниченной презентации МНС II класса CD4 $^{+}$ Т-клеткам. При LAP материал, подлежащий удалению, взаимодействует с определенны-

ми рецепторами, такими как TLR, включая TLR2. Это осуществимо благодаря слиянию комплекса LC3 с вакуолярной субъединицей АТФазы V1A. Данное слияние стабилизируется NOX2, которая ингибирует расхождение LC3 путем окисления ATG4. LC3-ассоциированные фагосомы расщепляют иммунобиологический груз и сливаются с компартментами, содержащими МНС II класса, которые затем транспортируют антигены на клеточную поверхность CD4 $^{+}$ Т-клеток.

Каноническая аутофагия доставляет внутриклеточные антигены, такие как агрегаты убиквитинированных белков за счет рецепторов p62. Агрегаты белков в составе фагофор, содержащие белок аутофагии p62, сливаются с МНС II класса. Затем эти внутриклеточные антигены также расщепляются гидролазами для презентации CD4 $^{+}$ Т-клеткам (рис. 7).

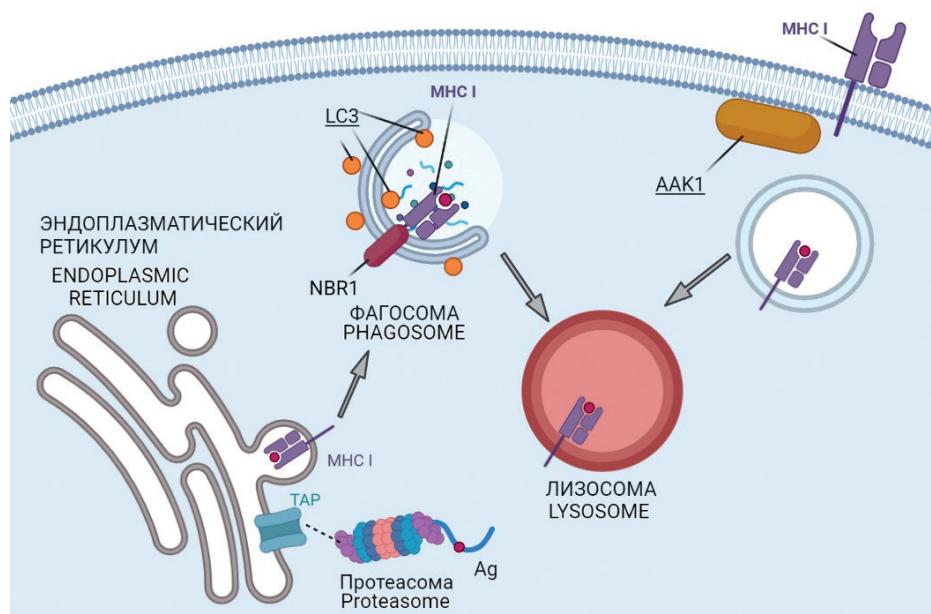


Рисунок 9. Подавление экспрессии МНС I класса путем аутофагии [52]

Примечание. Поверхностная экспрессия МНС класса I подавляется механизмом макроаутофагии. Молекулы МНС класса I загружаются в эндоплазматический ретикулум (ЭР) преимущественно пептидами, которые образуются в результате протеасомной деградации, а затем импортируются в ЭР через транспортер, связанный с презентацией антигена (ТАР). На пути к клеточной мембране из ЭР молекулы МНС класса I становятся мишенью для макроаутофагии с помощью рецептора аутофагии NBR1, что приводит к их лизосомной деградации в клеткахadenокарциномы протоков поджелудочной железы (PDAC). Кроме того, процессинг LC3 действует части механизма интернализации молекул МНС класса I на клеточной мембране, включая киназу 1, ассоциированную с AP2 (AAK1). Это приводит к более быстрой интернализации и деградации молекул МНС класса I в дендритных клетках.

Figure 9. Suppression of MHC class I expression by autophagy [52]

Note. MHC class I surface expression is down-regulated by the macroautophagy machinery. MHC class I molecules are loaded in the endoplasmic reticulum (ER), primarily with peptides that originate from proteasomal degradation and are then imported into the ER via the transporter associated with antigen presentation (TAP). On their way to the cell membrane from the ER, MHC class I molecules are targeted for macroautophagy by the autophagy receptor NBR1, resulting in their lysosomal degradation in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells. In addition, LC3 lipidation recruits parts of the internalization machinery to MHC class I molecules at the cell membrane, including AP2 associated kinase 1 (AAK1). This leads to a more rapid internalization and degradation of MHC class I molecules in dendritic cells.

Каноническая аутофагия способствует доставке в МНС II класса как цитозольных, так и ядерных антигенов [40, 57, 59]. Лиганды главного комплекса гистосовместимости включают также ортологи ATG8, такие как LC3-II, GABAR и GABAR-L1, а также рецепторы аутофагии, такие как TAX1BP1 [13, 70]. Взаимодействие с данными рецепторами важно для типов клеток с ограниченной фагоцитарной активностью: В-клетки, эпителиальные и эндотелиальные клетки [55]. Предполагается, что механизм аутофагии необходим для загрузки МНС II в В-клетки. После активации антигенпрезентирующих клеток В-клетки могут стимулировать цитотоксические ответы CD4<sup>+</sup>Т-клеток. Наравне с В-клетками, эпителиальные клетки тимуса также используют механизм аутофагии. В эпителиальных клетках, ответственных за образование Т-клеток, аутофагосомы сливаются с МНС II класса, однако дефицитные по ATG5 эпителиальные клетки тимуса представляют измененный состав пепти-

дов на своих молекулах МНС II класса. Это способствует изменению позитивной и негативной селекции CD4<sup>+</sup>Т-клеток в тимусе. Происходит снижение позитивной селекции специфичных Т-клеточных рецепторов и увеличению количества аутореактивных Т-клеток. По литературным данным, потеря ATG5 в лимфатических эндотелиальных клетках приводит к потере регуляторной пролиферации фенотипа Т-клеток [22]. После этого в дендритных клетках запускается механизм аутофагии для поддержания регуляторной функции CD4<sup>+</sup>Т-клеток, что приводит к аутоиммунитету [53]. И наоборот, регуляторные CD4<sup>+</sup>Т-клетки должны подавить аутофагию в дендритных клетках во избежание аутоиммунитета [2]. Таким образом, регуляция аутофагии, при которой происходит презентация аутоантигена к МНС II в лимфатических эндотелиальных клетках и регуляция аутофагии в дендритных клетках влияет на функцию CD4<sup>+</sup>Т-клеток.

## Презентация внеклеточного антигена для МНС II класса при участии LAP

Презентация внеклеточного антигена МНС II к CD4<sup>+</sup>Т-клеткам также осуществляется за счет LAP, который направляет продукты деградации внеклеточного груза для эффективной презентации антигена МНС II. Сниженная стимуляция CD4<sup>+</sup>Т-клеток, поддерживаемая МНС II, в отсутствие LAP, а также ограниченная презентация антигена дендритными клетками приводит к аутоиммунному энцефаломиелиту и аутоиммунным заболеваниям ЦНС у мышей. Похожее явление происходит после адаптивного переноса аутоиммунных CD4<sup>+</sup>Т-клеток у мышей с дефицитом ATG5 или NOX2 [3, 32, 33]. Было показано, что LAP фагоцитоз поддерживает процессинг бактериальных везикул наружной мембранны для стимуляции регуляторных CD4<sup>+</sup>Т-клеток в кишечнике мыши [9]. Экспрессия ATG4B, которая нечувствительна к АФК продуцируемыми NOX2, ингибирует презентацию эндоцитарного дрожжевого антигена на молекулах МНС II класса к *Candida albicans* [42]. Следовательно, неканоническая аутофагия предоставляет информацию о внеклеточных антигенах во время фагоцитоза для более эффективной презентации антигена на молекулах МНС II класса к CD4<sup>+</sup>Т-клеткам.

## Презентация антигена для МНС I класса

Пептиды, представленные молекулами МНС I класса, образуются в результате протеасомной деградации в цитозоле и ядре [14]. Пептиды транспортируются в эндоплазматический ретикулум транспортером, связанным с презентацией антигена (ТАР). Как только высокоафинный окта- или пентамерный пептид встраивается в бороздку для связывания пептида, загрузочный комплекс расформированывается. Далее комплекс МНС I класса, содержащий необходимый пептид, транспортируется на клеточную поверхность для презентации CD8<sup>+</sup>Т-клеткам (рис. 8).

Поверхностная экспрессия МНС класса I подавляется механизмом макроаутофагии. Молекулы МНС I загружаются в эндоплазматический ретикулум (ЭР) преимущественно пептидами, которые образуются в результате протеасомной деградации, а затем импортируются в ЭР через транспортер, связанный с презентацией антигена (ТАР). На пути к клеточной мемbrane из эндоплазматического ретикулума молекулы МНС класса I становятся мишениями для макроаутофагии с помощью рецептора аутофагии NBR1, что приводит к их лизосомной деградации в клетках аденокарциномы протоков поджелудочной железы (PDAC). Кроме того, встраивание белков LC3 действует части механизма интернализации молекул МНС класса I на клеточной мемbrane, включая киназу-1, ассоциированную с AP2 (AAK1). Это приводит к более быстрой ин-

тернализации и деградации молекул МНС класса I в дендритных клетках (рис. 9).

Таким образом, механизм аутофагии направлен на молекулы МНС I класса для лизосомальной деградации в клетках, позволяя им избежать иммунного контроля, опосредованного CD8 Т-клетками.

## Заключение

Самое принципиальное отличие между канонической и неканонической аутофагией заключается в механизме активации процессов. Каноническая аутофагия индуцируется киназами mTOR и ULK-преинициаторным комплексом, в то время как неканоническая запускается поверхностью рецепторами. Далее запускается PI3K-комплекс, в канонической аутофагии содержащий WIPI и ATG2, а в неканонической аутофагии содержащий Rubicon.

Второе фундаментальное отличие необходимость генерации активных форм кислорода NOX2-комплексом в LAP, что отсутствует в канонической аутофагии.

Следующее отличие заключается в составе лизосомальной структуры: в аутофагии это белок фосфатидилэтаноламин, а в неканонической – фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин. Также в аутофагии двумембранный структура, а в неканонической аутофагии однослоистая мембрана.

Помимо структурных молекулярных отличий наблюдаются различия в значимости в иммунной системе, такие как участие в захвате и деградации внутренних и внешних патогенов, участие в секреторном пути, участие в провоспалительной передаче сигналов, а также презентация антигена для главного комплекса гистосовместимости МНС. Стоит заметить, что помимо участия аутофагии в презентации антигена для главного комплекса гистосовместимости МНС II класса, в нем участвует и LAP.

В последние годы стало ясно, что в дополнение к канонической функции механизма аутофагии во время ограниченной презентации антигена МНС II класса, части этого механизма используются для регуляции LAP, для деградации молекул МНС I класса и секреции антигенов во внеклеточных везикулах, включая различного рода патогенов.

Важно отметить, что неканоническая аутофагия присуща только фагоцитирующему клеткам и что нарушение протекания LAP ведет к появлению аутоиммунных ответов.

Макрофаги, лишенные или плохо выполняющие LAP, производят повышенное количество провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$  и IL-6), а также наблюдается снижение противовоспалительных цитокинов (IL-10 и TGF- $\beta$ ), что приводит к развитию аутоиммунных или аутово-

спалительных заболеваний. Одна из возможных причин нарушения правильного протекания LAP является дефицит фосфатидилсериновых рецепторов, необходимых для запуска процесса [60]. Взаимодействие фосфатидилсерина с TIM-4 рецепторами необходимо для утилизации макрофагами апоптотических телец и правильно-го протекания LAP [43]. Следующей возможной причиной возникновения нарушений протекания LAP являются, мутации в гене Rubcn, ответственного за правильное функционирование белка Rubicon [73]. Данные нарушения приводят к СКВ подобным явлениям, относящимся к аутоиммунным заболеваниям, приводящим к нару-шению иммунной системы. Схожие СКВ подоб-

ные явления встречаются в других аутоиммунных заболеваниях.

Замечено, что у больных аутоиммунными за-болеваниями нарушено своевременное поглоще-ние и утилизация макрофагами апоптотических клеток, вследствие чего наблюдаются снижение апоптоза и фагоцитарной активности, а затем и накопление апоптотических клеток. Предпола-гается, что в патогенезе аутоиммунных заболева-ний существенную роль занимает нарушенный клиренс мертвых клеток. Нарушение процесса гибели клеток в сочетании с их дефектным удале-нием приводит к накоплению внутриклеточных аутоантигенов, а затем и к аутоиммунитету.

## Список литературы / References

1. Деев Р.В., Билялов А.И., Жампейсов Т.М. Современные представления о клеточной гибели // Гены и Клетки, 2018. Т. 13, № 1. С. 6-19. [Deev R.V., Bilyalov A.I., Zhampaisov T.M. Modern ideas about cell death. *Geny i Kletki = Genes and Cells*, 2018, Vol. 13, no. 1, pp. 6-19. (In Russ.)]
2. Alissafi T., Banos A., Boon L., Sparwasser T., Ghigo A., Wing K., Vassilopoulos D., Boumpas D., Chavakis T., Cadwell K., Verginis P. Tregs restrain dendritic cell autophagy to ameliorate autoimmunity. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 127, no. 7, pp. 2789-2804.
3. Bhattacharya A., Parillon X., Zeng S., Han S., Eissa N.T. Deficiency of autophagy in dendritic cells protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 38, pp. 26525-26532.
4. Birmingham C.L., Canadien V., Gouin E., Troy E.B., Yoshimori T., Cossart P., Higgins D.E., Brumell J.H. Listeria monocytogenes evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy*, 2007, Vol. 3, no. 5, pp. 442-451.
5. Burman C., Ktistakis N.T. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.*, 2010, Vol. 584, no. 7, pp. 1302-1312.
6. Castillo E.F., Dekonenko A., Arko-Mensah J., Mandell M.A., Dupont N., Jiang S., Delgado-Vargas M., Timmins G.S., Bhattacharya D., Yang H., Hutt J., Lyons C.R., Dobos K.M., Deretic V. Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 46, pp. 168-176.
7. Chan E.Y., Kir S., Tooze S.A. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J. Biol. Chem.*, 2007, Vol. 282, no. 35, pp. 25464-25474.
8. Cheung P.F., Yang J., Fang R., Borgers A., Krengel K., Stoffel A., Althoff K., Yip C.W., Siu E.H.L., Ng L.W.C., Lang K.S., Cham L.B., Engel D.R., Soun C., Cima I., Scheffler B., Striefler J.K., Sinn M., Bahra M., Pelzer U., Oettle H., Markus P., Smeets E.M.M., Aarntzen E.H.J.G., Savvatakis K., Liffers S.T., Lueong S.S., Neander C., Bazarna A., Zhang X., Paschen A., Crawford H.C., Chan A.W.H., Cheung S.T., Siveke J.T. Progranulin mediates immune evasion of pancreatic ductal adenocarcinoma through regulation of MHC1 expression. *Nat. Commun.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 156. doi: 10.1038/s41467-021-27088-9.
9. Chu H., Khosravi A., Kusumawardhani I.P., Kwon A.H., Vasconcelos A.C., Cunha L.D., Mayer A.E., Shen Y., Wu W.L., Kambal A., Targan S.R., Xavier R.J., Ernst P.B., Green D.R., McGovern D.P., Virgin H.W., Mazmanian S.K. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science*, 2016, Vol. 352, no. 6289, pp. 1116-1120.
10. Cresswell P. A personal retrospective on the mechanisms of antigen processing. *Immunogenetics*, 2019, Vol. 71, no. 3, pp. 141-160.
11. Crotzer V.L., Blum J.S. Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 6, pp. 3335-3341.
12. de Castro C.P., Jones S.A., Cheallaigh C.N., Hearnden C.A., Williams L., Winter J., Lavelle E.C., Mills K.H., Harris J. Autophagy regulates IL-23 secretion and innate T cell responses through effects on IL-1 secretion. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 8, pp. 4144-4153.
13. Dengjel J., Schoor O., Fischer R., Reich M., Kraus M., Müller M., Kreyberg K., Altenberend F., Brandenburg J., Kalbacher H., Brock R., Driessens C., Rammensee H.G., Stevanovic S. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2005, Vol. 102, no. 22, pp. 7922-7927.
14. Dersh D., Holly J., Yewdell J.W. A few good peptides: MHC class I-based cancer immunosurveillance and immuno-evasion. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021, Vol. 21, no. 2, pp. 116-128.
15. Dikic I., Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018, Vol. 19, no. 6, pp. 349-364.

16. Durgan J., Lystad A.H., Sloan K., Carlsson S.R., Wilson M.I., Marcassa E., Ulferts R., Webster J., Lopez-Clavijo A.F., Wakelam M.J., Beale R., Simonsen A., Oxley D., Florey O. Non-canonical autophagy drives alternative ATG8 conjugation to phosphatidylserine. *Mol. Cell.*, 2021, Vol. 81, no. 9, pp. 2031-2040.
17. Filomeni G., de Zio D., Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.*, 2015, Vol. 22, no. 3, pp. 377-388.
18. Florey O., Gammoh N., Kim S.E., Jiang X., Overholtzer M. V-ATPase and osmotic imbalances activate endolysosomal LC3 lipidation. *Autophagy*, 2015, Vol. 11, no. 1, pp. 88-99.
19. Ganley I.G., Lam du H., Wang J., Ding X., Chen S., Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284, no. 18, pp. 12297-12305.
20. Gluschnko A., Herb M., Wiegmann K., Krut O., Neiss W.F., Utermöhlen O., Krönke M., Schramm M. The  $\beta$  2 Integrin Mac-1 Induces Protective LC3-Associated Phagocytosis of Listeria monocytogenes. *Cell Host Microbe*, 2018, Vol. 23, no. 3, pp. 324-337.
21. Hansen M., Rubinsztein D.C., Walker D.W. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2018, Vol. 19, pp. 579-593.
22. Harlé G., Kowalski C., Dubrot J., Brighouse D., Clavel G., Pick R., Bessis N., Niven J., Scheiermann C., Gannagé M., Hugues S. Macroautophagy in lymphatic endothelial cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 2021, Vol. 218, no. 6, e20201776. doi: 10.1084/jem.20201776.
23. Harris J., Hartman M., Roche C., Zeng S.G., O'Shea A., Sharp F.A., Lambe E.M., Creagh E.M., Golenbock D.T., Tschopp J., Kornfeld H., Fitzgerald K.A., Lavelle E.C. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J. Biol. Chem.*, 2011, Vol. 286, no. 11, pp. 9587-9597.
24. Hayashi K., Taura M., Iwasaki A. The interaction between IKK $\alpha$  and LC3 promotes type I interferon production through the TLR9-containing LAPosome. *Sci. Signal.*, 2018, Vol. 11, no. 528, eaan4144. doi: 10.1126/scisignal.aan4144.
25. Herb M., Gluschnko A., Schramm M. LC3-associated phagocytosis – The highway to hell for phagocytosed microbes. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2020, Vol. 101, pp. 68-76.
26. Heyworth P.G., Cross A.R., Curnutte J.T. Chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003, Vol. 15, no. 5, pp. 578-584.
27. Holmström K.M., Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2014, Vol. 15, no. 6, pp. 411-421.
28. Huang L., Guo Z., Wang F., Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2021, Vol. 6, no. 1, pp. 1-20.
29. Itakura E., Kishi C., Inoue K., Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAg. *Mol. Biol. Cell*, 2008, Vol. 19, no. 12, pp. 5360-5372.
30. Johansen T., Lamark T. Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *J. Mol. Biol.*, 2020, Vol. 432, no. 1, pp. 80-103.
31. Kahn B.B., Alquier T., Carling D., Hardie D.G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.*, 2005, Vol. 1, no. 1, pp. 15-25.
32. Keller C.W., Kotur M.B., Mundt S., Dokalis N., Ligeon L.A., Shah A.M., Prinz M., Becher B., Münz C., Lünemann J.D. CYBB/NOX2 in conventional DCs controls T cell encephalitogenicity during neuroinflammation. *Autophagy*, 2021, Vol. 17, no. 5, pp. 1244-1258.
33. Keller C.W., Sina C., Kotur M.B., Ramelli G., Mundt S., Quast I., Ligeon L.A., Weber P., Becher B., Münz C., Lünemann J.D. ATG-dependent phagocytosis in dendritic cells drives myelin-specific CD4 $^{+}$  T cell pathogenicity during CNS inflammation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2017, Vol. 114, no. 52, pp. 11228-11237.
34. Kim Y.M., Jung C.H., Seo M., Kim E.K., Park J.M., Bae S.S., Kim D.H. mTORC1 phosphorylates UVRAg to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Mol. Cell*, 2015, Vol. 57, no. 2, pp. 207-218.
35. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Braughton K.R., Whitney A.R., Nauseef W.M., Malech H.L., deLeo F.R. Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 1, pp. 636-643.
36. Lam G.Y., Cemma M., Muise A.M., Higgins D.E., Brumell J.H. Host and bacterial factors that regulate LC3 recruitment to Listeria monocytogenes during the early stages of macrophage infection. *Autophagy*, 2013, Vol. 9, no. 7, pp. 985-995.
37. Lamprinaki D., Zhekova A., Wittmann A., James S., Dicks J., Iwakura Y., Saijo S., Wang X., Chow C.W., Roberts I., Korcsmaros T., Mayer U., Wileman T., Kawasaki N. LC3-associated phagocytosis is required for dendritic cell inflammatory cytokine response to gut commensal yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Immunology*, 2022, Vol. 8, 1397. doi: 10.3389/fimmu.2017.01397.
38. Lazarou M., Sliter D.A., Kane L.A., Sarraf S.A., Wang C., Burman J.L., Sideris D.P., Fogel A.I., Youle R.J. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, 2015, Vol. 524, no. 7565, pp. 309-314.
39. Lee J.P.W., Foote A., Fan H., Castro C.P., Lang T., Jones S.A., Gavrilescu N., Mills K.H.G., Leech M., Morand E.F., Harris J. Loss of autophagy enhances MIF/macrophage migration inhibitory factor release by macrophages. *Autophagy*, 2016, Vol. 12, no. 6, pp. 907-916.
40. Leung C.S., Haigh T.A., Mackay L.K., Rickinson A.B., Taylor G.S. Nuclear location of an endogenously expressed antigen, EBNA1, restricts access to macroautophagy and the range of CD4 epitope display. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 5, pp. 2165-2170.
41. Liang C., Feng P., Ku B., Dotan I., Canaani D., Oh B.H., Jung J.U. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAg. *Nat. Cell Biol.*, 2006, Vol. 8, no. 7, pp. 688-699.

42. Ligeon L.A., Pena-Francesch M., Vanoaica L.D., Núñez N.G., Talwar D., Dick T.P., Münz C. Oxidation inhibits autophagy protein deconjugation from phagosomes to sustain MHC class II restricted antigen presentation. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 1508. doi: 10.1038/s41467-021-21829-6.
43. Ma J., Becker C., Lowell C.A., Underhill D.M. Dectin-1-triggered recruitment of light chain 3 protein to phagosomes facilitates major histocompatibility complex class II presentation of fungal-derived antigens. *J. Biol. Chem.*, 2012, Vol. 287, no. 41, pp. 34149-34156.
44. Martinez J., Almendinger J., Oberst A., Ness R., Dillon C.P., Fitzgerald P., Hengartner M.O., Green D.R. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2011, Vol. 108, no. 42, pp. 17396-17401.
45. Martinez J., Cunha L.D., Park S., Yang M., Lu Q., Orchard R., Li Q.Z., Yan M., Janke L., Guy C., Linkermann A., Virgin H.W., Green D.R. Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature*, 2016, Vol. 533, no. 7601, pp. 115-119.
46. Martinez J., Malireddi R.K., Lu Q., Cunha L.D., Pelletier S., Gingras S., Orchard R., Guan J.L., Tan H., Peng J., Kanneganti T.D., Virgin H.W., Green D.R. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat. Cell Biol.*, 2015, Vol. 17, no. 7, pp. 893-906.
47. Martire B., Rondelli R., Soresina A., Pignata C., Broccoletti T., Finocchi A., Rossi P., Gattorno M., Rabusin M., Azzari C., Dellepiane R.M., Pietrogrande M.C., Trizzino A., di Bartolomeo P., Martino S., Carpino L., Cossu F., Locatelli F., Maccario R., Pierani P., Putti M.C., Stabile A., Notarangelo L.D., Ugazio A.G., Plebani A., de Mattia D. Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Chronic Granulomatous Disease: an Italian multicenter study. *Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 126, no. 2, pp. 155-164.
48. Masud S., Prajsnar T.K., Torraca V., Lamers G.E.M., Benning M., Vaart M.V.D., Meijer A.H. Macrophages target Salmonella by Lc3-associated phagocytosis in a systemic infection model. *Autophagy*, 2019, Vol. 15, no. 5, pp. 796-812.
49. Mitchell G., Cheng M.I., Chen C., Nguyen B.N., Whiteley A.T., Kianian S., Cox J.S., Green D.R., McDonald K.L., Portnoy D.A. Listeria monocytogenes triggers noncanonical autophagy upon phagocytosis, but avoids subsequent growth-restricting xenophagy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2018, Vol. 115, no. 2, pp. 210-217.
50. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.*, 2007, Vol. 21, no. 22, pp. 2861-2873.
51. Mostowy S., Cossart P. Bacterial autophagy: restriction or promotion of bacterial replication? *Trends Cell Biol.*, 2012, Vol. 22, no. 6, pp. 283-291.
52. Münz C. Canonical and non-canonical functions of the autophagy machinery in MHC restricted antigen presentation. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 868888. doi: 10.3389/fimmu.2022.868888.
53. Niven J., Madelon N., Page N., Caruso A., Harlé G., Lemeille S., Seemayer C.A., Hugues S., Gannagé M. Macroautophagy in dendritic cells controls the homeostasis and stability of regulatory T cells. *Cell Rep.*, 2019, Vol. 28, no. 1, pp. 21-29.
54. Noda T., Fujita N., Yoshimori T. The Ubi brothers reunited. *Autophagy*, 2008, Vol. 4, no. 4, pp. 540-541.
55. Paludan C., Schmid D., Landthaler M., Vockerodt M., Kube D., Tuschl T., Münz C. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*, 2005, Vol. 307, no. 5709, pp. 593-596.
56. Paul S., Kashyap A.K., Jia W., He Y.W., Schaefer B.C. Selective autophagy of the adaptor protein Bcl10 modulates T cell receptor activation of NF-κB. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 6, pp. 947-958.
57. Pérez L., McLetchie S., Gardiner G.J., Deffit S.N., Zhou D., Blum J.S. LAMP-2C Inhibits MHC Class II Presentation of Cytoplasmic Antigens by Disrupting Chaperone-Mediated Autophagy. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 6, pp. 2457-2465.
58. Quinn M.T., Gauss K.A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocytic oxidases. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, Vol. 76, no. 4, pp. 760-781.
59. Riedel A., Nimmerjahn F., Burdach S., Behrends U., Bornkamm G.W., Mautner J. Endogenous presentation of a nuclear antigen on MHC class II by autophagy in the absence of CRM1-mediated nuclear export. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 8, pp. 2090-2095.
60. Rodriguez-Manzanet R., Sanjuan M.A., Wu H.Y., Quintana F.J., Xiao S., Anderson A.C., Weiner H.L., Green D.R., Kuchroo V.K. T and B cell hyperactivity and autoimmunity associated with niche-specific defects in apoptotic body clearance in TIM-4-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 19, pp. 8706-8711.
61. Romao S., Gasser N., Becker A.C., Guhl B., Bajagic M., Vanoaica D., Ziegler U., Roesler J., Dengjel J., Reichenbach J., Münz C. Autophagy proteins stabilize pathogen-containing phagosomes for prolonged MHC II antigen processing. *J. Cell Biol.*, 2013, Vol. 203, no. 5, pp. 757-766.
62. Sabatini D.M. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, Vol. 6, no. 9, pp. 729-734.
63. Sanjuan M.A., Dillon C.P., Tait S.W., Moshiach S., Dorsey F., Connell S., Komatsu M., Tanaka K., Cleveland J.L., Withoff S., Green D.R. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*, 2007, Vol. 450, no. 7173, pp. 1253-1257.
64. Sanjuan M.A., Green D.R. Eating for good health: linking autophagy and phagocytosis in host defense. *Autophagy*, 2008, Vol. 4, no. 5, pp. 607-611.
65. Sanjuan M.A., Milastra S., Green D.R. Toll-like receptor signaling in the lysosomal pathways. *Immunol. Rev.*, 2009, Vol. 227, no. 1, pp. 203-220.
66. Satyavarapu E.M., Nath S., Mandal C. Desialylation of Atg5 by sialidase (Neu2) enhances autophagosome formation to induce anchorage-dependent cell death in ovarian cancer cells. *Cell Death Discov.*, 2021, Vol. 7, no. 1, 26. doi: 10.1038/s41420-020-00391-y.

67. Shintani T., Klionsky D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, Vol. 306, no. 5698, pp. 990-995.
68. Song Z., An L., Ye Y., Wu J., Zou Y., He L., Zhu H. Essential role for UVRAG in autophagy and maintenance of cardiac function. *Cardiovasc. Res.*, 2014, Vol. 101, no. 1, pp. 48-56.
69. Sun Q., Zhang J., Fan W., Wong K.N., Ding X., Chen S., Zhong Q. The RUN domain of rubicon is important for hVps34 binding, lipid kinase inhibition, and autophagy suppression. *J. Biol. Chem.*, 2011, Vol. 286, no. 1, pp. 185-191.
70. Suri A., Walters J.J., Rohrs H.W., Gross M.L., Unanue E.R. First signature of islet beta-cell-derived naturally processed peptides selected by diabetogenic class II MHC molecules. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 6, pp. 3849-3856.
71. Tattoli I., Sorbara M.T., Yang C., Tooze S.A., Philpott D.J., Girardin S.E. Listeria phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures. *EMBO J.*, 2013, Vol. 32, no. 23, pp. 3066-3078.
72. Wild P., McEwan D.G., Dikic I. The LC3 interactome at a glance. *J. Cell Sci.*, 2014, Vol. 127, Pt 1, pp. 3-9.
73. Wong S.W., Sil P., Martinez J. Rubicon: LC3-associated phagocytosis and beyond. *FEBS J.*, 2018, Vol. 285, no. 8, pp. 1379-1388.
74. Wu D.J., Adamopoulos I.E. Autophagy and autoimmunity. *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 176, pp. 55-62.
75. Yamamoto K., Venida A., Yano J., Biancur D.E., Kakiuchi M., Gupta S., Sohn A.S.W., Mukhopadhyay S., Lin E.Y., Parker S.J., Banh R.S., Paulo J.A., Wen K.W., Debnath J., Kim G.E., Mancias J.D., Fearon D.T., Perera R.M., Kimmelman A.C. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature*, 2020, Vol. 581, no. 7806, pp. 100-105.
76. Yang C.S., Lee J.S., Rodgers M., Min C.K., Lee J.Y., Kim H.J., Lee K.H., Kim C.J., Oh B., Zandi E., Yue Z., Kramnik I., Liang C., Jung J.U. Autophagy protein Rubicon mediates phagocytic NADPH oxidase activation in response to microbial infection or TLR stimulation. *Cell Host Microbe*, 2012, Vol. 11, no. 3, pp. 264-276.
77. Yoshikawa Y., Ogawa M., Hain T., Yoshida M., Fukumatsu M., Kim M., Mimuro H., Nakagawa I., Yanagawa T., Ishii T., Kakizuka A., Sztul E., Chakraborty T., Sasakawa C. Listeria monocytogenes ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat. Cell Biol.*, 2009, Vol. 11, no. 10, pp. 1233-1240.
78. Yu L., Strandberg L., Lenardo M.J. The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy*, 2008, Vol. 4, no. 5, pp. 567-573.
79. Zhao Z., Fux B., Goodwin M., Dunay I.R., Strong D., Miller B.C., Cadwell K., Delgado M.A., Ponpuak M., Green K.G., Schmidt R.E., Mizushima N., Deretic V., Sibley L.D., Virgin H.W. Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell Host Microbe*, 2008, Vol. 4, no. 5, pp. 458-469.
80. Zhong Y., Wang Q.J., Li X., Yan Y., Backer J.M., Chait B.T., Heintz N., Yue Z. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.*, 2009, Vol. 11, no. 4, pp. 468-476.
81. Zhong Z., Umemura A., Sanchez-Lopez E., Liang S., Shalapour S., Wong J., He F., Boassa D., Perkins G., Ali S.R., McGeough M.D., Ellisman M.H., Seki E., Gustafsson A.B., Hoffman H.M., Diaz-Meco M.T., Moscat J., Karin M. NF-κB Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell*, 2016, Vol. 164, no. 5, pp. 896-910.

#### Авторы:

**Ибрагимов Б.Р.** – аспирант кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, младший научный сотрудник НИЛ «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

**Скибо Ю.В.** – к.б.н., старший научный сотрудник НИЛ «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

**Абрамова З.И.** – д.б.н., профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, главный научный сотрудник НИЛ «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

#### Authors:

**Ibragimov B.R.**, Postgraduate Student, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Junior Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

**Skibo Yu.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

**Abramova Z.I.**, PhD, MD (Biology), Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Chief Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

# КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ФЕТО-МАТЕРИНСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Шевченко Ю.А., Назаров К.В., Сенников С.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Беременность является иммунологическим парадоксом, так как плод, несущий отцовские антигены, представляет собой полуаллогенный трансплантат, который должен отторгаться организмом матери, но в то же время плод полностью защищен от иммунной атаки, что предполагает сложные механизмы фето-материнского взаимодействия. Гормональные, аутоинные и паракринные иммунные сигналы и нейрональные пути играют важную роль в формировании и поддержании беременности. Беременность считается динамичным и активно модулируемым иммунологическим процессом, поэтому каждая стадия беременности, включая имплантацию эмбриона, плацентацию, развитие плода и роды, представлена уникальным иммунным статусом. Изучение механизмов поддержания беременности является жизненно важным для решения проблем невынашивания беременности неясной этиологии. Успешная беременность тесно связана со способностью материнской иммунной системы правильно адаптироваться к каждой конкретной стадии гестации. В данном обзоре рассмотрены основные клеточные популяции, такие как регуляторные подтипы Т- и В-клеток, Т-хелперные клетки, децидуальные натуральные киллеры, миелоидные супрессоры, эритроидные ядроодержащие клетки, которые обеспечивают фето-материнскую толерантность с помощью различных межклеточных и гуморальных механизмов. Материнские иммунные клетки в плаценте не атакуют клетки плода (трофобласти) из-за толерогенного микроокружения, созданного регуляторными Т-клетками и другими иммунными клетками. Во время беременности каждая субпопуляция Т-хелперных клеток играет ключевую роль в стимулировании развития плода за счет продукции ангиогенных факторов, обеспечивая иммунный надзор и подавляя аберрантные реакции эффекторных клеток против полуаллогенного плода. Накопление миелоидных супрессоров особенно актуально там, где для выживания необходима иммунная толерантность. Децидуальные NK-клетки тесно взаимодействуют с клетками трофобласта и секрецируют цитокины, которые способствуют росту, опосредуют дифференцировку, инвазию трофобластов и ремоделирование спиральной артерии. Благоприятное толерогенное состояние в утробе матери предрасполагает новорожденного к тяжелым инфекциям, особенно тем, которые вызваны внутриклеточными патогенами, поэтому толерантность плода может отличаться от других

**Адрес для переписки:**

Сенников Сергей Витальевич  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 222-19-10.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail sennikovsv@gmail.com

**Address for correspondence:**

Sergey V. Sennikov  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,  
Novosibirsk, Russian Federation  
14 Yandrintsevskaya St  
Novosibirsk  
630099 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 222-19-10.  
Fax: +7 (383) 222-70-28.  
E-mail sennikovsv@gmail.com

**Образец цитирования:**

Ю.А. Шевченко, К.В. Назаров, С.В. Сенников  
«Клеточные механизмы поддержания фето-  
материнской толерантности во время беременности»  
// Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2.  
С. 253-270. doi: 10.15789/1563-0625-CMF-2451

© Шевченко Ю.А. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

Yu.A. Shevchenko, K.V. Nazarov, S.V. Sennikov “Cellular  
mechanisms for maintenance of feto-maternal tolerance during  
pregnancy”, Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya  
Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 253-270.  
doi: 10.15789/1563-0625-CMF-2451

© Shevchenko Yu.A. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-CMF-2451

типов толерантности из-за наличия различных клеток-иммуносупрессоров, таких как эритроидные клетки-супрессоры у новорожденных. По мере развития беременности свойства этих клеток динамически изменяются, чтобы своевременно удовлетворить возникающие при беременности запросы. Понимание иммунологических изменений, вызванных беременностью, может не только раскрыть новые терапевтические стратегии для улучшения исходов беременности, но и новые аспекты работы иммунной толерантности, применимые в других физиологических и патологических контекстах.

*Ключевые слова:* беременность, фето-материнская толерантность, полуаллогенный плод, эритроидные клетки

## CELLULAR MECHANISMS FOR MAINTENANCE OF FETO-MATERNAL TOLERANCE DURING PREGNANCY

Shevchenko Yu.A., Nazarov K.V., Sennikov S.V.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Pregnancy is an immunological paradox, since a fetus carrying paternal antigens is a semi-allogeneic transplant that should be rejected by the mother's body. However, the fetus is completely protected from immune attack, thus suggesting some complex mechanisms of feto-maternal interaction. Hormonal, autocrine and paracrine immune signals and neuronal pathways play an important role in the development and maintenance of pregnancy. Pregnancy is considered a dynamic and actively modulated immunological process at each stage of pregnancy, including embryo implantation, placentation, fetal development, and delivery, being represented by a unique immune status. Studying the mechanisms of maintenance of pregnancy is vital to address the problems of miscarriage of unknown etiology. Successful pregnancy is closely related to the ability of the maternal immune system to properly adapt for each distinct stage of gestation. This review considers the main cell populations, such as regulatory subtypes of T and B cells, T helper cells, decidual natural killers, myeloid suppressors, erythroid nucleated cells which provide feto-maternal tolerance via various intercellular and humoral mechanisms. Maternal immune cells in the placenta do not attack fetal cells (trophoblasts) due to the tolerogenic microenvironment created by regulatory T cells and other immune cells. During pregnancy, each subpopulation of T helper cells plays a key role in promotion of fetal development through the production of angiogenic factors, providing immune surveillance and suppressing aberrant effector cell responses against a semi-allogeneic fetus. Accumulation of myeloid suppressor cells is especially relevant, when the immune tolerance is required for survival. Decidual NK cells closely interact with trophoblast cells and secrete cytokines that promote growth, mediate differentiation, trophoblast invasion, and remodeling of the spiral arteries. The favorable tolerogenic state in utero predisposes the newborn to severe infections, especially those caused by intracellular pathogens. Hence, the fetal tolerance may differ from other types of tolerance due to the presence of various immunosuppressive cells, such as erythroid suppressor cells in newborns. In the course of pregnancy, the properties of these cells change dynamically in order to meet the demands that arise during pregnancy in a timely manner. Understanding the immunological changes induced by pregnancy may not only reveal new therapeutic strategies to improve pregnancy outcomes, but also highlight new aspects of how the immune tolerance works being applicable in other physiological and pathological contexts.

*Keywords:* pregnancy, fetal-maternal tolerance, haplo-allogeneic fetus, erythroid cells

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-15-00087, <https://rscf.ru/project/21-15-00087/>.

### Введение

Беременность является иммунологическим парадоксом, поскольку плод, несущий отцовские антигены, представляет собой полуаллогенный трансплантат, который должен отторгаться орга-

низмом матери, но в то же время плод полностью защищен от иммунной атаки. Одновременно материнская иммунная система должна уметь защищаться от патогенной инвазии, что предполагает сложные механизмы взаимодействия между плодом и организмом матери. Гормональные, аутокринные и паракринные иммунные сигналы и нейрональные пути играют важную роль в формировании и поддержании беременности [58]. Гормоны – основные коммуникативные сигналы

при репродукции и необходимы для установления беременности у всех млекопитающих. Гормоны, выделяемые нейроэндокринными, оварамиальными, децидуальными трофобластическими источниками дополняют друг друга при передаче сигналов [12]. Беременность – это не разовое событие подавления иммунитета, а сложный сценарий иммуномодуляции для поддержания эффективности матери, чтобы устраниить вторгшиеся патогены без повреждение плода.

Иммунологические фазы беременности со сроками вынашивания можно представить как: (1) первый триместр и начало второго триместра, во время которых происходят активная имплантация и плацентация, представляют собой иммунологический сценарий «заживления ран» и характеризуются провоспалительной средой, (2) второй триместр и начало третьего триместра представляют собой иммунологически супрессивную стадию, предлагающую материнско-плодную толерантность, и (3) заключительную часть третьего триместра, характеризующуюся восстановлением провоспалительного состояния для изгнания плода и плаценты. Беременность считается динамичным и активно модулируемым иммунологическим процессом, поэтому каждая стадия беременности, включая имплантацию эмбриона, плацентацию, развитие плода и роды, представлена уникальным иммунным статусом. Таким образом, успешная беременность тесно связана со способностью материнской иммунной системы правильно адаптироваться к каждой конкретной стадии гестации [43].

### Т-регуляторные клетки

Несмотря на то, что плод никогда напрямую не контактирует с тканями матери, такой контакт есть между плацентарными тканями матери и плацентарными тканями плода [13]. Считается, что материнские иммунные клетки в плаценте не атакуют клетки плода (трофобласти) из-за толерогенного микроокружения, созданного регуляторными Т-клетками и другими иммунными клетками. Т-клетки составляют от 10% до 20% децидуальных иммунных клеток в первом триместре беременности. Многие из них являются CD8<sup>+</sup>Т-клетками, в том числе подтипами с регуляторными свойствами. Среди CD4<sup>+</sup>Т-клеток от 10% до 30% экспрессируют фактор транскрипции Т-регуляторных клеток FoxP3, что значительно выше по сравнению с его обычной экспрессией в периферической крови. Т-регуляторные клетки представлены как тимическими, так и периферическими клетками и фенотипически неоднородны в зависимости от фазы менструального цикла и срока беременности. Т-регуляторные клетки необходимы для противовоспалительного перехода, сопровождающего имплантацию и раз-

витие плаценты. Пополнение пула маточных Т-регуляторных клеток происходит при подготовке к зачатию и начинается в пролиферативной фазе каждого цикла с эстроген-обусловленного усиления, которое достигает пика при овуляции [47]. Клетки эндометрия и плаценты высвобождают многочисленные хемокины, которые играют роль в привлечении иммуномодулирующих клеток. Для Т-регуляторных клеток наиболее характерны такие хемокины, как CCL1, CCL4, CCL17 и CCL22 [32]. У человека наблюдается повышение содержание циркулирующих Т-регуляторных клеток на ранних сроках беременности с пиком во втором триместре и снижение их количества в послеродовом периоде. Накопление Т-регуляторных клеток происходит во время максимальной инвазии децидуальной оболочки трофобластными клетками. У мышей существует аллоантителен-независимая экспансия Т-регуляторных клеток во время беременности одновременно с миграцией этих клеток из паховых лимфоузлов в периферическую кровь. Истощение CD25<sup>+</sup>, опосредованное моноклональными антителами *in vivo*, свидетельствует о том, что Т-регуляторные клетки важны для опосредования материнской толерантности к аллогенному плоду в фазе имплантации и на ранней стадии беременности, но не так необходимы для поддержания поздней стадии аллогенной беременности. Кроме того, у женщин с необъяснимым бесплодием наблюдается более низкая экспрессия мРНК FoxP3 в тканях эндометрия [36]. В работе [49] показано наличие трех различных типов децидуальных CD4<sup>+</sup>Treg при здоровой беременности с регуляторным фенотипом и способностью подавлять Т-клеточные ответы: CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup>, PD1<sup>hi</sup>IL-10<sup>+</sup> и TIGIT<sup>+</sup>FoxP3<sup>dim</sup>.

Эффекторные Т-регуляторные клетки являются наиболее доминирующим типом Т-регуляторных клеток в периферической крови и децидуальной оболочке на поздних сроках беременности у человека. При анализе репертуара Т-клеточного рецептора (TCR) единичных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD127<sup>low</sup> эффекторных Т-регуляторных клеток при беременности было показано, что клонально увеличенные эффекторные Т-регуляторные клетки наблюдались только в децидуальной оболочке, но не в периферической крови и их содержание было выше в 3-м триместре, чем в 1-м триместре. С другой стороны, обычные клонотипические эффекторные Т-регуляторные клетки между децидуальной оболочкой и периферической кровью наблюдались редко. Децидуальные эффекторные Т-регуляторные клетки могут распознавать некоторые антигены, экспрессирующиеся на границе фето-материнской линии и пролиферируют

при стимуляции антигеном, однако эффекторные Т-регуляторные клетки в периферической крови пролиферируют неспецифически. Таким образом, фетальные антиген-специфические Т-регуляторные клетки могут быть задействованы и размножаются антиген-специфически при взаимодействии плода и матери, а также поликлонально пролиферируют в системном кровотоке во время беременности [59].

Исследования на мышах показывают, что существует по крайней мере три механизма, с помощью которых Т-регуляторные клетки облегчают имплантацию и развитие плаценты. Подавление реактивных к антигенам отца CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-эффекторных клеток, которые способствуют повреждению трофобласта. Неконтролируемая экспансия Т-эффекторных клеток отрицательно влияет на развитие плаценты независимым от фетального антигена образом, предположительно через высвобождение воспалительных цитокинов, а также через антиген-зависимую цитотоксичность трофобластов. Децидуальные Т-регуляторные клетки секретируют IL-10 и TGF- $\beta$  и экспрессируют CD25, CTLA4 и PD-L1, которые способствуют ограничению Т-эффекторных клеток на ранних стадиях беременности. Т-регуляторные клетки действуют на другие лейкоциты и негемопоэтические клетки, влияющие на децидуальную поддержку имплантации: противовоспалительному и толерогенному фенотипу в альтернативно активированных (M2) макрофагах и толерогенных ДК через TGF- $\beta$ , IL-10, и CTLA-4-опосредованные механизмы. Индоламин 2,3-диоксигеназа (IDO), производимая толерогенными ДК, ухудшает выживаемость Th1-клеток, а гемоксигеназа-1 (HO-1), секретируемая Т-регуляторными клетками направлена на внутриматочные ДК и поддерживает их незрелое состояние. Т-регуляторные клетки становятся важными регуляторами материнских сосудистых изменений, которые необходимы для нормального плацентарного развития и адекватного доступа плаценты к материнской крови [59].

В исследовании [54] определяли соотношение эффекторных и наивных Т-регуляторных клеток во время беременности. Доля клеток эффекторных Т-регуляторных клеток в периферической крови была снижена во 2-м и 3-м триместрах и восстановилась в послеродовом периоде. Напротив, количество клеток наивных Т-регуляторных клеток не изменилось в эти же сроки беременности. Доля общих Т-регуляторных клеток, которые были суммой эффекторных и наивных Т-регуляторных клеток не увеличивались в середине беременности. Основные механизмы изменения соотношения этих клеток во время беременности: 1) постоянное производство и под-

держание пула наивных Т-регуляторных клеток во время беременности за счет экспорта из тимуса и увеличения выживаемости путем экспрессии антиапоптотической молекулы bcl-2; 2) миграция и экспансия эффекторных CCR5<sup>+</sup>Т-клеток из периферической крови к фето-материнскому барьеру за счет хемокинов CCL3, CCL4 и CCL5, которые экспрессируются тканью плаценты во время беременности и являются лигандами для CCR5; 3) естественные Т-регуляторные клетки наиболее необходимы именно на ранних стадиях беременности (табл. 1).

Способность Т-регуляторных клеток трансдифференцироваться в эффекторные Т-клетки в случае инфекции, чрезмерного воспаления или нарушения развития плода дает возможность прервать беременность и обеспечить материнское выживание [8].

### В-регуляторные клетки

В-регуляторные клетки представляют собой редкую субпопуляцию В-клеток (менее 10% от общего количества В-клеток) с регуляторными/супрессорными функциями, которые обеспечивают один из механизмов периферической толерантности. Основные функции В-регуляторных клеток включают ингибирование активации Th1-клеток, дифференцировки Th17-клеток, продвижение и поддержание популяции Т-регуляторных клеток. Главным подавляющим механизмом В-регуляторных клеток является секреция IL-10, который может ингибировать хемокины и выработку провоспалительных цитокинов, тем самым подавляя эффекторные механизмы иммунной системы. Однако существуют и другие механизмы, которые включают секрецию TGF- $\beta$  (особенно для дифференциации толерогенных ДК), продукцию индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), межклеточный контакт за счет взаимодействия CD80/86 с Т-клетками, ингибирование PD-L1 Т-фолликулярных клеток-помощников и CD73-зависимая продукция аденоцина. Наиболее изученная субпопуляция В-регуляторных клеток определяется экспрессией CD24<sup>hi</sup> и CD38<sup>hi</sup>. Фенотипически эти клетки также экспрессируют IgM, IgD, CD5, CD10 и CD1d, напоминающие переходные В-клетки. Связь В-регуляторных клеток с успехом беременности впервые была обнаружена у мышей – увеличение количества CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>В-регуляторных клеток приводило к предотвращению иммунологического выкида (табл. 1). Фактически, передача В-регуляторных клеток мышам с предрасположенностью к выкиду способствует развитию материнско-плодной толерантности, приводя к увеличению Т-регуляторных клеток и поддерживая дендритные клетки в незрелом состоянии. Женщины, получавшие во время беременности ритуксимаб, разрушающее В-клетки

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ, ПРИНИМАЮЩИЕ УЧАСТИЕ В РЕГУЛЯЦИИ БЕРЕМЕННОСТИ  
TABLE 1. MAIN CELL POPULATIONS INVOLVED IN THE REGULATION OF PREGNANCY

Клеточные популяции Cell populations	Фенотип Phenotype	Механизмы действия Mechanisms of action	Гуморальные факторы Humoral factors	1-й триместр 1 <sup>st</sup> trimester	2-й триместр 2 <sup>nd</sup> trimester	3-й триместр 3 <sup>rd</sup> trimester	Ссылки References
<b>Эффекторные Т-регуляторные клетки</b> Effector T regulatory cells	CD25 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD127 <sup>low</sup>	<b>Подавление реактивных к антигенам отца CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-эффекторных клеток</b> Suppression of paternally reactive CD8 <sup>+</sup> cytotoxic T effector cells	IL-10, TGF- $\beta$	<b>Снижение в периферической крови.</b> Повышение в десидуальной оболочке Decrease in peripheral blood. Increase in decidua	<b>Снижение в периферической крови.</b> Decrease in peripheral blood	<b>Снижение в периферической крови.</b> Decrease in peripheral blood. Increase in decidua	8, 54, 59
<b>Десидуальные Т-регуляторные клетки</b> Decidual T regulatory cells	CD25 <sup>hi</sup> FoxP3 <sup>+</sup> , PD1 <sup>hi</sup> IL-10 <sup>+</sup> TIGIT <sup>+</sup> FoxP3 <sup>dim</sup>	<b>Ограничение Т-эффекторных клеток, противовоспалительный и толерогенный фенотип в M2-макрофагов и толерогенных ДК, подавление активации эффекторных клеток</b> Restriction of T effector cells, anti-inflammatory and tolerogenic phenotype in M2 macrophages and tolerogenic DCs, suppression of activation of effector cells	CCL1, CCL4, CCL17, CCL2, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35	<b>Повышение в десидуальной оболочке</b> Increase in decidua	<b>Пик в десидуальной оболочке</b> Peak in decidua	<b>Снижение в десидуальной оболочке</b> Decrease in decidua	32, 47, 49, 59
<b>В-регуляторные клетки</b> B regulatory cells	CD24 <sup>hi</sup> , CD38 <sup>hi</sup> , IgM, IgD, CD5, CD10, CD1d	<b>Межклеточные контакты, ингибирование PD-L1 Т-фолликулярных клеток-помощников, CD73-зависимая продукция аденоизина</b> Intercellular contacts, inhibition of PD-L1 T follicular helper cells, CD73-dependent production of adenosine	IL-10, TGF- $\beta$ , IDO	<b>Повышение в десидуальной оболочке, необходимы для имплантации</b> Increase in decidua, required for implantation			6, 18, 29, 30, 31, 38, 56

Таблица 1 (продолжение)  
Table 1 (continued)

Клеточные популяции Cell populations	Фенотип Phenotype	Механизмы действия Mechanisms of action	Гуморальные факторы Humoral factors	1-й триместр 1 <sup>st</sup> trimester	2-й триместр 2 <sup>nd</sup> trimester	3-й триместр 3 <sup>rd</sup> trimester	Ссылки References
<b>Th1-клетки</b> Th1 cells	CD4	<b>Провоспалительная среда для инвазии трофобластов, восстановления эпителия матки, удаления клеточного мусора после имплантации</b> Pro-inflammatory environment for trophoblast invasion, uterine epithelium repair, removal of cellular debris after implantation	IL-12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$	Повышенны в децидуальной оболочке Elevated in decidua		Повышенны в децидуальной оболочке Elevated in decidua	42
<b>Th2-клетки</b> Th2 cells	CD4	<b>Формирование толерантности матери к плоду, подавление развития Th1- и Th17-иммунитета</b> Formation of mother's tolerance to the fetus, suppression of the development of Th1 and Th17 immunity	IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, транскрипционный фактор GATA-3 IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, transcription factor GATA-3		Повышенны в децидуальной оболочке Increased in the decidua		48
<b>Th17-клетки</b> Th17 cells		<b>(ROR) C2 или ROR-<math>\alpha</math>, CD161, IL-23R</b> (ROR) C2 or ROR- $\alpha$ , CD161, IL-23R		Формирование инфекционного иммунитета, стимуляция секреции прогестерона, индукция активации децидуальных NK-клеток, нарушение сосудистую реактивность маточных артерий Formation of infectious immunity, stimulation of progesterone secretion, induction of activation of decidual NK cells, impaired vascular reactivity of the uterine arteries	Сопоставимо или незначительное снижение в децидуальной оболочке и периферической крови Comparable or slight decrease in the decidua and peripheral blood	Сопоставимо или незначительное снижение в децидуальной оболочке и периферической крови Comparable or slight decrease in decidua and peripheral blood	61

Таблица 1 (окончание)  
Table 1 (continued)

Клеточные популяции Cell populations	Фенотип Phenotype	Механизмы действия Mechanisms of action	Гуморальные факторы Humoral factors	1-й триместр 1 <sup>st</sup> trimester	2-й триместр 2 <sup>nd</sup> trimester	3-й триместр 3 <sup>rd</sup> trimester	Ссылки References
<b>Гранулоцитарные миелоидные супрессоры</b> Granulocytic myeloid suppressors	CD117, CD135, CD115, CD62L, CCR2, MHCII, CD80, аргиназа I, iNOS CD117, CD135, CD115, CD62L, CCR2, MHCII, CD80, аргиназа I, iNOS	<b>Подавление пролиферации Т-клеток, индукция Th2-ответов и ингибирование Th1-ответов зависимым контактным способом</b> Inhibition of T cell proliferation, induction of Th2 responses, and inhibition of Th1 responses in a contact dependent manner	<b>Аргиназа I, индуцируемая NO-синтазой, реактивные формы кислорода</b> Arginase I, inducible NO synthase, reactive oxygen species	<b>Максимальное содержание в decidуальной оболочке и межворсинчатом пространстве</b> Maximum content in the decidua and intervillous space	<b>Снижение к моменту родов в decidуальной оболочке и межворсинчатом пространстве</b> Decrease by the time of delivery in the decidua and intervillous space	33, 34, 35	
<b>Децидуальные естественные NK-клетки</b> Decidual natural NK cells	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>+</sup>	<b>Ремоделирование спиральной артерии, стимулируют регуляторные Т-клетки, образование IDO-продуцирующих моноцитов, индукция апоптоза эффекторных Т-клеток</b> Spiral artery remodeling, stimulate regulatory T cells, formation of IDO-producing monocytes, induction of apoptosis of effector T cells	<b>Максимальное количество в decidуальной оболочке</b> Maximum amount in decidua	IL-8 и IP-10, VEGF-C, Arg1, Arg2, TGF- $\beta$ 1, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, TNF $\alpha$	12, 20, 39, 41, 57, 64		
<b>Эритроидные ядроносодержащие клетки</b> Erythroid nucleated cells	CD71 (рецептор трансферрина), TER119 у мыши и CD235a у человека, PDL-1 и PDL-2	<b>Иммunoупрессия, снижение пролиферативной активности Т-клеток, подавление продукции TNF<math>\alpha</math>, предотвращение воспаления и развития вредного иммунного ответа против плода</b> Immuno suppression, reduction of T cell proliferation activity, suppression of TNF $\alpha$ production, prevention of inflammation and the development of a detrimental immune response against the fetus	<b>Аргиназа-2, эритропоэтин, HLA-G</b> Arginase -2, erythropoietin, HLA-G	<b>Усиление эритропоэза плода</b> Increased fetal erythropoiesis	<b>Усиление эритропоэза плода</b> Increased fetal erythropoiesis	<b>Максимальное количество в периферической крови</b> Maximum amount in peripheral blood	9, 15, 17, 45

антитело, имели более высокий уровень выкидышей в первом триместре. В течение 6 месяцев после зачатия у таких пациентов частота самоизъязвленных абортов составляла 12%, при этом у 40% пациентов роды наступали до 37 недель, а 39% новорожденных имели низкий уровень В-клеток, который нормализовался в течение 6 месяцев без клинически выраженных побочных эффектов. Почти 95% В-клеток CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>hi</sup> экспрессируют рецептор гонадотропного гормона человека [6, 18, 29].

Стимуляция *in vitro* децидуальных и мононуклеарных клеток периферической крови с помощью активатора TLR9 CpG и CD40L (имитирует Т-клеточно-зависимый запуск CD40), показало более высокую частоту IL-10-продуцирующих В-клеток децидуального происхождения по сравнению с В-клетками, происходящими из периферической крови. Даже при отсутствии дополнительной стимуляции CpG и CD40L В-клетки децидуальной оболочки, полученные в 1-м и 2-м триместре беременности, экспрессировали IL-10. Иммуногистохимический анализ децидуальной оболочки 1-го и 2-го триместров показал, что В-клетки были расположены близко к Т-клеткам. Эта совместная локализация поддерживает возможность функционального взаимодействия, которое может происходить в обоих направлениях: Т-клеточные цитокины могут способствовать индукции В-регуляторных клеток, тогда как IL-10-продуцирующие В-регуляторные клетки способствуют индукции Foxp3-позитивных Т-регуляторных клеток [5].

Роль В-регуляторных клеток во время беременности еще не полностью изучена, однако в исследованиях, проведенных на сегодняшний день, уже очевидны некоторые факты: 1) снижение уровня и/или дисфункция циркулирующих В-регуляторных клеток могут приводить к неблагоприятным акушерским исходам, 2) В-регуляторные клетки могут быть задействованы в создании соответствующих условий, необходимых для имплантации, и 3) В-регуляторные клетки могут восстанавливать толерантность плода в условиях, связанных с иммунными осложнениями беременности. Исследования на мышах показали, что снижение частоты В-регуляторных клеток во время ранней беременности связано со спонтанным абортом (табл. 2). Пассивный перенос CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>hi</sup>B10-клеток селезенки способствует сохранению беременности путем ингибирования созревания дендритных клеток и увеличения популяции Т-регуляторных клеток. У женщин, перенесших нормальную беременность, количество CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>В-клеток, продуцирующих IL-10, в периферической крови значительно выше по сравнению с небеременными

женщинами или женщинами, перенесшими самопроизвольный аборт. Кроме того, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>В-регуляторные клетки, изолированные из периферической крови, женщин в первом триместре беременности, могут успешно ингибировать секрецию TNF активированными эффекторными Т-клетками *ex vivo* [30]. В-регуляторные клетки, связанные с беременностью не имеют эквивалентного унифицирующего «маркера», общего для всех субпопуляций В-клеток различных фенотипов, которые проявляют регуляторные свойства. Это может быть связано с эволюционным развитием В-регуляторных клеток, а также с пластичностью функции В-клеток, так как на молекулярную архитектуру и дифференциальную функцию фенотипов В-клеток сильно влияет внешняя среда и присутствие чужеродных антигенов [38]. Следовательно, в динамическом сценарии беременности, когда экспрессия отцовских антигенов увеличивается с течением времени, разумно ожидать соответствующих ответных изменений в архитектуре В-клеток для поддержки адаптации материнского иммунного ответа к беременности. Подмножества В-регуляторных клеток при беременности у мышей включают IL-10<sup>+</sup>В-клетки, CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>В-клетки, CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>В-клетки, CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>В-клетки, IL-35<sup>+</sup>В-клетки и PIBF1<sup>+</sup> хориоидибульные В-клетки. У людей идентифицированные субпопуляции В-регуляторных клеток во время беременности представляют собой IL-10<sup>+</sup>В-клетки, CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>В-клетки, CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> традиционные В-клетки, CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>В-клетки памяти, CD38<sup>hi</sup>CD27<sup>hi</sup> плазмобласты, В-клетки маргинальной зоны и IL-35<sup>+</sup>В-клетки. Способность продуцировать IL-10 и, в меньшей степени, TGF-β остается отличительной чертой для идентификации В-регуляторных клеток, дополнительные маркеры, такие как продукция IL-35 и белка PIBF1, придают регуляторную способность В-клеткам во время беременности [31, 56].

#### Т-хелперные клетки

Ключом к успешному функционированию иммунной системы во время беременности, которая должна быть способна реагировать на вторжение патогенов, одновременно поддерживая толерантность к полуаллогенному плоду, является скоординированный сдвиг баланса иммунных ответов Т-хелперных (Th) клеток на каждом этапе беременности. Во время беременности каждая субпопуляция Т-хелперных клеток играет ключевую роль в стимулировании развития плода за счет продукции ангиогенных факторов, обеспечивая иммунный надзор и подавляя аберрантные реакции эффекторных клеток против полуаллогенного плода (табл. 1).

После имплантации трофобласты проникают в эндометрий и дифференцируются в синцитиотрофобласты, где они модулируют привлечение лейкоцитов, включая Т-клетки, в децидуальную оболочку посредством секреции различных хемоаттрактантных факторов. На этой ранней стадии беременности клетки Th1 составляют до 40% пула децидуальных CD4<sup>+</sup> клеток. Провоспалительная среда необходима для модуляции инвазии трофобластов, стимуляции адекватного восстановления эпителия матки и удаления клеточного мусора после имплантации бластоцисты в матку [42].

После имплантации и плацентации наступает стадия быстрого роста и развития плода. На этом этапе мать, плацента и плод являются симбиотическими, поэтому преобладающий цитокиновый профиль быстро сдвигается с провоспалительного Th1 на противовоспалительный Th2, для которого характерна продукция IL-4, IL-5 и IL-13 и экспрессия транскрипционного фактора GATA-3. Пиковый уровень этих цитокинов наблюдается в течение второго триместра, где воспалительные эпизоды связаны с отрицательными исходами беременности [48]. При беременности ДК матки активно участвуют в дифференцировке наивных Т-клеток в Th2-клетки.

В периферической крови здорового человека Th17-клетки встречаются редко, среди CD4<sup>+</sup>Т-клеток они составляют 0,64-1,4%. Децидуальная оболочка содержит более высокое количество Th17-клеток, чем периферическая кровь, при этом и количество децидуальных клеток IL-17<sup>+</sup> коррелировало с количеством нейтрофилов, что позволяет предположить, что клетки IL-17<sup>+</sup> непосредственно вовлечены в инфильтрацию нейтрофилов и вызывают защитный иммунитет против внеклеточных микробов в матке [61].

У пациентов с необъяснимым самопроизвольным абортом доля Th17-клеток и содержание IL-23, индуцирующего Th17, выше в периферической крови и децидуальных тканях, чем при нормальной беременности (табл. 2). В этих тканях также повышен уровень RORC, важного фактора транскрипции Th17-клеток. Кроме того, Т-регуляторные клетки, которые способствуют гестационной толерантности, уменьшаются при самопроизвольном aborte. Эстроген и плацентарный белок 14 индуцируют дифференцировку Т-регуляторных клеток и снижают секрецию IL-17 [21].

### Миелоидные супрессоры

Клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSC) – это миелоидные клетки, обладающие способностью подавлять различные типы иммунных ответов. В то время как другие миелоидные клетки, такие как моноциты, макрофаги, дендритные клетки, полиморфноядерные

нейтрофилы, эозинофилы и базофилы обычно активируются сильными сигналами через патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) или опасные молекулярные паттерны (DAMP), что приводит к провоспалительной реакции, миелоидные супрессоры появляются скорее в условиях хронической инфекции или при воспалении и обладают противовоспалительным действием. Миелоидные супрессоры в основном состоят из двух типов клеток, называемых гранулоцитарными миелоидными предшественниками, которые имеют фенотипическое сходство с нейтрофилами, и моноцитарными миелоидными предшественниками, которые фенотипически подобны моноцитам, что на сегодняшний день делает невозможным четкую идентификацию миелоидных супрессоров только по фенотипическим характеристикам [14].

Накопление миелоидных супрессоров особенно актуально там, где для выживания необходима иммунная толерантность [35]. Даже в физиологических условиях при нормальной беременности происходит 10-кратное накопление гранулоцитарных, но не моноцитарных супрессоров по сравнению с кровью здоровых небеременных женщин [34]. Содержание гранулоцитарных супрессоров значительно снижено у женщин при самопроизвольных абортах, в то время как изменения содержания моноцитарных супрессоров не происходит. Гранулоцитарные супрессоры характеризуются экспрессией CD117, CD135 (маркеры незрелых или недифференцированных миелоидных клеток), CD115, CD62L, CCR2 (маркеры воспалительных моноцитов), МНСII, CD80, аргиназы I и iNOS, а также отсутствием экспрессии F4/80 или CD11c. В частности, исчезновение гранулоцитарных супрессоров у мышей приводило к тяжелой резорбции эмбриона и снижению содержания CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Т-клеток. *In vitro* гранулоцитарные супрессоры способны стимулировать индукцию FoxP3 в клетках CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Т-клетках, TGF- $\beta$ /b-катенин зависимым путем [33] (табл. 1).

Содержание гранулоцитарных супрессоров наиболее высоко на ранних сроках беременности и снижается в течение нескольких дней после рода до уровня небеременных женщин. Плацента обогащена гранулоцитарными миелоидными супрессорами по сравнению с кровью плода и матери, а клетки располагаются преимущественно в децидуальной оболочке и межворсинчатом пространстве. У женщин с самопроизвольным прерыванием беременности соотношение гранулоцитарных миелоидных супрессоров в периферической крови и плаценте было приблизительно одинаковым [62]. Миелоидные супрессорные клетки, разной локализации (периферическая кровь, матка, децидуальная оболочка) задейству-

ют различные эффекторные механизмы для модуляции иммунных эффекторных клеток во время беременности. У человека гранулоцитарные супрессоры во время беременности подавляют пролиферацию Т-клеток, экспрессируют аргиназу I, индуцируют NO-синтазу, реактивные формы кислорода. Экспрессия аргиназы I приводит к подавлению активности цепи CD3z на Т-клетках и к снижению пролиферации Т-клеток. У беременных мышей основным механизмом подавления Т-клеток с помощью гранулоцитарных супрессоров является продукция реактивных форм кислорода. Плацентарные гранулоцитарные супрессоры индуцируют Th2-ответы и ингибируют Th1-ответы зависимым контактным способом. Во время беременности моноцитарные супрессоры могут способствовать снижению цитотоксичности NK-клеток системно, а также локально в матке за счет подавления перфорин-зависимого механизма цитотоксичности и поверхностного рецептора NKG2D на NK-клетках. Децидуальные ДК находятся в толерогенном состоянии со сниженной костимуляторной активностью и изменением экспрессии цитокинов [35].

### Везикулы

Различные типы клеток во время беременности вызывают нормальное развитие плаценты через межклеточные взаимодействия и растворимые факторы. Внеклеточные везикулы используются для диагностики различных заболеваний, поскольку их состав варьируется в зависимости от типа клетки-источника и патологических характеристик. МикроРНК (miRNA) и белки плаценты регулируют воспалительные реакции и вторжение трофобластов через межклеточную доставку в плацентарное микроокружение [63].

Клетки трофобаста экспрессируют большое количество иммунорегуляторных цитокинов, которые регулируют функции иммунных клеток матери. Внеклеточные везикулы оказывают иммуностимулирующее или иммуносупрессорное действие в зависимости от их происхождения и состава. Плацентарный Fas лиганд высвобождается из клеток синцитиотрофобаста через везикулы на границе фето-материнского барьера для обеспечения иммунопривилегированного статуса. Везикулы, несущие FASLG и CD274, ингибируют сигналы активации Т-клеток, такие как сигналы от киназы JAK3, и обладают иммуномодулирующим действием. Помимо FASLG TNFSF10 также высвобождается из через везикулы, что приводит к апоптозу Т-клеток и/или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Кроме того, везикулы, несущие растворимые молекулы, связанные с цепью МНС класса I (MIC) и UL16-связывающие белки (ULBP), ингибируют KLRK1-зависимую (лектино-подобный receptor K1 киллерных клеток)-

цитотоксичность мононуклеарных клеток и вызывают у плода ускользание от иммунной системы на ранних сроках беременности [9].

Чрезмерные провоспалительные эффекты в плаценте связаны с возникновением расстройств беременности, которые характеризуются системным воспалением (презклампсия и преждевременные роды). Макрофаги в децидуальной оболочке матери регулируют воспалительный ответ секретируя различные цитокины и хемокины. Фибронектин переносится в макрофаги через везикулы, полученные из клеток трофобласта для стимулирования производства интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Везикулы, полученные из трофобластов, увеличивают миграцию моноцитов, создавая тем самым воспалительное окружение за счет производства IL-1 $\beta$ , IL-6, SERPINE1, колонистимулирующего фактора 2 (CSF2) [44].

В течение первого триместра беременности везикулы плацентарного происхождения вызывают васкуляризацию и ангиогенез через механизм чувствительности к кислороду в условиях гипоксии. Протеомный анализ предполагает, что везикулы трофобластов вызывают активацию матриксных металлопротеиназ и MAPK-активированных путей передачи сигналов. Кроме того, везикулы трофобластов, содержащие эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS) способствуют прогнозированию низкой биологической активности оксида азота (NO) у пациентов с презкламсией [63].

Чтобы удовлетворить повышенные метаболические потребности матери и плода и обеспечить адекватное снабжение растущего плода питательными веществами и кислородом, на ранней стадии беременности требуется достаточное remodeling спиральной артерии и физиологическая адаптация сердечно-сосудистой системы. Миграция гладкомышечных клеток сосудов – важный процесс remodeling спиральной артерии матки человека, который способствует успешной беременности. Экзосомы, выделенные из клеточных линий вневорсинчатого трофобаста (линии JEG-3 и HTR-8/SVneo), способны стимулировать миграцию гладкомышечных клеток сосудов. Миграция эндотелиальных клеток у беременных женщин *in vitro* может стимулироваться циркулирующими экзосомами. Биоактивность экзосом является максимальной в первом триместре и постепенно снижается с увеличением гестационного возраста [66].

### Децидуальные натуральные киллеры

Децидуальные естественные клетки-киллеры, наиболее распространенные иммунные клетки на границе раздела матери и плода в первом триместре беременности. Эти клетки экспрессируют высокий уровень цитолитических эффекторов – перфорин, гранзимы и гранулизин. Однако они

не убивают мишени классических NK-клеток, а также мишени периферических NK-клеток [7].

Децидуальные естественные NK-клетки составляют 70–90% лейкоцитов матки и являются наиболее обильной популяцией материнских лейкоцитов в течение первого триместра беременности у человека [24]. Во время беременности человека децидуальные NK-клетки тесно взаимодействуют с клетками трофобласта и секretируют цитокины, которые способствуют росту, опосредуют дифференцировку, инвазию трофобластов и ремоделирование спиральной артерии [12] (табл. 1).

NK-клетки классифицируются как клетки с фенотипом  $CD56^{\text{dim}}CD16^+$  и  $CD56^{\text{bright}}CD16^+$ .  $CD56^{\text{dim}}CD16^+$  NK-клетки являются главной популяцией периферической крови, в то время как в эндометрии присутствуют преимущественно  $CD56^{\text{bright}}CD16^+$  NK-клетки, составляя около 20% лимфоцитов в пролиферативной фазе, до 40–50% в секреторной фазе и достигают максимума (70–80%) в децидуальной оболочке человека на ранних сроках беременности. NK-клетки матки могут происходить из нескольких источников: это могут быть клетки, дифференцировавшиеся из NK периферической крови, из незрелых предшественников в матке или непосредственно из гематопоэтических  $CD34^+$  предшественников [39]. Для миграции децидуальных NK к фето-плацентарному барьеру необходимо взаимодействие CXCL12/CXCR4 [57]. NK-клетки также могут подавлять воспалительные Т-хелперные клетки 17-го типа [20], стимулируют регуляторные Т-клетки и образование моноцитов, продуцирующих индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO), индуцируют апоптоз эффекторных Т-клеток [41].

Нормальная физиологическая функция клеток децидуальных NK-клеток гарантирует нормальную беременность, тогда как снижение функции клеток приводит к прерыванию беременности [22] (табл. 2). Во время беременности в первом триместре децидуальные NK-клетки обычно обнаруживаются вблизи мигрирующих интерстициальных трофобластов, а также рядом с реконструируемыми спиральными артериями. Такое характерное пространственно-временное распределение децидуальных NK-клеток говорит о том, что децидуальные NK-клетки участвуют в процессе ремоделирования спиральной артерии человека напрямую, разрушая артериальную мышечную оболочку, и косвенно, направляя инвазию интерстициальных трофобластов в спиральные артерии. Генетические исследования человека продемонстрировали, что комбинации киллерных иммуноглобулинов-подобных рецепторов (KIRs) на материнских децидуальных NK-клетках и молекулы HLA-C на трофобластах плода могут определять репродуктивный успех.

В частности, женщины, несущие два гаплотипа KIR A в сочетании с плодом, несущим отцовский гаплотип HLA-C2, несут самый высокий риск акушерских осложнений, связанных с дефектной плацентацией, таких как преэклампсия и ограничение роста плода [23, 50] (табл. 2).

Децидуальные NK-клетки регулируют инвазию трофобластов путем производства хемокинов IL-8 и IP-10, которые связываются с CXCR1 и CXCR3, которые экспрессируются инвазивными EVT соответственно. Децидуальные NK-клетки являются основным источником VEGF-C, Arg1, Arg2, и TGF- $\beta$ 1 в первом триместре для ремоделирования спиральной артерии. Кроме того, децидуальные NK-клетки могут продуцировать G-CSF, GM-CSF, M-CSF, TNF $\alpha$ , которые также участвуют в успешной беременности [64].

#### Эритроидные ядросодержащие клетки

Каким бы благоприятным ни было толерогенное состояние в утробе матери, существуют данные, что оно предрасполагает новорожденного к тяжелым инфекциям, особенно тем, которые вызваны внутриклеточными патогенами и нарушают иммунные ответы на вакцинацию в постлеровом периоде [55]. Таким образом, наблюдаемое различие в ответах неонатального врожденного иммунитета от тех, которые возникли в более позднем возрасте, и их уязвимость к инфекции могут вытекать из этого толерогенного состояния. Таким образом, толерантность плода может отличаться от других типов толерантности из-за наличия различных клеток-иммуносупрессоров, таких как эритроидные клетки-супрессоры у новорожденных. Эти клетки экспрессируют рецептор трансферрина (CD71) и маркер эритроидного происхождения (TER119) у мыши и CD71 $^+$  и CD235a $^+$  у человека. Ранее была показана активная продукция цитокинов эритроидными клетками фетальной печени, а также их естественная супрессорная активность [1, 51, 52, 53]. Присутствие эритроидных ядросодержащих клеток с супрессорной активностью способствует восприимчивости новорожденных к инфекции, а ее постепенное снижение по мере прогрессирования постнатального развития проходит параллельно с постепенным уменьшением частоты CD71 $^+$  эритроидных клеток в селезенке [15, 17].

Периферическая кровь беременных женщин в третьем триместре обогащена эритроидными клетками CD71 $^+$ , в то время как они почти отсутствуют у небеременных женщин и здоровых взрослых лиц обоего пола (табл. 1). Плацентарные CD71 $^+$  эритроидные клетки обладают иммуносупрессивными свойствами и снижают пролиферативную способность как CD4 $^+$ , так и CD8 $^+$  Т-клеток при стимуляции анти-CD3/CD28 антителами *in vitro*. Кроме того, периферические CD71 $^+$  эритроидные клетки беремен-

ТАБЛИЦА 2. ОСНОВНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ПРИВОДЯЩИЕ К ПАТОЛОГИИ БЕРЕМЕННОСТИ

TABLE 2. MAIN CELLULAR MECHANISMS LEADING TO THE PATHOLOGY OF PREGNANCY

Патология беременности, причины Pathology of pregnancy, causes	Ссылки References
<b>Самопроизвольный аборт</b> Spontaneous abortion	
<b>Снижение количества и функциональной активности циркулирующих Treg-клеток, снижение уровня мРНК FoxP3 эндометрия</b> Decrease in the number and functional activity of circulating Treg cells, decrease in the level of endometrial FoxP3 mRNA	36
<b>Снижение частоты В-регуляторных клеток во время ранней беременности в децидуальной оболочке</b> Decreased frequency of B regulatory cells during early pregnancy in the decidua	6, 18, 29, 30
<b>Повышение доли Th17-клеток и содержание IL-23, индуцирующего Th17, повышение уровня RORC в периферической крови и децидуальной оболочке</b> An increase in the proportion of Th17 cells and the content of IL-23, which induces Th17, an increase in the level of RORC in the peripheral blood and decidua	21
<b>Снижение частоты миелоидных гранулоцитарных супрессоров в децидуальной оболочке и межворсинчатом пространстве</b> Decreased frequency of myeloid granulocytic suppressors in the decidua and intervillous space	34, 62
<b>Снижение функциональной активности децидуальных NK-клеток</b> Decreased functional activity of decidual NK cells	22
<b>Истощение CD71<sup>+</sup> эритроидных клеток, приводящее к инфекции и гипоксии в кровотоке плода</b> Depletion of CD71 <sup>+</sup> erythroid cells leading to infection and hypoxia in the fetal circulation	16
<b>Преэклампсия и эклампсия</b> Preeclampsia and eclampsia	
<b>Системное воспаление</b> Systemic inflammation	44
<b>Повышение концентрация внеклеточной плодной ДНК или количества плодных клеток в материнской крови</b> Increasing the concentration of extracellular fetal DNA or the number of fetal cells in maternal blood	26, 28
<b>Повышение количества эритробластов в пуповинной крови в связи с гипоксией плода</b> Increase in the number of erythroblasts in cord blood due to fetal hypoxia	40
<b>Снижение репарации ДНК, конвергентное удлинение, убиквитинирование белков, перенос везикул, а также нарушение регуляции клеточного цикла эритробластов</b> Decreased DNA repair, convergent elongation, protein ubiquitination, vesicle transport, and erythroblast cell cycle dysregulation	40
<b>Низкая экспрессия HLA-G на клетках трофобласта</b> Low expression of HLA-G on trophoblast cells	4, 19
<b>Нарушение смещения иммунитета к цитокинам II типа в децидуальной оболочке</b> Impaired bias of immunity to type II cytokines in the decidua	48
<b>Дефектная плацентация</b> Defective placentation	
<b>Сочетание гаплотипа KIR A децидуальных NK-клеток матери с гаплотипом HLA-C2 на трофобластах плода</b> Combination of KIR A haplotype of maternal decidual NK cells with HLA-C2 haplotype on fetal trophoblasts	23, 50
<b>Преждевременные роды</b> Preterm birth	
<b>Накопление активированных эффекторных клеток памяти и активированные материнские Т-клетки, экспрессирующих гранзим В и перфорин в децидуальной оболочке</b> Accumulation of activated effector memory cells and activated maternal T cells expressing granzyme B and perforin in the decidua	8

ных дозозависимо подавляют продукцию TNF $\alpha$  CD14 $^{+}$  клетками при стимуляции антигенами *L. monocytogenes*.

Неонатальные CD71 $^{+}$  эритроидные клетки человека, индуцированные беременностью, CD71 $^{+}$  эритроидные клетки селезенки или плаценты при аллогенной беременности у мышей экспрессируют аргиназу-2, которая необходима для источения L-аргинина местного микроокружения и подавления продукции TNF $\alpha$ , что и обеспечивает их иммунодепрессивные свойства. CD71 $^{+}$  эритроидные клетки из тканей плаценты экспрессируют более высокие уровни этого фермента по сравнению с CD71 $^{+}$  эритроидными клетками селезенки, при этом CD71 $^{+}$  эритроидные клетки, полученные при сингенной беременности, не экспрессируют значительные уровни аргиназы-2. Индуцированные беременностью CD71 $^{+}$  эритроидные клетки, полученные из селезенки или плаценты аллогенных мышей, коэкспрессируют PDL-1 и PDL-2, однако неонатальные эритроидные клетки CD71 $^{+}$  не экспрессируют ни один из этих лигандов. CD71 $^{+}$  эритроидные клетки из плаценты человека, экспрессируют высокий уровень PDL-1, но не PDL-2. Эти наблюдения позволяют предположить, что существуют различия в фенотипической характеристики CD71 $^{+}$  эритроидных клеток в зависимости от их наличия в разных анатомических отделах. Благодаря экспрессии PDL-1 / PDL-2 на CD71 $^{+}$  эритроидных клетках, разумно предположить, что путь PDL-1 / PDL-2 может работать в функциональной иммуномодулирующей сети для продвижения иммуносупрессии на границе раздела матки и плода, в то время как блокада этого пути (например, при источении CD71 $^{+}$  эритроидных клеток) может привести к воспалительной реакции, которая способствует потере плода. Популяция эритроидных клеток локализуется преимущественно в области фетоматеринского барьера. Возможно, что экспансия эритроидных клеток происходит не только под действием аллоантисена, но и при гормональной модуляции иммунной системы, например под действием эритропоэтина и его рецепторов [9]. Для поддержания беременности необходимо за действовать множество механизмов адаптации всего тела, в том числе ускоренный эритропоэз. У беременных мышей происходит значительное увеличение клеточности и веса селезенки прежде всего за счет 40-кратного увеличения количества клеток эритроидного происхождения TER-119 $^{+}$ , которое достигается путем усиленной пролиферации и снижения апоптоза (за счет сниженной экспрессии рецептора смерти Fas и его лиганды Fasl) начиная с ранних сроков беременности. Клетки TER-119 $^{+}$ , выделенные на 12-й день беременности, имели повышенный уровень мРНК рецептора эритропоэтина. На поздних сроках бе-

ременности вес селезенки и доля TER-119 $^{+}$  снижается, но сохраняется пролиферативная активность и сниженный уровень апоптоза [45].

Большинство эритроидных клеток периферической крови беременных женщин имеют материнское происхождение, однако до 30% таких клеток являются эритробластами плода [28]. Причиной появления таких клеток в циркуляции является постоянный двунаправленный трафик клеток матери и плода. Повышенная концентрация внеклеточной плодной ДНК или количества плодных клеток в материнской крови (микрохимеризм плода) связаны с такими осложнениями беременности как преждевременные роды, преэклампсия, нарушение внутриутробного развития. Анализ специфической мРНК циркулирующих в материнском кровотоке эритроидных клеток указывает на активированное состояние на протяжении всей беременности [26].

Прямой контакт эритробластов плода и нестимулированных материнских РВМС индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов, включая IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , но снижает продукцию TGF- $\beta$  [41]. Эритробlastы пуповинной крови более эффективно подавляют воспалительную реакцию стимулированной периферической крови взрослых, чем моноциты пуповинной крови, что предполагает, что эритробlastы плода могут подавлять иммунный ответ матери, особенно активацию ее иммунных клеток, на предотвращение воспаления и развития вредного иммунного ответа против плода. В пуповинной крови человека эритробlastы наиболее многочисленны у новорожденных, рожденных женщинами, которым было выполнено преждевременное кесарево сечение [27]. Предполагается, что у человека увеличение количества эритробластов у недоношенных новорожденных может быть ответом на медиаторы воспаления, продуцируемые внутриутробно. Более того, изменения иммунорегуляторного потенциала эритробластов могут способствовать усилиению иммунной реактивности против плода, что приводит к преждевременным родам. Пуповинная кровь новорожденного, рожденного путем кесарева сечения, имела более низкую частоту эритроидных клеток, другой иммунорегуляторный фенотип и более провоспалительную среду, чем у рожденных через естественные родовые пути [16].

При таком опасном жизнеугрожающем состоянии как преэклампсия часто наблюдается повышение количества эритробластов в пуповинной крови, что связывают с повышенным эритропоэзом, вызванным гипоксией и повышенным уровнем эритропоэтина плода. Однако помимо вызванного гипоксией эритропоэтин-зависимого усиленного эритропоэза плода существуют дополнительные механизмы, которые

могут влиять на созревание эритроидных клеток, лежащее в основе более высокого содержания эритробластов в пуповинной крови при преэклампсии (табл. 2). Анализ транскриптома для подтверждения механизмов, которые могут влиять на созревание и энуклеацию эритроидов плода при преэклампсии, показал, что экспрессия некоторых генов, повышающих транскрипцию РНК и нескольких митохондриальных факторов, расположенных как на аутосомных, так и половых хромосомах различались между полами. Сравнение плодов мужского пола у пациенток с преэклампсией и нормальным давлением показало снижение репарации ДНК, конвергентное удлинение, убиквитинирование белков, перенос везикул, а также нарушение регуляции клеточного цикла. Наряду с этими изменениями, были повышены ингибиторы транскрипции РНК и несколько генов, важных для S-фазы и митоза в клеточном цикле. Фактор KLHDC8B, защищающий клетку против митотических ошибок и ядерных аномалий, также было повышен. Из-за отсутствия существенных различий в популяциях эритроидных клеток пуповинной крови у плодов мужского пола, рожденных в состоянии преэклампсии и при нормальном давлении, изменения в экспрессии генов нельзя объяснить повышенными поздними базофильными или полихроматофильными эритробластами, которые экспрессируют высокие уровни генов, связанных с митозом. Таким образом, наблюдаемые во время преэклампсии изменения могут быть связаны с нарушением регуляции клеточного цикла через пути рапамицина (mTOR) и AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK) [40].

#### Роль молекул главного комплекса гистосовместимости в поддержании беременности

Главный комплекс гистосовместимости человека (МНС) представляет собой большое семейство генов, расположенное в хромосоме 6. Оно включает в себя классические HLA классов Ia и II (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP). Эти гены и молекулы хорошо известны своей важностью в презентации антигенов и для трансплантации органов, а также связью с рядом заболеваний, особенно аутоиммунных. Однако область МНС также включает так называемые неклассические HLA Ib: HLA-E, HLA-F и HLA-G. Клетки синцитиотрофобластов лишены молекул HLA I, и маловероятно, что Т-клеточные ответы направлены против них. Защиту от лизиса натуральными киллерами обеспечивает неклассические HLA молекулы класса Ib, HLA-E и HLA-G, которые высоко экспрессируются во вневорсинчатых клетках трофобласта, выстилающих плаценту, и, возможно, также клетками синцитиотрофобласта. Однако помимо экспрессии молекул HLA класса Ib, вневорсинчатые клетки трофобласта экспрессируют небольшое коли-

чество полиморфного HLA-C, который может служить источником альлоузнавания со стороны материнских иммунных клеток [10]. В отличие от классических молекул HLA I, основная роль HLA-G не презентация антигена, а скорее иммунная регуляция через рецепторы ILT2, ILT4 и KIR2DL4. В отличие от HLA-G, HLA-E участвуют в презентации антигена рестрикованному подмножеству Т-клеток, и, кроме того, действуют как лиганды для NK-специфичных лектиновых рецепторов CD94/NKG2, которые регулируют активность этих клеток. В плаценте лиганды для HLA-E ограничены лидерными пептидами из HLA-G и HLA-C, частично из-за его гидрофобных свойств, которые ограничивают выбор пептидов, которые он может связывать [11, 46].

Расторимый HLA-G в материнском кровотоке преимущественно вырабатывается и выделяется клетками трофобласта во время беременности, но некоторое количество sHLA-G, возможно, продуцируется регуляторными Т-клетками и антигенпрезентирующими клетками, такими как моноциты и дендритные клетки (ДК) полученные из них. HLA-G обнаруживаются и в других тканях и биологических жидкостях: созревший комплекс кумулюс – ооцит, тимус, фолликулярная жидкость и семенная плазма, и особенно. Еще большее содержание HLA-G обнаруживается в иммунопривелигированных органах, таких как глаза, головной мозг, яички, эпидидимис и предстательная железа. Также HLA-G секретируется эритробластами, при этом повышенный эритробластоз плода выявляется у женщин у которых впоследствии развивается преэклампсия (табл. 2). Для беременности характерно повышение уровня циркулирующего HLA-G. Прямая связь между снижением экспрессии HLA-G и развитием преэклампсии была показана с помощью *in situ* гибридизации, иммуногистохимии на замороженных срезах и анализов РНК [25]. Циркулирующие уровни sHLA-G снижаются при преэклампсии, а в некоторых случаях это наблюдается как раннее событие беременности для женщин с последующим развитием преэклампсии по сравнению с женщинами с неосложненной беременностью [2, 65]. Во время имплантации эмбрионов количество транскриптов HLA-G увеличивается, в основном за счет изоформ HLA-G3 и HLA-G4, изоформа HLA-G1, являются наиболее экспрессируемой изоформой в трофобласте. Концентрация HLA-G1 и HLA-G5 увеличивается в два или пять раз у беременных женщин, что способствует модуляции материнских цитокинов с повышением уровня противовоспалительных цитокинов, таких как IL-3, IL-4 и IL-10. На третьем месяце беременности наблюдается максимальная экспрессия растворимых изоформ HLA-G в периферической крови. Неопределяемые уровни HLA-G в течение первых недель беременности предпо-

лагают осложненную беременность [4]. HLA-G5 косвенно регулирует инвазию трофобластов, связываясь с децидуальными лейкоцитами и индуцируя продукцию цитокинов, и, как следствие, положительно влияет на плаценту. Рекомбинантный HLA-G5 (rHLA-G5) стимулирует инвазию трофобластов при связывании с KIR2DL4 и ILT2, что приводит к активации пути ERK посредством фосфорилирования ERK. Соответственно, инвазия трофобластов была обращена с помощью блокирующих антител к ILT2 и KIR2DL4, а недостаточная инвазия трофобластов является характеристикой преэклампсии [19].

В лимфоидном компартменте CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>T-клетки, экспрессирующие HLA-G, демонстрируют сниженную пролиферацию в ответ на аллогенные и поликлональные стимулы. CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup>T-регуляторные клетки подавляют пролиферацию Т-клеток посредством экспрессии мембраносвязанного HLA-G1 и секреция IL-10 и sHLA-G5 в обратимом, независимом от клеточного контакта и зависимым от клеточного контакта способом. CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>T-клетки также могут приобретать аналогичный HLAG1<sup>+</sup> фенотип *in vitro* через трогоцитоз, что означает захват фрагментов мембраны из другой клетки. Покоящиеся и активированные CD25<sup>+</sup>T-клетки, которые приобретают экспрессию HLA-G1 путем трогоцитоза, функционально отличаются от HLA-G<sup>+</sup>тимических Т-регуляторных клеток и не секретируют sHLA-G5 и IL-10. Частота CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>T-регуляторных клеток увеличиваются в периферической крови на всем протяжении беременности по сравнению с небеременной контрольной группой [36].

Индуцированная HLA-G иммунная толерантность возникает посредством специфического клеточно-биологического процесса — трогоцитоза, который состоит из переноса мембранных белка между клетками. Транс-эндоцитоз, клеточный биологический процесс, связанный с трогоцитозом, позволяет иммунным клеткам приобретать белки, продукцируемые другими клетками посредством эндоцитоза. Однако, в отличие от транс-эндоцитоза CD80 и CD86, где экспрессия CTLA-4 на клетке-реципиенте, необходима и достаточна для захвата его костимулирующих лигандов из взаимодействующей клетки, существование и идентичность рецептора для HLA-G-трогоцитоза остаются неуловимыми. Таким образом, возможно, что HLA-G трогоцитоз не зависит от рецептора и придает клеткам-реципиентам временный иммуносупрессивный фенотип. HLA-G-трогоцитоз между первичным человеческими клетками экстраворсинчного трофобласта и децидуальными NK-клетками играет роль в балансировании иммунной толерантности и противовирусного иммунитета на

границе раздела матери и плода. Можно предположить, что HLA-G-трогоцитоз позволяет пролонгировать KIR2DL4-опосредованную передачу сигналов в децидуальные NK-клетки, что приводит к секреции цитокинов и других малых белков, играющих важную роль в развитии плаценты и плода, а также в установлении иммунной толерантности. Трогоцитоз может вносить вклад в широко распространенное HLA-G-опосредованное иммунное ингибирование на границе раздела матери и плода с участием децидуальных иммунных клеток, отличных от децидуальных NK-клеток [4].

## Заключение

Таким образом, показано, что поддержание беременности зависит от нормального формирования плаценты после инвазии трофобласта в эндометрий и ремоделирования сосудов. На ранних сроках беременности необходимо точно регулировать иммунную толерантность, воспалительную реакцию и адаптацию к гипоксии в микросреде плаценты с помощью регуляторных подтипов Т- и В-клеток, миелоидных супрессоров, децидуальных NK-клеток, эритробластов, транспорта везикул как средства межклеточной коммуникации про- или противовоспалительных цитокинов, экспрессии неклассических вариантов HLA-G, которые способствуют созданию противовоспалительного окружения и создания толерантности к антигенам полуаллогенного плода. Различные типы клеток, такие как трофобласти, эндотелиальные клетки, иммунные клетки, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и адипоциты, вызывают нормальное развитие плаценты через межклеточные взаимодействия через растворимые факторы (табл. 1). Восстановление провоспалительного состояния с помощью активированных Т-клеток приводит к изгнанию плода и завершению беременности. В процессе беременности происходит взаимодействие большого количества клеток, в результате чего иммунная система меняет свою направленность, обеспечивая оптимальную стратегию выживания плода, но предотвращая жизнеугрожающие состояния для организма матери (табл. 2). Динамически изменяющиеся свойства клеток различных популяций своевременно позволяют удовлетворить возникающие при беременности запросы. Таким образом, понимание механизмов поддержания нормальной беременности позволит объяснить фундаментальные механизмы регуляции репродуктивного успеха и создать клинические обоснования для терапии опасных акушерских состояний и возможного использования иммунотерапии для профилактики патологии беременности.

## Список литературы / References

1. Цырлова И.Г., Чеглякова В.В., Козлов В.А. Иммунодепрессивный эффект популяций клеток с различной эритропоэтической активностью у зародышей и новорожденных мышей // Онтогенез, 1985. Т. 16, № 2. С. 143-148. [Tsyrlova I.G., Cheglyakova V.V., Kozlov V.A. Immunosuppressive effect of cell populations with different erythropoietic activity in embryos and newborn mice. *Ontogenes = Ontogenesis*, 1985, Vol. 16, no. 2, pp. 143-148. (In Russ.)]
2. Al-Khunaizi N.R., Tabbara K.S., Farid E.M. Is there a role for HLA-G in the induction of regulatory T cells during the maintenance of a healthy pregnancy? *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2020, Vol. 84, no. 2, e13259. doi: 10.1111/aji.13259.
3. Arck P.C., Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat. Med.*, 2013, Vol. 19, no. 5, pp. 548-556.
4. Arnaiz-Villena A., Juarez I., Suarez-Trujillo F., López-Nares A., Vaquero C., Palacio-Gruber J., Martin-Villa J.M. HLA-G: Function, polymorphisms and pathology. *Int. J. Immunogenet.*, 2021, Vol. 48, no. 2, pp. 172-192.
5. Benner M., Feyaerts D., García C.C., Inci N., López S.C., Fasse E., Shadmanfar W., van der Heijden O.W.H., Gorris M.A.J., Joosten I., Ferwerda G., van der Molen R.G. Clusters of tolerogenic B cells feature in the dynamic immunological landscape of the pregnant uterus. *Cell Rep.*, 2020, Vol. 32, no. 13, 108204. doi: 10.1016/j.celrep.2020.
6. Chekol Abebe E., Asmamaw Dejenie T., Mengie Ayele T., Dagnew Baye N., Alegnehu Teshome A., Tilahun Muche Z. The role of regulatory B cells in health and diseases: a systemic review. *J. Inflamm. Res.*, 2021, Vol. 14, pp. 75-84.
7. Crespo Á.C., Mulik S., Dotiwala F., Ansara J.A., Sen Santara S., Ingersoll K., Ovies C., Junqueira C., Tilburgs T., Strominger J.L., Lieberman J. Decidual NK cells transfer granulysin to selectively kill bacteria in trophoblasts. *Cell*, 2020, Vol. 182, no. 5, pp. 1125-1139.e18.
8. D'Addio F., Riella L.V., Mfarrej B.G., Chabtini L., Adams L.T., Yeung M., Yagita H., Azuma M., Sayegh M.H., Guleria I. The link between the PDL1 costimulatory pathway and Th17 in fetomaternal tolerance. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 9, pp. 4530-4541.
9. Das M., Kale V. Extracellular vesicles: Mediators of embryo-maternal crosstalk during pregnancy and a new weapon to fight against infertility. *Eur. J. Cell Biol.*, 2020, Vol. 99, no. 8, 151125. doi: 10.1016/j.ejcb.2020.151125.
10. Delyea C., Bozorgmehr N., Koleva P., Dunsmore G., Shahbaz S., Huang V., Elahi S. CD71<sup>+</sup> erythroid suppressor cells promote fetomaternal tolerance through Arginase-2 and PDL-1. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, no. 12, pp. 4044-4058.
11. Djurisic S., Hviid T.V. HLA Class Ib molecules and immune cells in pregnancy and preeclampsia. *Front Immunol.*, 2014, Vol. 5, 652. doi: 10.3389/fimmu.2014.00652.
12. Dosiou C., Giudice L.C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr. Rev.*, 2005, Vol. 26, no. 1, pp. 44-62.
13. Douglas A.J. Mother-offspring dialogue in early pregnancy: impact of adverse environment on pregnancy maintenance and neurobiology. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry*, 2011, Vol. 35, no. 5, pp. 1167-1177.
14. Dumitru C.A., Moses K., Trellakis S., Lang S., Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 8, pp. 1155-1167.
15. Dunsmore G., Bozorgmehr N., Delyea C., Koleva P., Namdar A., Elahi S. Erythroid suppressor cells compromise neonatal immune response against bordetella pertussis. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199, no. 6, pp. 2081-2095.
16. Dunsmore G., Koleva P., Sutton R.T., Ambrosio L., Huang V., Elahi S. Mode of delivery by an ulcerative colitis mother in a case of twins: Immunological differences in cord blood and placenta. *World J. Gastroenterol.*, 2018, Vol. 24, no. 42, pp. 4787-4797.
17. Elahi S., Ertelt J.M., Kinder J.M., Jiang T.T., Zhang X., Xin L., Chaturvedi V., Strong B.S., Qualls J.E., Steinbrecher K.A., Kalfa T.A., Shaaban A.F., Way S.S. Immunosuppressive CD71<sup>+</sup> erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature*, 2013, Vol. 504, no. 7478, pp. 158-162.
18. Esteve-Solé A., Luo Y., Vlagea A., Deyà-Martínez Á., Yagüe J., Plaza-Martín A.M., Juan M., Alsina L. B regulatory cells: players in pregnancy and early life. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 7, 2099. doi: 10.3390/ijms19072099.
19. Ferreira L.M.R., Meissner T.B., Tilburgs T., Strominger J.L. HLA-G: At the interface of maternal-fetal tolerance. *Trends Immunol.*, 2017, Vol. 38, no. 4, pp. 272-286.
20. Fu B., Li X., Sun R., Tong X., Ling B., Tian Z., Wei H. Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2013, Vol. 110, no. 3, pp. E231-40.
21. Fu B., Tian Z., Wei H. TH17 cells in human recurrent pregnancy loss and pre-eclampsia. *Cell Mol Immunol.*, 2014, Vol. 11, no. 6, pp. 564-570.
22. Fu B., Wei H. Decidual natural killer cells and the immune microenvironment at the maternal-fetal interface. *Sci China Life Sci.*, 2016, Vol. 59, no. 12, pp. 1224-1231.
23. Fu B., Zhou Y., Ni X., Tong X., Xu X., Dong Z., Sun R., Tian Z., Wei H. Natural killer cells promote fetal development through the secretion of growth-promoting factors. *Immunity*, 2017, Vol. 47, no. 6, pp. 1100-1113.e6.

24. Fukui A., Funamizu A., Yokota M., Yamada K., Nakamura R., Fukuoka R., Kimura H., Mizunuma H. Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 90, no. 1, pp. 105-110.
25. Goldman-Wohl D.S., Ariel I., Greenfield C., Hochner-Celnikier D., Cross J., Fisher S., Yagel S. Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, Vol. 6, no. 1, pp. 88-95.
26. Gomez-Lopez N., Romero R., Hassan S.S., Bhatti G., Berry S.M., Kusanovic J.P., Pacora P., Tarca A.L. The cellular transcriptome in the maternal circulation during normal pregnancy: A longitudinal study. *Front Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2863. doi: 10.3389/fimmu.2019.02863.
27. Gomez-Lopez N., Romero R., Xu Y., Miller D., Unkel R., MacKenzie T.C., Frascoli M., Hassan S.S. Umbilical cord CD71<sup>+</sup> erythroid cells are reduced in neonates born to women in spontaneous preterm labor. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 76, no. 4, pp. 280-284.
28. Grzywa T.M., Nowis D., Golab J. The role of CD71<sup>+</sup> erythroid cells in the regulation of the immune response. *Pharmacol Ther.*, 2021, Vol. 228, 107927. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107927.
29. Guzman-Genuino R.M., Diener K.R. Regulatory B cells in pregnancy: lessons from autoimmunity, graft tolerance, and cancer. *Front Immunol.*, 2017, Vol. 8, 172. doi: 10.3389/fimmu.2017.00172.
30. Guzman-Genuino R.M., Hayball J.D., Diener K.R. Regulatory B cells: dark horse in pregnancy immunotherapy? *J. Mol. Biol.*, 2021, Vol. 433, no. 1, 166596. doi: 10.1016/j.jmb.2020.07.008.
31. Huang B., Faucette A.N., Pawlitz M.D., Pei B., Goyert J.W., Zhou J.Z., El-Hage N.G., Deng J., Lin J., Yao F., Dewar R.S. 3<sup>rd</sup>, Jassal J.S., Sandberg M.L., Dai J., Cols M., Shen C., Polin L.A., Nichols R.A., Jones T.B., Bluth M.H., Puder K.S., Gonik B., Nayak N.R., Puscheck E., Wei W.Z., Cerutti A., Colonna M., Chen K. Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labor. *Nat. Med.*, 2017, Vol. 23, no. 1, pp. 128-135.
32. Jørgensen N., Persson G., Hviid T.V.F. The tolerogenic function of regulatory T cells in pregnancy and cancer. *Front Immunol.*, 2019, Vol. 8, no. 10, 911. doi: 10.3389/fimmu.2019.00911.
33. Kang X., Zhang X., Liu Z., Xu H., Wang T., He L., Zhao A. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells maintain feto-maternal tolerance by inducing Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells by activation of the TGF- $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway. *Mol. Hum. Reprod.*, 2016, Vol. 22, no. 7, pp. 499-511.
34. Köstlin N., Kugel H., Spring B., Leiber A., Marmé A., Henes M., Rieber N., Hartl D., Poets C.F., Gille C. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 9, pp. 2582-2591.
35. Köstlin-Gille N., Gille C. Myeloid-derived suppressor cells in pregnancy and the neonatal period. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 584712. doi: 10.3389/fimmu.2020.584712.
36. Krop J., Heidt S., Claas F.H.J., Eikmans M. Regulatory T cells in pregnancy: it is not all about FoxP3. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1182. doi: 10.3389/fimmu.2020.01182.
37. La Rocca C., Carbone F., Longobardi S., Matarese G. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunol. Lett.*, 2014, Vol. 162, no. 1, Pt A, pp. 41-48.
38. LeBien T.W., Tedder T.F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 5, pp. 1570-1580.
39. Liu S., Diao L., Huang C., Li Y., Zeng Y., Kwak-Kim J.Y.H. The role of decidual immune cells on human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 124, pp. 44-53.
40. Masoumi Z., Maes G.E., Herten K., Cortés-Calabuig Á., Alattar A.G., Hanson E., Erlandsson L., Mezey E., Magnusson M., Vermeesch J.R., Familari M., Hansson S.R. Preeclampsia is associated with sex-specific transcriptional and proteomic changes in fetal erythroid cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 8, 2038. doi: 10.3390/ijms20082038.
41. Miller D., Romero R., Unkel R., Xu Y., Vadillo-Ortega F., Hassan S.S., Gomez-Lopez N. CD71<sup>+</sup> erythroid cells from neonates born to women with preterm labor regulate cytokine and cellular responses. *J. Leukoc. Biol.*, 2018, Vol. 103, no. 4, pp. 761-775.
42. Mjösberg J., Berg G., Jenmalm M.C., Ernerudh J. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biol. Reprod.*, 2010, Vol. 82, no. 4, pp. 698-705.
43. Mor G., Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 6, pp. 425-433.
44. Nair S., Salomon C. Extracellular vesicles and their immunomodulatory functions in pregnancy. *Semin. Immunopathol.*, 2018, Vol. 40, no. 5, pp. 425-437.
45. Norton M.T., Fortner K.A., Bizargity P., Bonney E.A. Pregnancy alters the proliferation and apoptosis of mouse splenic erythroid lineage cells and leukocytes. *Biol. Reprod.*, 2009, Vol. 81, no. 3, pp. 457-464.
46. Persson G., Jørgensen N., Nilsson L.L., Andersen L.H.J., Hviid T.V.F. A role for both HLA-F and HLA-G in reproduction and during pregnancy? *Hum. Immunol.*, 2020, Vol. 81, no. 4, pp. 127-133.
47. Robertson S.A., Care A.S., Moldenhauer L.M. Regulatory T cells in embryo implantation and the immune response to pregnancy. *J. Clin. Invest.*, 2018, Vol. 128, no. 10, pp. 4224-4235.
48. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 6, pp. 601-610.
49. Salvany-Celades M., van der Zwan A., Benner M., Setrajcic-Dragos V., Bougleux Gomes H.A., Iyer V., Norwitz E.R., Strominger J.L., Tilburgs T. Three types of functional regulatory T cells control T cell responses at the human maternal-fetal interface. *Cell Rep.*, 2019, Vol. 27, no. 9, pp. 2537-2547.e5.

50. Sato Y. Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2020, Vol. 503, 110699. doi: 10.1016/j.mce.2019.110699.
51. Seledtsov V.I., Seledtsova G.V., Samarin D.M., Taraban V.Y., Sennikov S.V., Kozlov V.A. Characterization of erythroid cell-derived natural suppressor activity. *Immunobiology*, 1998, Vol. 198, no. 4, pp. 361-374.
52. Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V., Silkov A.N., Kozlov V.A. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver. *Eur. Cytokine Netw.*, 2001, Vol. 12, no. 2, pp. 274-279.
53. Sennikov S.V., Krysov S.V., Silkov A.N., Injelevskaya T.V., Kozlov V.A. Production of IL-10, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta1 by different populations of erythroid cells derived from human embryonal liver. *Cytokine*, 2002, Vol. 17, no. 4, pp. 221-225.
54. Shigeta N., Kumasawa K., Tanaka A., Badger Wing J., Nakamura H., Sakaguchi S., Kimura T. Dynamics of effector and naïve Regulatory T cells throughout pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2020, Vol. 140, 103135. doi: 10.1016/j.jri.2020.103135.
55. Siegrist C.A. Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine*, 2001, Vol. 19, no. 25-26, pp. 3331-3346.
56. Slawek A., Lorek D., Kedzierska A.E., Chelmonska-Soyta A. Regulatory B cells with IL-35 and IL-10 expression in a normal and abortion-prone murine pregnancy model. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2020, Vol. 83, no. 3, e13217. doi: 10.1111/aji.13217.
57. Tao Y., Li Y.H., Piao H.L., Zhou W.J., Zhang D., Fu Q., Wang S.C., Li D.J., Du M.R. CD56(bright)CD25<sup>+</sup> NK cells are preferentially recruited to the maternal/fetal interface in early human pregnancy. *Cell. Mol. Immunol.*, 2015, Vol. 12, no. 1, pp. 77-86.
58. Trowsdale J., Betz A.G. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, no. 3, pp. 241-246.
59. Tsuda S., Nakashima A., Shima T., Saito S. New paradigm in the role of regulatory T cells during pregnancy. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 573. doi: 10.3389/fimmu.2019.00573.
60. Vacca P., Cantoni C., Vitale M., Prato C., Canegallo F., Fenoglio D., Ragni N., Moretta L., Mingari M.C. Crosstalk between decidual NK and CD14<sup>+</sup> myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 26, pp. 11918-11923. doi: 10.1073/pnas.1001749107.
61. Wang W., Sung N., Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J. T helper (Th) cell profiles in pregnancy and recurrent pregnancy losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh cells. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 2025. doi: 10.3389/fimmu.2020.02025.
62. Wang Y., Liu Y., Shu C., Wan J., Shan Y., Zhi X., Sun L., Yi H., Yang Y.G., He J. Inhibition of pregnancy-associated granulocytic myeloid-derived suppressor cell expansion and arginase-1 production in preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.*, 2018, Vol. 127, pp. 48-54.
63. Yang C., Song G., Lim W. Effects of extracellular vesicles on placentation and pregnancy disorders. *Reproduction*, 2019, Vol. 158, no. 5, pp. R189-R196.
64. Yang F., Zheng Q., Jin L. Dynamic function and composition changes of immune cells during normal and pathological pregnancy at the maternal-fetal interface. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2317. doi: 10.3389/fimmu.2019.02317.
65. Yie S.M., Taylor R.N., Librach C. Low plasma HLA-G protein concentrations in early gestation indicate the development of preeclampsia later in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2005, Vol. 193, no. 1, pp. 204-208.
66. Zhang J., Li H., Fan B., Xu W., Zhang X. Extracellular vesicles in normal pregnancy and pregnancy-related diseases. *J. Cell Mol. Med.*, 2020, Vol. 24, no. 8, pp. 4377-4388.

**Авторы:**

**Шевченко Ю.А.** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Назаров К.В.** – лаборант-исследователь, лаборатория молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Сенников С.В.** – д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Shevchenko Yu.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Nazarov K.V.**, Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Sennikov S.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

# СОВРЕМЕННЫЕ Т-КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИММУНОТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Кузнецова М.С.<sup>1</sup>, Шику Хироши<sup>1,2</sup>, Карапулов А.В.<sup>3</sup>,  
Сенников С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Высшая школа медицины Университета Миэ, Миэ, Япония

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»  
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Резюме.** Согласно принятой концепции иммуноредактирования, взаимодействие клеток злокачественной опухоли и иммунитета представляет собой сложный многофакторный процесс, результатом которого может быть как противоопухолевая эффекторная активность, так и развитие супрессорных механизмов, способствующих опухолевому росту. Накопление научных сведений в области изучения процессов противоопухолевого иммунного ответа и толерантности привело к появлению множества исследовательских и терапевтических подходов, использующих разные звенья иммунной системы для борьбы с неопластическими процессами. Особняком среди имеющихся подходов стоят стратегии, использующие потенциал основных эффекторов адаптивного иммунитета – антиген-специфичных Т-лимфоцитов – для борьбы со злокачественными новообразованиями, появившиеся более века назад и легшие в основу исследований в области иммунотерапии рака. Одним из свидетельств значительного потенциала противоопухолевой активности Т-клеток при использовании в иммунотерапевтических схемах лечения онкологических заболеваний стал успех в терапии гематологических онкологических заболеваний, достичь которого удалось в конце минувшего десятилетия. При этом, однако, терапия солидных злокачественных новообразований по сей день сталкивается с существенными сложностями, ограничивающими эффективность лечения. В этой связи основной задачей обзора является аккумулирование актуальных сведений относительно успехов и ограничений Т-клеточной иммунотерапии в отношении солидных опухолей.

На сегодняшний день фенотип и функционал Т-клеток исследуется и модулируется как в отношении усиления противоопухолевой цитотоксичности, повышения жизнеспособности и пролиферативной активности Т-клеток, так и в отношении преодоления супрессорного влияния опухоли и ее толерогенного окружения на Т-клетки, а также обеспечения направленной миграции эффекторных Т-лимфоцитов в ткани солидных опухолей. В настоящем обзоре рассматриваются иммунотерапевтические подходы, использующие потенциал эффекторных Т-лимфоцитов, существующие на сегодняшний день в виде клинических исследований или применяемых терапевтических схем лечения солидных злокачественных новообразований. Обсуждаются антиген-независимые подходы, направленные на неспецифическое усиление Т-клеточного ответа, такие как терапия рекомбинантными цитоки-

#### Адрес для переписки:

Сенников Сергей Витальевич  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 222-19-10.  
E-mail: sennikovsv@gmail.com

#### Address for correspondence:

Sergey V. Sennikov  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
14 Yadrintsevskaya St  
Novosibirsk  
630099 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 222-19-10.  
E-mail: sennikovsv@gmail.com

#### Образец цитирования:

М.С. Кузнецова, Хироши Шику, А.В. Карапулов,  
С.В. Сенников «Современные Т-клеточные технологии  
иммунотерапии солидных опухолей» // Медицинская  
иммунология, 2023. Т. 25, № 2. С. 271-286.  
doi: 10.15789/1563-0625-MTC-2444

© Кузнецова М.С. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

#### For citation:

M.S. Kuznetsova, Hiroshi Shiku, A.V. Karaulov,  
S.V. Sennikov “Modern T cell technologies for immunotherapy  
of solid tumors”, Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya  
Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 271-286.  
doi: 10.15789/1563-0625-MTC-2444

© Kuznetsova M.S. et al., 2023

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-MTC-2444

нами и ингибиование checkpoint-молекул, а также антиген-зависимые, или антиген-специфичные, подходы, такие как адоптивная Т-клеточная терапия эндогенными Т-лимфоцитами или Т-клетками с модифицированным антиген-распознающим рецептором (CAR-Т-клетки, TCR-Т-клетки), а также использование биспецифических антител в качестве Т-клеточных активаторов. В обзоре описаны преимущества и недостатки каждого из подходов в монотерапии и существующие на сегодняшний день результаты и перспективы их комбинирования друг с другом.

*Ключевые слова: иммунотерапия солидных опухолей, Т-лимфоциты, checkpoint-ингибиторы, адоптивная Т-клеточная терапия, CAR-Т-клетки, TCR-Т-клетки, BiTE-антитела, цитокинотерапия*

## MODERN T CELL TECHNOLOGIES FOR IMMUNOTHERAPY OF SOLID TUMORS

Kuznetsova M.S.<sup>a</sup>, Shiku Hiroshi<sup>a, b</sup>, Karaulov A.V.<sup>c</sup>, Sennikov S.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Mie University Graduate School of Medicine, Mie, Japan

<sup>c</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** According to the common concept of immune editing, the interaction of malignant tumor cells and immune system is a complex multifactorial process, which may result in both antitumor effector activity and development of suppressor mechanisms that promote tumor growth. Accumulation of scientific knowledge in the field of studying the antitumor immune response and tolerance has led to emergence of many research and therapeutic approaches that use different components of the immune system to combat neoplastic processes. Along with currently available approaches, there are strategies that use the potential of antigen-specific T lymphocytes, the main effectors of adaptive immunity, in order to fight malignant neoplasms which appeared more than a century ago and have built the scientific basis of cancer immunotherapy. One line of evidence of the significant antitumor potential of T cells in immunotherapeutic schemes for the cancer treatment was presented by successful therapy of hemato-oncological diseases, achieved at the end of the past decade. At the same time, however, the therapy of solid malignant neoplasms still faces significant difficulties that limit the efficiency of treatment. In this regard, the main objective of the review is to accumulate up-to-date information on the successes and limitations of T cell immunotherapy in the patients with solid tumors. To date, the phenotype and functionality of T cells is being investigated and modulated both towards enhancing antitumor cytotoxicity, increasing viability and proliferative activity of T cells, and in overcoming the immunosuppressive effect of the tumor and its tolerogenic microenvironment upon T cells, as well as ensuring targeted migration of the effector T cells to the malignant tissues. This review discusses immunotherapeutic approaches exploiting the potential of effector T lymphocytes, e.g., current clinical trials or applied therapeutic regimens for the treatment of solid malignant neoplasms. Antigen-independent approaches aimed at nonspecific enhancement of the T cell responses, i.e., therapy with recombinant cytokines and inhibition of immune checkpoint molecules. Antigen-dependent, or antigen-specific approaches such as adoptive T cell therapy with endogenous T lymphocytes are also discussed as well as trials on T cells with modified antigen-recognition receptor (CAR-T cells, TCR-T cells), like as usage of bispecific antibodies as T cell engagers. The review describes the benefits and disadvantages of these approaches in monotherapy, as well as current results and prospects for their mutual combinations.

*Keywords: solid tumors, immunotherapy, T cells, checkpoint inhibitors, adoptive T cell therapy, CAR-T cells, TCR-T cells, BiTE-antibodies, cytokine therapy*

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-65-00004, <https://rscf.ru/project/21-65-00004/>.

### Введение

Известно, что противоопухолевая активность Т-клеток несет в себе огромный потенциал для развития иммунотерапевтических схем лечения онкологических заболеваний. Стратегии, так или иначе использующие потенциал Т-лимфоцитов для целенаправленного распознавания и унич-

тожения опухолевых клеток, открыли новую эру лечения рака и привели к появлению большого разнообразия методов иммунотерапии злокачественных опухолей. CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) и CD4<sup>+</sup>Т-хелперы играют роль непосредственных исполнителей в ходе реализации противоопухолевого иммунного ответа, в связи с чем долгие годы самое пристальное внимание исследователей в данной области было направлено именно на эти популяции. При несомненной важности клеток, реализующих ци-

тотоксическую функцию в отношении опухолей, в научной литературе и клинической практике накопилось достаточно свидетельств того, что в реализации противоопухолевого иммунного ответа принимают активное участие все звенья иммунной системы [1]. Противоопухолевый ответ адаптивного звена иммунитета с Т-клетками в качестве основного медиатора индуцируется и усиливается различными типами клеток врожденной иммунной системы. Например, профессиональные антиген-презентирующие клетки (APC), такие как дендритные клетки, фагоцитируют опухолевые клетки и представляют процессырованные опухолевые антигены родственным наивным Т-клеткам, что впоследствии вызывает их активацию. Помимо традиционных эффекторных Т-лимфоцитов, другие типы лимфоидных клеток врожденного иммунитета, такие как NK-клетки или так называемые нетрадиционные Т-клетки, включающие в себя популяции NKT-лимфоцитов, инвариантные клетки, связанные со слизистой оболочкой (так называемые MALT-клетки) и  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты могут напрямую уничтожать раковые клетки в зависимости от молекулярного контекста [15, 37]. Одновременно с этим внутри иммунной системы в присутствии опухоли образуется целая инфраструктура, способствующая подавлению противоопухолевой цитотоксичности и препятствующая распознаванию опухоли. К числу иммуносупрессивных агентов иммунной системы относятся регуляторные Т-лимфоциты, опухоль-ассоциированные макрофаги и миелоидные супрессорные клетки, а также растворимые ингибирующие молекулы и цитокины, выделяемые опухолью и ее микроокружением. Кроме того, в иммунной системе при опухолевом росте имеют место дефектные процессинг и презентация антигена Т-лимфоцитам, происходит истощение Т-клеток [100]. Помимо перечисленного, центральные механизмы толерантности вызывают уничтожение противоопухолевых Т-клеток с высокой аффинностью к опухолевым антигенам, поскольку последние зачастую представляют собой собственные молекулы организма, присутствующие на клетках нормальных тканей. Понимание комплексности вопроса реализации противоопухолевого иммунного ответа и исследование данного процесса с разных сторон способствовало развитию целого ряда иммунотерапевтических подходов, направленных на различные звенья и стадии иммунного ответа. В настоящем обзоре наиболее пристальное внимание отведено технологиям, использующим потенциал традиционных эффекторных  $\alpha\beta$ Т-клеток, при этом учитывается контекст, создаваемый остальными звеньями иммунной системы, участвующими в сложной системе иммуноредактирования.

Ряд технологий последних лет, о которых далее пойдет речь, в частности, CAR-T-клеточные

технологии, достигли впечатляющих результатов в лечении гематологических онкологических заболеваний [68], тогда как терапия злокачественных карцином, сарком и других новообразований, гистологически представляющих собой плотную клеточную массу, не содержащую жидких участков, все еще сталкивается с существенными сложностями, ограничивающими эффективность лечения. В этой связи основной задачей обзора является аккумулирование актуальных сведений относительно успехов и ограничений Т-клеточной иммунотерапии именно в отношении солидных опухолей.

Существующие технологии иммунотерапии солидных опухолей, использующие потенциал Т-клеток, можно условно разделить на две когорты – технологии, направленные на неспецифическое усиление противоопухолевого Т-клеточного ответа (путем опосредованного усиления противоопухолевой эффекторной функции или подавления супрессорного иммунного ответа – антиген-независимые подходы), и технологии антиген-специфичного уничтожения опухоли, в основном непосредственно использующие Т-клетки в качестве основного противоопухолевого клеточного продукта (табл. 1). При этом в случае антиген-специфичных подходов Т-лимфоциты могут быть как конвенциональными аутологичными клетками, активированными *ex vivo*, так и клетками, подвергшимися генной модификации антиген-специфичных рецепторов. На рисунке 1 (см. 2-ю стр. обложки) изображены Т-клеточные подходы, каждый из которых далее будет обсужден подробнее. Подходы представлены с акцентом на особенности фенотипа и функционала эффекторных Т-лимфоцитов, используемые или усиливаемые в том или ином подходе к Т-клеточной иммунотерапии опухолей.

Технологии первой когорты направлены на неспецифическую (антиген-независимую) стимуляцию широкого спектра эндогенных Т-клеток, включая те, которые способны распознавать опухоль, но становятся неэффективными из-за множества механизмов иммунного ускользания.

## 1. Антиген-независимые технологии

### 1.1. Цитокинотерапия

Первый тип неспецифической иммунотерапии – терапия опухолей рекомбинантными цитокинами, стимулирующими эндогенный Т-клеточный иммунный ответ. Цитокиновая терапия является одним из первых подходов к иммунотерапии злокачественных новообразований, и в свое время стала одним из первых доказательств того, что манипуляции с иммунной системой человека могут воспроизведимо приводить к устойчивой регрессии опухолей [87]. Одним из самых ранних исследованных протоколов цитокинотерапии стало введение рекомбинантного интерлейкина-2 (IL-2) пациентам с солид-

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОТЕРАПЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕ ПОТЕНЦИАЛ Т-КЛЕТОК

TABLE 1. IMMUNOTHERAPY TECHNOLOGIES USING THE POTENTIAL OF T CELLS

Антиген-неспецифичные (неспецифическое усиление Т-клеточного ответа) Antigen-nonspecific (nonspecific enhancement of the T cell response)		Антиген-специфичные Antigen-specific			
Цитокинотерапия Cytokine therapy	Checkpoint ингибиторы Checkpoint inhibitors	BiTE-антитела BiTE antibodies	Эндогенные Т-клетки: TIL, CTL Endogenous T cells: TIL, CTL	CAR-T	TCR-T

ными опухолями различных локализаций [19, 82, 86]. IL-2 продуцируется преимущественно активированными CD4<sup>+</sup>Т-клетками и выполняет в определенном смысле противоречивую функцию в контексте реакций взаимодействия иммунной системы и опухоли: способствует активации и пролиферации как эффекторных противоопухолевых CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, так и регуляторных Т-клеток, способствующих иммуносупрессии [14], что, однако, не помешало клиницистам и исследователям еще в конце XX века добиться длительной устойчивой ремиссии у пациентов с метастатической меланомой и раком почки путем высокодозной терапии рекомбинантным IL-2 [86].

Помимо IL-2, IL-7 и IL-15 также играют ключевую роль в запуске пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов. Данные цитокины также были исследованы на способность усиливать противоопухолевый иммунный ответ *in vivo* и остаются частью некоторых фундаментальных и клинических исследований терапии солидных опухолей до сих пор [22, 103]. К настоящему моменту завершены первоначальные клинические испытания монотерапии IL-15 и начаты испытания комбинации цитокина с противоопухолевыми антителами или ингибиторами контрольных точек, о которых также пойдет речь далее. Однако цитокины в монотерапии на сегодняшний день не показывают высоких уровней эффективности, наблюдаемых в доклинических экспериментах. Более того, цитокинотерапия часто сопряжена с серьезными уровнями токсичности, что приводит к вынужденному снижению используемых дозировок [13, 22].

Чтобы повысить эффективность и снизить токсичность цитокинотерапии, разрабатываются альтернативные модифицированные структуры цитокинов [62, 94], гибридных белков антител и цитокинов [43, 47] а также исследуются комбинации с чекпойнт-ингибиторами и противоопухолевыми моноклональными антителами для повышения антителозависимой клеточной цитотоксичности и поддержания эффективности противоопухолевого клеточного ответа [9]. К примеру, NKTR-214, или бемпегалдеслейкин – агонист бета-субъединицы рецептора интерлейкина 2 (IL-2R $\beta$ ), представляет собой предшественник

рекомбинантного IL-2, конъюгированный с шестью высвобождаемыми цепями полиэтиленгликоля [9, 90]. Конъюгирование IL-2 с цепями полиэтиленгликоля продлевает период полужизни цитокина и снижает его способность к связыванию с рецептором IL-2R $\alpha$ , тем самым снижая его сродство к Т-регуляторным клеткам [75]. В нескольких исследованиях фазы I/II и III NKTR-214 тестируют как в качестве монотерапии, так и в сочетании с чекпойнт-ингибиторами (NCT03635983, NCT03138889, NCT02869295, NCT02983045).

Отдельно среди подходов, использующих цитокины для усиления Т-клеточного иммунного ответа, следует упомянуть исследования, направленные на исследование роли хемокинов и рецепторов к ним для повышения инфильтрирующей способности эффекторных Т-лимфоцитов. Хемокины играют двойственную роль во взаимодействии клеток иммунной системы и опухоли. Про-опухолевый характер действия хемокинов заключается в том, что большинство солидных опухолей способно формировать локальные хемокиновые сети, способствуя своему росту, ре-крутигу стромальных клеток, таких как опухоль-ассоциированные макрофаги, миелоидные супрессоры и Т-регуляторные клетки [65]. При этом, тем не менее, ряд хемокинов отвечает за миграцию эффекторных Т-клеток в опухоль, что способствует реализации противоопухолевого ответа [23]. В частности, было показано, что экспрессия CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 и CXCL10 коррелирует с присутствием опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов в опухоли при меланоме [41], а индуцируемые интерфероном IFN $\gamma$  хемокины CXCL9, CXCL10 и CXCL11 связаны с активацией Th1-иммунитета в опухолевом микроокружении и благоприятным ответом на химиотерапию и иммунотерапию при меланоме [41, 69]. Более того, экспрессия рецепторов CCR5 и CXCR3 на опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитах оказалась необходимой для их инфильтрации в опухолевое ложе [39, 69], в то время как экспрессия их лигандов коррелировала с ответом на адаптивную Т-клеточную терапию у пациентов с меланомой [11].

## 1.2. Чекпойнт-ингибиторы

Второй неспецифический тип опосредующей Т-клеточный ответ иммунотерапии – это блокада передачи ингибиторных сигналов Т-лимфоцитам с помощью ингибиторов иммунных контрольных точек (Immune Checkpoint inhibitors, ICI). К иммунным контрольным точкам (в русскоязычной литературе также – молекулы контроля иммунитета, чекпойнт-молекулы) относят рецепторы на поверхности Т-клеток, запускающие активирование или супрессию иммунной реакции в случае своей активации. К супрессионным чекпойнт-молекулам, на блокирование которых и направлена терапия с использованием ICI, относятся такие молекулы, как PD-1 и CTLA-4, а также их лиганды – PD-L1, PD-L2 и множество других. Лиганды к чекпойнт-рецепторам экспрессируются на поверхности антиген-презентирующих клеток, но также показана их экспрессия на клетках нелимфоидных тканей, а также на клетках опухолей различных нозологий. Так, экспрессия чекпойнт-лигандов PD-L1, VISTA, B7-H3, HHLA2 наблюдается на клетках множества злокачественных карцином и меланом, лиганд PD-L2 обнаружен на клетках рака шейки матки [4].

Наибольшее клиническое развитие на сегодняшний день получили подходы, использующие блокирующие антитела к CTLA-4 (ипилимумаб) и PD-1 (ниволумаб, пембролизумаб), которые экспрессируются на поверхности Т-клеток, или лиганда PD-1 (PD-L1), который экспрессируется на поверхности опухолевых клеток или антиген-презентирующих клеток (атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб) [5, 105].

За последние несколько лет ICI получили одобрение FDA для терапии таких солидных опухолей, как немелкоклеточный рак легкого, рак почки, уротелиальная карцинома, меланома, а также опухоли с высокой микросателлитной нестабильностью, гепатоцеллюлярная карцинома, аденокарцинома гастроэзофагеального перехода и аденокарцинома желудка, клеточная карцинома Меркеля, плоскоклеточная карцинома головы и шеи и др. [24]. Частота ответа на терапию колеблется от 15% до 30% (для большинства перечисленных солидных опухолей) до 45-60% (для меланомы и опухолей с высокой микросателлитной нестабильностью) [24, 66].

Несмотря на значительный вклад открытия чекпойнт-молекул в развитие технологий иммунотерапии рака, у большинства пациентов с метастатическим карциномами, на долю которых приходится 90% ассоциированных с онкологией смертей, по-прежнему не наблюдается выраженной регрессии опухоли после терапии чекпойнт-ингибиторами.

## 2. Антиген-специфичные технологии иммунотерапии опухолей

Антиген-специфичные технологии иммунотерапии онкологических заболеваний берут начало

с момента открытия первого опухолевого антигена человека [99]. Наиболее ранним и методологически простым примером антиген-специфичной иммунотерапии являются так называемые противоопухолевые вакцины, которые предполагают введение определенных белков, пептидов или нуклеиновых кислот, их кодирующих, пациентам в попытке усилить или вызвать активацию эндогенных противоопухолевых Т-лимфоцитов [44]. Благодаря простоте введения и относительно низкой токсичности противоопухолевые вакцины до сих пор распространены в клинической практике. При этом, однако, устойчивый клинический эффект подобных вакцин показан в очень ограниченном ряду исследований и только для некоторых видов рака, что может быть связано как с неспособностью генерировать большие количества Т-клеток с высоким сродством к опухолевым антигенам, так и с трудностью преодоления иммуносупрессивного влияния микропокружения опухоли [54, 59, 85].

Наиболее распространенную разновидность антиген-специфической иммунотерапии представляет собой адаптивная Т-клеточная терапия (Adaptive T cell transfer, ACT), предполагающая следующие основные этапы: забор собственных Т-лимфоцитов пациента, активация и наработка их количества *in vitro*, обратное введение аутологичных Т-клеток пациенту. Подходы ACT различаются по типу эффекторных клеток, использующихся в качестве основных агентов: в отношении фенотипа это могут быть CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-клетки [46], с точки зрения локализации и наличия / отсутствия генной модификации – эндогенные опухоль-инфилtrирующие Т-лимфоциты [84] или циркулирующие Т-клетки периферической крови [18], генно-модифицированные TCR-Т-клетки или CAR-Т-клетки, специфичные к определенному опухолевому антигену [17].

К преимуществам ACT относится способность преодолевать супрессорное воздействие микропокружения опухоли на Т-клетки путем переноса очень больших количеств (до 10<sup>11</sup>) клеток, проявляющих противоопухолевую активность. Вне зависимости от выбора клеточного агента, подходы адаптивной Т-клеточной терапии как правило предполагают предварительное лечение пациента лимфодеплелирующей химиотерапией, а также внутривенное введение IL-2 для стимуляции их выживания и пролиферации. Предварительное лечение лимфодеплелирующей химиотерапией может предотвратить развитие механизмов супрессии Т-клеток, опосредованных Т-регуляторными клетками или миелоидными супрессорами.

Адаптивная Т-клеточная терапия требует индивидуальной подготовки Т-клеток каждого конкретного пациента к инфузии, что, несомненно, снижает ее доступность в сравнении с множе-

ством более универсальных иммунотерапевтических подходов, проведение адаптивной терапии возможно только в специализированных лечебных центрах. Однако, несмотря на всю техническую сложность и индивидуализированность данного вида терапии, существует множество примеров, демонстрирующих потенциал этого подхода в иммунотерапии солидных опухолей.

К антиген-специфичным подходам также можно отнести технологии, использующие синтетические моноклональные антитела, имеющие две специфичности – к выбранному опухолевому антигену и к молекуле aCD3, что позволяет связываться с опухолевыми мишениями и активировать Т-лимфоциты.

### 2.1. Биспецифические антитела

Работы, описывающие конструирование рекомбинантных моноклональных антител с двойной специфичностью и их применение в контексте лечения онкозаболеваний появились в конце 80-х годов прошлого века и ведутся до сих пор, привлекая все больший интерес исследователей [2, 36, 38]. Биспецифические антитела, использование которых можно отнести к Т-клеточно-опосредованной иммунотерапии рака, получили в международной литературе название Bispecific T cell Engagers – биспецифические активаторы Т-клеточного ответа или BiTE-антитела [38]. Они направляют цитотоксическую активность Т-клеток против клеток опухоли, имея два антигена связывающих центра различной специфичности – к рецептору CD3 (активирует Т-клетки) и к одному из известных опухолевых антигенов (связывается с опухолевой клеткой через выбранный антиген в зависимости от типа опухоли – CD19, HER2 / neu, EpCAM, BCMA, CEA). В результате связывания обоих центров BiTE-антитела со своими мишениями одновременно происходит активация цитотоксических Т-лимфоцитов и их сближение с опухолевой клеткой, что в совокупности приводит к уничтожению опухолевой клетки в результате образования логического иммунного синапса между Т-клеткой и клеткой опухоли [38, 74]. Современные BiTE-антитела представляют собой очень гибкие структуры, полностью лишенные константных областей родительских антител, в связи с чем имеют сравнительно небольшой размер (порядка 55 кДа), что обеспечивает одновременное взаимодействие и образование цитолитического синапса [38]. Есть свидетельства того, что BiTE-антитела опосредуют гибель клеток-мишенией преимущественно не через наивные, а через антиген-активированные Т-клетки, которые после связывания с BiTE-антителами дифференцируются в эффекторные Т (Tem)-клетки памяти [8, 38].

Основной пласт исследований, показавших клиническую эффективность применения BiTE-антител, связан с гематологическими злокаче-

ственными заболеваниями [55], тогда как монотерапия солидных опухолей BiTE-антителами на сегодняшний день остается недостаточно эффективным подходом ввиду ограничений в проникновении BiTE-антител в ткани опухоли и поражением нормальных тканей организма, экспрессирующих опухоль-ассоциированные антигены, что приводит к дозозависимой токсичности. Однако, большим потенциалом могут обладать виды комбинированной терапии BiTE-антителами вместе с другими противоопухолевыми агентами, например, онколитическими вирусами [30, 88, 89].

### 2.2. Адаптивная терапия конвенциональными Т-клетками

Традиционным агентом для адаптивной Т-клеточной терапии являются эндогенные конвенциональные аутологичные Т-лимфоциты. Множество вариаций ACT, основанных на активации противоопухолевой активности аутологичных Т-клеток без генной модификации, показало клиническую эффективность для лечения ряда солидных опухолей [12, 67]. Среди подходов, использующих конвенциональные Т-лимфоциты, преимущество при выборе основного клеточного агента долгое время оставалось за CD8<sup>+</sup>Т-клетками, или цитотоксическими Т-лимфоцитами [26]. Известно, что CTL способны эффективно распознавать и разрушать злокачественные клетки при правильной активации антиген-презентирующими клетками (APC), представляющими антигенные пептиды в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC) I класса. При этом, однако, многие годы обсуждается эффективность использования CD4<sup>+</sup>Т-хелперных клеток для ACT, как в качестве самостоятельных популяций [17], так и совместно с CD8<sup>+</sup>Т-клетками [26, 28]. Кроме того, известно, что с лучшими показателями выживаемости онкологических больных коррелирует частота содержания как CTL, так и Т-хелперов [26, 93].

Ключевым клеточным агентом для адаптивной терапии конвенциональными Т-клетками являются опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL). Основным преимуществом Т-клеток, инфильтрирующих ткани опухоли, по сравнению с циркулирующими Т-клетками крови, считается тот факт, что TIL, как правило, обладают наиболее релевантным репертуаром специфичностей к опухолевым антигенам, экспрессирующимся в клетках растущей опухоли, и более высокой специфической иммунологической реaktivностью против опухолевых клеток [64]. Находясь в микроокружении опухоли, TIL часто обладают фенотипом истощения из-за хронической антигенной стимуляции, в связи с чем для использования противоопухолевого потенциала данных клеток были разработаны методы их повторной

активации. Впервые такой подход был предложен в 1988 году в хирургическом отделении Национального института онкологии США, где аутологичные опухоль-инфилтратирующие лимфоциты были выделены из резецированных фрагментов опухоли, культивированы в течение нескольких недель для наработки их количества и затем повторно введены в комбинации с IL-2 пациентам с метастатической меланомой после предварительной обработки циклофосфамидом. Регрессия опухоли наблюдалась в 40-60% случаев и длилась от 2 до 13 месяцев и более [83].

TIL могут быть локализованы в плотных скоплениях (гнездах) опухолевых клеток (интрамуральные, в центральной опухолевой строме (стромальные лимфоциты) и вдоль краев инфильтрации, вне границ опухолевого узла (перитуморальные лимфоциты) [3, 7]. Высокий потенциал использования адаптивной терапии TIL иллюстрирует работа 2015 года, в которой демонстрируется существенная регрессия метастатической меланомы в ответ на адаптивный перенос TIL более чем у 72% пациентов в клинических испытаниях фазы II, при почти полном отсутствии побочных эффектов для большинства пациентов [35]. Необходимо отметить, однако, что клиническая эффективность адаптивной терапии TIL в основном имеет место в лечении меланомы, и на данный момент менее выражена для солидных опухолей других локализаций [95]. Подход, использующий TIL, ограничен несколькими факторами: необходимо наличие иммуногенной опухоли, которая поддается резекции хирургическим путем, пациент должен быть в состоянии перенести процедуры лимфодеплекции и затем выдержать временную задержку, связанную с длительностью приготовления клеточного препарата TIL. Кроме того, противоопухолевые Т-клетки, полученные из инфильтрата опухоли, как и эндогенные Т-лимфоциты периферической крови, часто имеют невысокое сродство к опухолевым антигенам из-за негативной селекции в тимусе, происходящих в ходе естественных процессов созревания Т-клеток, в результате которой Т-клетки с более высокой аффинностью к аутоантигенам подвергаются уничтожению [73].

### 2.3. Т-клетки с генной модификацией рецептора для адаптивного переноса

Использование усовершенствованных или измененных вариантов Т-клеточного рецептора, несомненно, привлекает больший интерес исследователей ввиду существенного расширения возможностей потенциальной терапии на основе Т-клеток, прошедших генную модификацию. Получение так называемых TCR-T-клеток представляет собой ретровирусный перенос генов Т-клеточных рецепторов, полученных из клонов CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов с необходимой антигенной специфичностью, в Т-лимфоциты любых других специфичностей,

что дает возможность генерировать большое количество Т-клеток, имеющих идентичный TCR. Такие перенесенные в клетку генно-инженерным путем Т-клеточные рецепторы распознают опухоль-ассоциированные антигены по естественному биологическому пути, т. е. через активацию альфа- и бета- цепей CD3, с необходимостью презентации антигена молекулами МНС. Следовательно, могут распознаваться как поверхностные, так и внутриклеточные антигены, что позволяет использовать широкий спектр мишней [81]. В качестве одного из наиболее перспективных подходов данного ряда на сегодняшний день выделяют новый тип TCR-технологий, позволяющих получать Т-клетки, специфичные к выбранным опухоль-ассоциированным антигенам и даже персонализированным неоантigenам, представленным в комплексе молекулами МНС I типа. В основе метода лежит определение клонов аутологичных Т-клеток пациентов, экспрессирующих высокоаффинные TCR к интересующим антигенам и неоантigenам, выделение и клонирование таких TCR и последующее введение их в аутологичные Т-клетки [34, 53].

CAR-T-технологии подразумевают синтез химерного антигенного рецептора (Chimeric antigen receptor, CAR) и введение его эндогенным Т-клеткам. Химерная структура рецептора CAR-T-клеток содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) в качестве антиген-связывающего внеклеточного домена с шарнирной областью, трансмембранным доменом и внутриклеточной цепью CD3, ответственной за активацию Т-клеток. Поскольку распознавание антигена основано на scFv-фрагменте, как и в случае BiTE-антител, происходит связывание с интактными поверхностными антигенами, без необходимости в участии молекул МНС. К настоящему моменту существует несколько поколений CAR. CAR первого поколения характеризуются наличием только сигнального домена CD3, в то время как CAR второго и третьего поколений имеют костимуляторные домены, встроенные в цитоплазматическую область CAR, такие как 4-1BB (CD137), CD28, CD27, OX40 (CD134), ICOS (CD278), RIAD [1, 66]. При этом выбор костимуляторных доменов может определять эффективность всей CAR-T-терапии, так в 2010 году было показано, что использование GITRL – молекулы из надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли – вместо широко применяемых сигнальных доменов CD28 и/или 4-1BB приводило к отмене прямого/косвенного подавления иммунитета, опосредованного Т-регуляторными клетками. Ряд исследований подтвердил более выраженную противоопухолевую активность, большую устойчивость к Treg с более длительной персистенцией *in vivo* благодаря анти-апоптотической активности GITR-домена сконструированного химерного рецептора, по сравнению с CD28 и/или

4-1BB-экспрессирующими CAR-T-клетками [49, 70, 72]. Последние поколения химерных антигенных рецепторов включают не только активационные домены и костимулирующие молекулы, но также могут содержать домены экспрессии цитокинов [25, 31, 81]. Таким образом, активация CAR-T-клеток, как и CD3 BiTE-антител, зависит от распознавания антигена, опосредованного участком связывания антител, тогда как TCR-клетки требуют МНС-презентации опухолевого антигена для активации.

Обратной стороной МНС-независимого распознавания антигенов CAR-T-клетками является сложность поиска поверхностных опухолевых антигенов, которые имели бы широкую экспрессию на клетках солидных опухолей и отсутствие таковой на здоровых клетках организма, вне опухоли. Весьма удачным примером поверхностных молекул, служащих антигенами-мишениями для CAR-T-клеток в контексте солидных опухолей, являются антигены сосудистой сети опухоли, участвующие в процессах ангиогенеза – рецепторы фактора роста сосудов VEGFR2 [29, 33, 57, 58] и VEGFR1 [104], интегрины, ассоциированные с нео-эндотелием [32], опухоль-специфичный сплайс-вариант фибронектина, содержащий экстра-домен В [102]. Данные антигенные молекулы, экспрессируемые эндотелиальными клетками аномальной сосудистой сети опухоли, представляют клинический интерес для терапии CAR-T-клетками из-за геномной стабильности и относительной доступности для циркулирующих Т-клеток, а также их экспрессии в различных типах солидных опухолей [29, 32, 33, 57, 58, 104]. Помимо прочего, использование подобных мишней для CAR-T-клеточной терапии позволяет направить миграцию адаптивно перенесенных эффекторов вглубь опухоли через неопластические кровеносные сосуды.

Генно-инженерные методы для адаптивной Т-клеточной терапии, такие как CAR- или TCR-T-клеточные технологии, имеют сходства и различия в механизмах действия, профилях токсичности и путях резистентности. Было продемонстрировано, что CAR-T-клетки, специфичные к поверхностно экспрессируемым опухоль-ассоциированным антигенам, также экспрессирующие эндогенный TCR, специфичный к сильному иммуногену (CAR-T-клетки с двойной специфичностью), проявляют устойчивую экспансию и противоопухолевую активность против опухоли, экспрессирующей соответствующий ОАА, после вакцинации иммуногеном [92, 97, 107]. Однако использование Т-клеток с двойной специфичностью запускает сложные процессы и механизмы в клетках, а кроме того, посттрансферная вакцинация вряд ли применима для существующих CAR-T-клеток из-за их неспособности распознавать пептидный антиген в контексте МНС. В этом отношении подход на основе

TCR является более подходящим, поскольку он нацелен на антигенные пептиды в комплексе с молекулами МНС, перекрестно презентируемые антиген-презентирующими клетками; таким образом, адаптивная клеточная терапия, основанная на Т-клетках, созданных с помощью TCR, может быть усиlena вакцинацией. Однако дальнейшее развитие этого подхода также сопряжено с трудностью получения TCR-T-клеток и присущей им низкой аффинности TCR к комплексу пептид/МНС [16, 61, 80]. Чтобы обойти данные ограничения TCR-T-клеточных технологий и при этом избежать невозможности распознавания эндогенно-процессированных антигенов, свойственной традиционным CAR-T-клеткам, были разработаны так называемые TCR-подобные химерные антигенные рецепторы (TCR-like CAR) – рецепторы, состоящие из scFv, который распознает комплекс пептид/МНС [77]. Продемонстрировано, что с использованием библиотеки фагового дисплея, моноклональные антитела к комплексу пептид/МНС могут быть полностью выделены *in vitro* с эффективностью, превышающей эффективность выделения TCR [50]. Таким образом, отличием технологии TCR-подобных CAR-T-клеток от обычных TCR-T-клеточных подходов является то, в качестве специфического антиген-распознающего рецептора используется химерный антигенный рецептор на основе человеческого антитела, специфичного к комплексу пептид/МНС. В целом CAR-рецепторы демонстрируют в несколько раз более высокую аффинность по сравнению с TCR [101], обладая при этом сходной специфичностью и безопасностью. Также, TCR-подобные CAR-T-клетки могут быть искусственно активированы и усилены для улучшения и контроля их функции и устойчивости. В то время как TCR может быть искусственно активирован и усилен в значительно меньшей степени.

В 2018 году была опубликована работа, в которой с помощью фагового дисплея были получены TCR-подобные scFv-CAR-T-клетки, специфичные к комплексу HLA-A\*2402 / WT1(235-243) [6]. В работе была продемонстрирована цитотоксическая активность полученных scFv-CAR-T-клеток против HLA<sup>A\*2402<sup>+</sup></sup> WT1<sup>+</sup> опухолевых линий и возможность увеличения эффективности полученных scFv-CAR-T-клеток с помощью вакцинации дендритными клетками, нагруженными эпитопом WT1 (235-243). Таким образом, полученные TCR-подобные CAR-T-клетки обладали заявленными преимуществами, сочетающими достоинства как TCR, так и CAR.

Успех применения CAR-T-клеток в терапии лейкозов дал основание предполагать, что CAR-T подход может быть оптимизирован и для лечения солидных опухолей эпителиального происхождения. Однако применение терапии CAR-T-клетками ограничено низкой доступно-

стью опухолевых антигенов, специфичных для опухоли, но отсутствующих в здоровых клетках организма, слабым инфильтративным потенциалом CAR-T-клеток, препятствующим попаданию в плотную опухолевую массу, а также иммуносупрессией Т-клеток, развивающейся при попадании под влияние микроокружения опухоли. Помимо прочего, как CAR-T-, так и TCR-T-терапия часто сопряжены с тяжелыми нежелательными эффектами. Хорошо известно, что CAR-T-терапия часто приводит к развитию цитокинового шторма, выраженной нейротоксичности, проявляющейся в таких симптомах как бред, афазия, отек мозга, внутричерепные кровоизлияния, а также может сопровождаться нарушениями дыхания, гипербилирубинемией, и рядом других явлений [52]. TCR-T-клеточная терапия в данном контексте в лучшую сторону отличается от CAR-T-клеточных подходов, однако существующие клинические исследования заявляют о наличии в ряде случаев таких нежелательных явлений как воспалительный колит [76], случаи нейротоксичности [71] и кардиоваскулярной токсичности [63], респираторный дистресс-синдром [21].

### 3. Комбинированная иммунотерапия солидных опухолей

Ограниченнная эффективность перечисленных Т-клеточных иммунотерапевтических подходов в отношении солидных опухолей в купе с пониманием комплексности процессов иммунологического редактирования опухолевого роста привела к появлению схем, комбинирующих описанные подходы между собой. На рисунке 2 (см. 2-ю стр. обложки) представлены примеры апробированных на сегодняшний день комбинаций иммунотерапевтических подходов, опосредующих Т-клеточный иммунный ответ.

Одной из стратегий преодоления иммуносупрессии и создания более надежного противоопухолевого иммунного ответа стало объединение технологии CAR-T-клеток, специфичных к антигенам солидных опухолей, и моноклональных антител, ингибирующих чекпойнт-молекулы (например, анти-PD1, анти-PD-L1, анти-TIM-3, анти-LAG-3 антитела) [40].

Еще один комбинированный подход – введение цитокинов для «поляризации» клеток опухоли и его микроокружения в сторону более благоприятных для Т-клеток условий, как и для непосредственного улучшения функциональности и фенотипа CAR-T-клеток, было протестировано в доклинических и клинических испытаниях. Например, местное введение IL-12, вызывающего рекрутирование провоспалительных иммунокомпетентных клеток, увеличивало противоопухолевую активность адаптивно перенесенных анти-VEGFR-2 CAR-T-клеток и приводило к увеличению выживаемости мышей с пятью различными типами подкожных опухолей [20]. В упо-

мянтом исследовании комбинированное лечение IL-12 и VEGFR2 CAR-T-клетками уменьшало содержание VEGFR2-позитивных инфильтрирующих опухоль миелоидных супрессорных клеток, при этом подобный эффект не достигался при использовании каждого из подходов по отдельности. Именно на фоне успеха комбинирования цитокинотерапии с применением CAR-технологий были разработаны CAR-T-клетки четвертого поколения, упомянутые ранее, – CAR-T-клетки, конститутивно секрецирующие цитокины, получившие в литературе название «бронированных» CAR-T-клеток (“armored” CAR-T cells) [108].

Как было упомянуто ранее, одним из значительных препятствий, ограничивающих эффективность адаптивной Т-клеточной терапии при лечении солидных опухолей, является ограничение инфильтрации адаптивно перенесенных Т-клеток в опухоль из-за патологически развитой сосудистой сети опухоли и иммуносупрессивного микроокружения. Чтобы наделить Т-клетки способностью более эффективно мигрировать внутрь опухоли, в настоящее время на мышиных моделях активно тестируется регулирование различных хемокиновых систем, дополняющее адаптивную Т-клеточную терапию, включая повышение экспрессии CCR4 [20], CXCR2 [51, 78], CX3CR1 [91] и CXCR6 [60] посредством трансдукции эффекторных Т-лимфоцитов генетическими конструкциями, кодирующими соответствующие рецепторы. Однако для определения эффективности манипуляций с хемокиновой системой в отношении повышения эффективности адаптивной терапии у онкологических больных необходим переход на уровень клинических исследований.

Ряд других стратегий для усиления эффективности применения CAR-T-клеток и нивелирования воздействия микроокружения опухоли включает ингибирование иммуносупрессивных растворимых факторов, таких как аденоизин, IDO1 и VEGF, а также защиту от супрессорного влияния неопухолевых клеток, инфильтрирующих опухоль, таких как миелоидные супрессорные клетки, опухоль-ассоциированные макрофаги и клетки стромы [66]. В исследовании с использованием HER2-специфичных CAR-T-клеток на модели синтетической опухоли блокада аденоизинового рецептора A2A значительно улучшила эффективность противоопухолевого действия CAR-T-клеток за счет усиления активации и продукции цитокинов, при этом дополнительно использовалась блокада PD-1, что также дополнительно усиливало Т-клеточный иммунный ответ [10]. Другое исследование продемонстрировало значительное замедление роста опухоли на модели ксенотрансплантата опухоли толстой кишки путем сочетания блокады IDO1 с переносом EGFRvIII-специфичных CAR-T-клеток [45].

В 2020 году в *Science* было опубликовано исследование, продемонстрировавшее новый многообещающий подход комбинированной иммунотерапии, продемонстрировав, что вакцина, состоящая из наночастиц РНК, разработанная для доставки антигена CAR в лимфоидные компартменты по всему организму, стимулирует адаптивно перенесенные CAR-T-клетки. Попадание РНК в резидентные антиген-презентирующие клетки приводила к естественному процессингу и презентации целевого антигена-мишени и способствовала селективной экспансии CAR-T-клеток. В рамках работы Katharina Reinhard и соавт. показали улучшенное приживление CAR-T-клеток и регрессию опухолей больших размеров на моделях трудно поддающихся лечению мышей при субтерапевтических дозах CAR-T-клеток [79].

Еще одна иммунотерапевтическая комбинация, показавшая многообещающие результаты при отсутствии таковых в монотерапии, основана на использовании онкологических вирусов вместе с Т-клеточными технологиями иммунотерапии. В качестве монотерапии солидных опухолей онкологическая виротерапия обеспечивает весьма умеренный противоопухолевый эффект, тогда как ввиду взаимодополнения механизмов действия, онкологические вирусы и Т-клеточная терапия могут быть объединены для преодоления присущих каждому из подходов в отдельности ограничений [56, 88]. На сингенной иммунокомпетентной мышной модели с использованием меланомы B16ova было продемонстрировано, что внутриопухолевое введение вируса онкологического везикулярного стоматита (oncolytic vesicular stomatitis virus, oVSV) приводит к повышению инфильтрации CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитами и сохранения 50%-ной выживаемости до 30 дней по сравнению контрольными группами, средняя выживаемость которых составляла порядка 20 дней. Точно так же инфузия OVA-специфических Т-клеток приводила к 50%-ной выживаемости в течение 30 дней. Чтобы усилить противоопухолевый эффект, авторы объединили лечение oVSV с системной инфузией OVA-специфических Т-клеток, что привело к более сильному противоопухолевому ответу, чем лечение одним агентом, составившему порядка 70% выживаемости через 50 дней [27]. В аналогичной модели внутриопухолевое введение онкологического адено-вируса в сочетании с *ex vivo* активированными OVA-специфичными Т-клетками приводило к увеличению присутствия эндогенных CD8<sup>+</sup>Т-клеток, что в свою очередь ингибировало опухолевый рост [96]. Описанные результаты хорошо иллюстрируют аддитивное противоопухолевое действие онкологических вирусов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Онкологические вирусы также успешно сочетаются с терапией BiTE-антителами, что хорошо иллюстрируется целым рядом экспериментальных и

клинических исследований. Онкологический адено-вирус (Onc.Ad), экспрессирующий EGFR-BiTE антитело (Onc.Ad-EGFR.BiTE), показал способность индуцировать накопление и пролиферацию активированных, адаптивно перенесенных Т-клеток *ex vivo* в модели подкожной колоректальной карциномы [30]. Следует, однако, отметить, что использование Onc.Ad-EGFR.BiTE требовало системного введения IL-2 и не приводило к значительному элиминированию опухоли, указывая на необходимость дополнительной активации и/или сохранения Т-клеток в опухолевой массе для обеспечения возможности запуска Т-клеточно-опосредованного противоопухолевого эффекта с помощью BiTE. Позже та же группа исследователей протестировала разработанный Onc.Ad-EGFR.BiTE в сочетании с CAR-T-клетками, специфичными к рецептору фолиевой кислоты альфа (FR- $\alpha$ ) [106]. Обработка вирусом Onc.Ad-EGFR.BiTE способствовала повышению уровней цитотоксичности, пролиферации и продукции IFN $\gamma$  для клеток FR- $\alpha$ -специфичных CAR-T-клеток *in vitro*. *In vivo* вирус Onc.Ad-EGFR.BiTE в сочетании с двумя введенными клеток FR- $\alpha$ -специфичных CAR-T-клеток приводил к значительной задержке опухолевого роста в модели ксенотрансплантата, в которой опухолевые клетки характеризовались экспрессией промежуточных уровней FR- $\alpha$  и высоких уровней EGFR. Во второй модели *in vivo* опухолевые клетки экспрессировали низкие уровни FR- $\alpha$  и высокие уровни EGFR, и комбинация Onc.Ad с CAR-T-клетками приводила к устойчивому уменьшению объема опухоли по сравнению с обработкой одним агентом. Описанные доклинические исследования позволяют предполагать эффективность использования онкологических вирусов, кодирующих BiTE-антитела, позволяющие перенаправлять реактивность Т-клеток на вторичные опухолевые мишени, для усиления противоопухолевого эффекта CAR-T-клеток.

Помимо перечисленных способов сочетанного применения в Т-клеточной иммунотерапии, онкологические вирусы также могут быть снабжены вставками, кодирующими цитокины, стимулирующими рост и пролиферацию Т-клеток (такими как IL-2, IL-15), а также низкомолекулярные антитела, блокирующие PD-L1 для устранения чекпойнт-опосредованной гибели эффекторных клеток [42, 98].

Все перечисленные примеры комбинирования иммунотерапевтических подходов иллюстрируют большой потенциал для развития Т-клеточных технологий лечения онкологических заболеваний в направлении «объединения усилий» уже известных на сегодняшний день иммунотерапевтических схем. Совмещение перечисленных подходов в различных комбинациях уже сейчас позволяет повысить эффективность борьбы с солидными опухолями, по сравнению

с использованием каждого из методов по отдельности.

## Заключение

Существующие на сегодняшний день Т-клеточные технологии иммунотерапии солидных опухолей имеют в своей основе подходы, сформулированные на рубеже XX и XXI веков и с тех пор постоянно динамически развивающиеся благодаря непрерывному накоплению научных данных в области противоопухолевой иммунотерапии. При этом в последние годы это развитие начало приобретать экспоненциальный характер благодаря развитию методов генной модификации – несомненно, на CAR-T-клеточные технологии возлагают большую роль в иммунотерапии опухолей, несмотря на существующие ограничения в эффективности при их использовании в качестве монотерапии. Эффективное и безопасное устранение плотной опухолевой массы все еще

остается нерешенной задачей для большинства исследуемых подходов, однако накопленные на сегодняшний день данные позволяют ожидать в ближайшей перспективе новых прорывов в клинических исследованиях возможностей использования Т-клеточного потенциала для борьбы с солидными новообразованиями. Преодоление механизмов иммуносупрессии, проникновение генно-модифицированных противоопухолевых Т-клеток вглубь плотной опухолевой массы, поиск антигенов для адекватной активации иммунного ответа и снижение выраженности побочных эффектов – эти и другие сохраняющиеся сложности, по-видимому, можно решить, совмещая иммунотерапевтические подходы и накопленные научные сведения для получения терапии, учитывающей все особенности функционирования Т-клеток и нюансы их взаимодействия с клетками иммунной системы и опухоли.

## Список литературы / References

1. Лежнин Ю.Н., Христиченко А.Ю., Ратникова Н.М., Кравченко Ю.Е., Чумаков С.П. Клеточная иммунотерапия – современный подход к лечению онкологических заболеваний // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 313-340. [Lezhnin Yu.N., Khristichenko A.Yu., Ratnikova N.M., Kravchenko Yu.E., Chumakov S.P. Cellular immunotherapy: a modern approach to treatment of oncological diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 313-340. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-313-340.
2. Седых С.Е., Невинский Г.А. Способы получения и перспективы применения биспецифичных антител для лечения онкологических заболеваний // Успехи молекулярной онкологии, 2018. Т.5, № 4. С. 30-40. [Sedykh S.E., Nevinsky G.A. Producing and prospects for the use of bispecific antibodies for the treatment of cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology*, 2018, Vol. 5, no. 4, pp. 30-40. (In Russ.)]
3. Стенина М.Б., Царева Е.В., Жаров А.А., Тюляндина С.А. Инфильтрирующие опухоль лимфоциты: биологическая суть и клиническое значение при раке молочной железы // Российский онкологический журнал, 2016. Т. 21, № 1-2. С. 92-100. [Stenina M.B., Tsareva E.V., Zharov A.A., Tyulyandin S.A. Tumor infiltrating lymphocytes: biological essence and clinical significance in breast cancer. *Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Oncology*, 2016, Vol. 21, no. 1-2, pp. 92-100. (In Russ.)]
4. Шаповал А.И., Шаповал С.П., Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н. Молекулы контроля иммунитета семейства B7. Часть 1. Общая характеристика и первые представители: B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2 и B7-DC // Биоорганическая химия, 2019. Т. 45, № 4. С. 348-364. [Chapoval A.I., Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N., Chapoval S.P. Immune checkpoints of the B7 family. Part 1. General characteristics and first representatives: B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, AND B7-DC. *Bioorganicheskaya khimiya = Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2019, Vol. 45, no. 4, pp. 225-240. (In Russ.)]
5. Шубникова Е.В., Букатина Т.М., Вельц Н.Ю., Каперко Д.А., Кутехова Г.В. Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа: новые риски нового класса противоопухолевых средств // Безопасность и риск фармакотерапии, 2020. Т. 8. № 1. С. 9-22. [Shubnikova E.V., Bukatina T.M., Velts N.Yu., Kaperko D.A., Kutekhova G.V. Immune response checkpoint inhibitors: new risks of a new class of antitumor agents. *Bezopasnost i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*, 2020, Vol. 8, no 1, pp. 9-22. (In Russ.)]
6. Akahori Y., Wang L., Yoneyama M., Seo N., Okumura S., Miyahara Y., Amaishi Y., Okamoto S., Mineno J., Ikeda H., Maki T., Fujiwara H., Akatsuka Y., Kato T., Shiku H. Antitumor activity of CAR-T cells targeting the intracellular oncoprotein WT1 can be enhanced by vaccination. *Blood*, 2018, Vol. 132, no. 11, pp. 1134-1145.
7. Badalamenti G., Fanale D., Incorvaia L., Barraco N., Listi A., Maragliano R., Vincenzi B., Calò V., Iovanna J.L., Bazan V., Russo A. Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: Can a drop dig a stone? *Cell Immunol.*, 2019, Vol. 343, 103753. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.013.
8. Bargou R., Leo E., Zugmaier G., Klinger M., Goebeler M., Knop S., Noppeney R., Viardot A., Hess G., Schuler M., Einsele H., Brandl C., Wolf A., Kirchinger P., Klappers P., Schmidt M., Riethmüller G., Reinhardt C., Baeuerle P.A., Kufer P. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science*, 2008, Vol. 321, no. 5891, pp. 974-977.
9. Barroso-Sousa R., Ott P.A. Transformation of old concepts for a new era of cancer immunotherapy: cytokine therapy and cancer vaccines as combination partners of PD1/PD-L1 Inhibitors. *Curr. Oncol. Rep.*, 2018, Vol. 21, no. 1. doi: 10.1007/s11912-018-0738-2.
10. Beavis P.A., Henderson M.A., Giuffrida L., Mills J.K., Sek K., Cross R.S., Davenport A.J., John L.B., Mardiana S., Slaney C.Y., Johnstone R.W., Trapani J.A., Stagg J., Loi S., Kats L., Gyorki D., Kershaw M.H., Darcy P.K.

Targeting the adenosine 2A receptor enhances chimeric antigen receptor T cell efficacy. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 127, no. 3, pp. 929-941.

11. Bedognetti D., Spivey T.L., Zhao Y., Uccellini L., Tomei S., Dudley M.E., Ascierto M.L., de Giorgi V., Liu Q., Delogu L.G., Sommariva M., Sertoli M.R., Simon R., Wang E., Rosenberg S.A., Marincola F.M. CXCR3/CCR5 pathways in metastatic melanoma patients treated with adoptive therapy and interleukin-2. *Br. J. Cancer*, 2013, Vol. 109, no. 9, pp. 2412-2423.
12. Bernhard H., Neudorfer J., Gebhard K., Conrad H., Hermann C., Nährig J., Fend F., Weber W., Busch D.H., Peschel C. Adoptive transfer of autologous, HER2-specific, cytotoxic T lymphocytes for the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2008, Vol. 57, no. 2, pp. 271-280.
13. Borgers J.S.W., Haanen J.B.A.G. Cellular therapy and cytokine treatments for melanoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 2021, Vol. 35, no. 1, pp. 129-144.
14. Boyman O., Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 3, pp. 180-190.
15. Bruchard M., Ghiringhelli F. Deciphering the roles of innate lymphoid cells in cancer. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 656. doi: 10.3389/fimmu.2019.00656.
16. Chames P., Baty D. Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, Vol. 189, no. 1, pp. 1-8.
17. Chandran S.S., Klebanoff C.A. T cell receptor-based cancer immunotherapy: Emerging efficacy and pathways of resistance. *Immunol. Rev.*, 2019, Vol. 290, no. 1, pp. 127-147.
18. Chapuis A.G., Roberts I.M., Thompson J.A., Margolin K.A., Bhatia S., Lee S.M., Sloan H.L., Lai I.P., Farrar E.A., Wagener F., Shibuya K.C., Cao J., Wolchok J.D., Greenberg P.D., Yee C. T-cell therapy using interleukin-21-primed cytotoxic T-cell lymphocytes combined with cytotoxic T-cell lymphocyte Antigen-4 Blockade Results in Long-Term Cell Persistence and Durable Tumor Regression. *J. Clin. Oncol.*, 2016, Vol. 34, no. 31, pp. 3787-3795.
19. Cheever M.A., Greenberg P.D., Fefer A. Specific adoptive therapy of established leukemia with syngeneic lymphocytes sequentially immunized *in vivo* and *in vitro* and nonspecifically expanded by culture with interleukin 2. *J. Immunol.*, 1981, no. 126, pp. 1318-1322.
20. Chinnasamy D., Yu Z., Kerkar S.P., Zhang L., Morgan R.A., Restifo N.P., Rosenberg S.A. Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice. *Clin. Cancer Res.*, 2012, Vol. 18, no. 6, pp. 1672-1683.
21. Chodon T., Comin-Anduix B., Chmielowski B., Koya R.C., Wu Z., Auerbach M., Ng C., Avramis E., Seja E., Villanueva A., McCannel T.A., Ishiyama A., Czernin J., Radu C.G., Wang X., Gjertson D.W., Cochran A.J., Cornetta K., Wong D.J., Kaplan-Lefko P., Hamid O., Samlowski W., Cohen P.A., Daniels G.A., Mukherji B., Yang L., Zack J.A., Kohn D.B., Heath J.R., Glaspy J.A., Witte O.N., Baltimore D., Economou J.S., Ribas A. Adoptive transfer of MART-1 T-cell receptor transgenic lymphocytes and dendritic cell vaccination in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 2014, Vol. 20, no. 9, pp. 2457-2465.
22. Conlon K.C., Miljkovic M.D., Waldmann T.A. Cytokines in the treatment of cancer. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2019, Vol. 39, no. 1, pp. 6-21.
23. Dangaj D., Bruand M., Grimm A.J., Ronet C., Barras D., Duttagupta P.A., Lanitis E., Duraiswamy J., Tanyi J.L., Benencia F., Conejo-Garcia J., Ramay H.R., Montone K.T., Powell D.J. Jr, Gimotty P.A., Facciabene A., Jackson D.G., Weber J.S., Rodig S.J., Hodi S.F., Kandalaft L.E., Irving M., Zhang L., Foukas P., Rusakiewicz S., Delorenzi M., Coukos G. Cooperation between Constitutive and Inducible Chemokines Enables T Cell Engraftment and Immune Attack in Solid Tumors. *Cancer Cell*, 2019, Vol. 35, no. 6, pp. 885-900.e10.
24. Das S., Johnson D.B. Immune-related adverse events and anti-tumor efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer*, 2019, Vol. 7, no. 1, 306. doi: 10.1186/s40425-019-0805-8.
25. de Miguel M., Umana P., Gomes de Moraes A.L., Moreno V., Calvo E. T-cell-engaging Therapy for Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2021, Vol. 27, no. 6, pp. 1595-1603.
26. de Wolf C., van de Bovenkamp M., Hoefnagel M. Regulatory perspective on *in vitro* potency assays for human T cells used in anti-tumor immunotherapy. *Cytotherapy*, 2018, Vol. 20, pp. 601-622.
27. Diaz R.M., Galivo F., Kottke T., Wongthida P., Qiao J., Thompson J., Valdes M., Barber G., Vile R.G. Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus. *Cancer Res.*, 2007, Vol. 67, no. 6, pp. 2840-2848.
28. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Robbins P.F., Yang J.C., Hwu P., Schwartzentruber D.J., Topalian S.L., Sherry R., Restifo N.P., Hubicki A.M., Robinson M.R., Raffeld M., Duray P., Seipp C.A., Rogers-Freezer L., Morton K.E., Mavroukakis S.A., White D.E., Rosenberg S.A. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*, 2002, Vol. 298, no. 5594, pp. 850-854.
29. Englisch A., Altvater B., Kailayangiri S., Hartmann W., Rossig C. VEGFR2 as a target for CAR T cell therapy of Ewing sarcoma. *Pediatr. Blood Cancer*, 2020, Vol. 67, no. 10, e28313. doi: 10.1002/pbc.28313.
30. Fajardo C.A., Guedan S., Rojas L.A., Moreno R., Arias-Badia M., de Sostoa J., June C.H., Alemany R. Oncolytic Adenoviral Delivery of an EGFR-Targeting T-cell Engager Improves Antitumor Efficacy. *Cancer Res.*, 2017, Vol. 77, no. 8, pp. 2052-2063.
31. Fesnak A.D., June C.H., Levine B.L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2016, Vol. 16, no. 9, pp. 566-581.
32. Fu X., Rivera A., Tao L., Zhang X. Genetically modified T cells targeting neovasculature efficiently destroy tumor blood vessels, shrink established solid tumors and increase nanoparticle delivery. *Int. J. Cancer*, 2013, Vol. 133, no. 10, pp. 2483-2492.
33. Fujiwara K., Sasawatari S., Nakai S., Imaeda K., Nagai S., Matsuno Y., Hatanaka K., Hatanaka Y., Takenaka S., Okada N. Predicting the efficacy and safety of TACTICs (tumor angiogenesis-specific CAR-T cells impacting cancers) therapy for soft tissue sarcoma patients. *Cancers (Basel)*, 2020, Vol. 12, no. 10, 2735. doi: 10.3390/cancers12102735.
34. Garber K. Driving T-cell immunotherapy to solid tumors. *Nat Biotechnol.*, 2018, Vol. 36, no. 3, pp. 215-219.

35. Geukes Foppen M.H., Donia M., Svane I.M., Haanen J.B. Tumor-infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic cancer. *Mol. Oncol.*, 2015, no. 10, pp. 1918-1935
36. Glennie M.J., Brennand D.M., Bryden F., McBride H.M., Stirpe F., Worth A.T., Stevenson G.T. Bispecific F(ab' gamma)2 antibody for the delivery of saporin in the treatment of lymphoma. *J. Immunol.*, 1988, Vol. 141, no. 10, pp. 3662-3670
37. Godfrey D.I., Le Nours J., Andrews D.M., Uldrich A.P., Rossjohn J. Unconventional T cell targets for cancer immunotherapy. *Immunity*, 2018, Vol. 48, no. 3, pp. 453-473.
38. Goebeler M., Bargou, R.C. T cell-engaging therapies – BiTEs and beyond. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2020, Vol. 17, pp. 418-434.
39. González-Martín A., Gómez L., Lustgarten J., Mira E., Mañes S. Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4(+) and CD8(+) T cells. *Cancer Res.*, 2011, Vol. 71, no. 16, pp. 5455-5466.
40. Granier C., de Guillebon E., Blanc C., Roussel H., Badoval C., Colin E., Saldmann A., Gey A., Oudard S., Tartour E. Mechanisms of action and rationale for the use of checkpoint inhibitors in cancer. *ESMO Open*, 2017, Vol. 2, no. 2, e000213. doi: 10.1136/esmoopen-2017-000213.
41. Harlin H., Meng Y., Peterson A.C., Zha Y., Tretiakova M., Slingluff C., McKee M., Gajewski T.F. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8<sup>+</sup> T-cell recruitment. *Cancer Res.*, 2009, Vol. 69, no. 7, pp. 3077-3085.
42. Havunen R., Siurala M., Sorsa S., Grönberg-Vähä-Koskela S., Behr M., Tähtinen S., Santos J.M., Karel P., Rusanen J., Nettelbeck D.M., Ehrhardt A., Kanerva A., Hemminki A. Oncolytic adenoviruses armed with tumor necrosis factor alpha and Interleukin-2 enable successful adoptive cell therapy. *Mol. Ther. Oncolytics*, 2016, Vol. 4, pp. 77-86.
43. Helguera G., Morrison S.L., Penichet M.L. Antibody-cytokine fusion proteins: harnessing the combined power of cytokines and antibodies for cancer therapy. *Clin. Immunol.*, 2002, Vol. 105, no. 3, pp. 233-246.
44. Hu Z., Ott P.A., Wu C.J. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 3, pp. 168-182.
45. Huang Q., Xia J., Wang L., Wang X., Ma X., Deng Q., Lu Y., Kumar M., Zhou Z., Li L., Zeng Z., Young K.H., Yi Q., Zhang M., Li Y. miR-153 suppresses IDO1 expression and enhances CAR T cell immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.*, 2018, Vol. 11, no. 1, 58. doi: 10.1186/s13045-018-0600-x.
46. Hunder N.N., Wallen H., Cao J., Hendricks D.W., Reilly J.Z., Rodmyre R., Jungbluth A., Gnjatic S., Thompson J.A., Yee C. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4<sup>+</sup> T cells against NY-ESO-1. *N. Engl. J. Med.*, 2008, Vol. 358, no. 25, pp. 2698-2703.
47. Hutmacher C., Neri D. Antibody-cytokine fusion proteins: Biopharmaceuticals with immunomodulatory properties for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2019, Vol. 141, pp. 67-91.
48. Idorn M., Skadborg S.K., Kellermann L., Halldórsdóttir H.R., Holmen Olofsson G., Met Ö., Thor Straten P. Chemokine receptor engineering of T cells with CXCR2 improves homing towards subcutaneous human melanomas in xenograft mouse model. *Oncoimmunology*, 2018, Vol. 7, no. 8, e1450715. doi: 10.1080/2162402X.2018.1450715.
49. Imai N., Ikeda H., Tawara I., Wang L., Wang L., Nishikawa H., Kato T., Shiku H. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor stimulation enhances the multifunctionality of adoptively transferred tumor antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells with tumor regression. *Cancer Sci.*, 2009, Vol. 100, no. 7, pp. 1317-1325.
50. Inaguma Y., Akahori Y., Murayama Y., Shiraishi K., Tsuzuki-Iba S., Endoh A., Tsujikawa J., Demachi-Okamura A., Hiramatsu K., Saji H., Yamamoto Y., Yamamoto N., Nishimura Y., Takahashi T., Kuzushima K., Emi N., Akatsuka Y. Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H. *Gene Ther.*, 2014, Vol. 21, no. 6, pp. 575-584.
51. Jin L., Tao H., Karachi A., Long Y., Hou A.Y., Na M., Dyson K.A., Grippin A.J., Deleyrolle L.P., Zhang W., Rajon D.A., Wang Q.J., Yang J.C., Kresak J.L., Sayour E.J., Rahman M., Bova F.J., Lin Z., Mitchell D.A., Huang J. CXCR1- or CXCR2-modified CAR T cells co-opt IL-8 for maximal antitumor efficacy in solid tumors. *Nat. Commun.*, 2019, Vol. 10, no. 1, 4016. doi: 10.1038/s41467-019-11869-4.
52. June C.H., O'Connor R.S., Kawalekar O.U., Ghassemi S., Milone M.C. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 2018, Vol. 359, no. 6382, pp. 1361-1365.
53. Kawamura K., Tanaka Y., Nakasone H., Ishihara Y., Kako S., Kobayashi S., Tanaka Y., Ohmori T., Uchimaru K., Okamoto S., Mineno J., Shiku H., Nishimura S., Kanda Y. Development of a Unique T Cell Receptor Gene-Transferred Tax-Redirected T Cell Immunotherapy for Adult T Cell Leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2020, Vol. 8, no. 1377-1385.
54. Klebanoff C.A., Acquavella N., Yu Z., Restifo N.P. Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 239, no. 1, pp. 27-44.
55. Klinger M., Brandl C., Zugmaier G., Hijazi Y., Bargou R.C., Topp M.S., Gökbüget N., Neumann S., Goebeler M., Viardot A., Stelljes M., Brüggemann M., Hoelzer D., Degenhardt E., Nagorsen D., Baeuerle P.A., Wolf A., Kufer P. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 26, pp. 6226-6233.
56. Kochneva G.V., Sivolobova G.F., Tkacheva A.V., Gorchakov A.A., Kulemin S.V. Combination of oncolytic virotherapy and CAR T/NK Cell Therapy for the Treatment of Cancer. *Mol. Biol. (Mosk.)*, 2020, Vol. 54, no. 1, pp. 3-16. (In Russ.).
57. Kulemin S.V., Gorchakov A.A., Chikaev A.N., Kuznetsova V.V., Volkova O.Y., Matvienko D.A., Petukhov A.V., Zaritskey A.Y., Tararin A.V. VEGFR2-specific FnCAR effectively redirects the cytotoxic activity of T cells and YT NK cells. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 10, pp. 9021-9029.

58. Lanitis E., Kosti P., Ronet C., Cribioli E., Rota G., Spill A., Reichenbach P., Zoete V., Dangaj Laniti D., Coukos G., Irving M. VEGFR-2 redirected CAR-T cells are functionally impaired by soluble VEGF-A competition for receptor binding. *J. Immunother. Cancer*, 2021, Vol. 9, no. 8, e002151. doi: 10.1136/jitc-2020-002151.
59. Leko V., Rosenberg S.A. Identifying and targeting human tumor antigens for T cell-based immunotherapy of solid tumors. *Cancer Cell*, 2020, Vol. 38, no. 4, pp. 454-472.
60. Lesch S., Blumenberg V., Stoiber S., Gottschlich A., Ogonek J., Cadilha B.L., Dantes Z., Rataj F., Dorman K., Lutz J., Karches C.H., Heise C., Kurzay M., Larimer B.M., Grassmann S., Rapp M., Nottebrock A., Kruger S., Tokarew N., Metzger P., Hoerth C., Benmehbarek M.R., Dhoqina D., Grünmeier R., Seifert M., Oener A., Umut Ö., Joaquina S., Vimeux L., Tran T., Hank T., Baba T., Huynh D., Megens R.T.A., Janssen K.P., Jastrach M., Lamp D., Ruehland S., di Pilato M., Pruessmann J.N., Thomas M., Marr C., Ormanns S., Reischer A., Hristov M., Tartour E., Donnadieu E., Rothenfusser S., Duewell P., König L.M., Schnurr M., Subklewe M., Liss A.S., Halama N., Reichert M., Mempel T.R., Endres S., Kobold S. T cells armed with C-X-C chemokine receptor type 6 enhance adoptive cell therapy for pancreatic tumours. *Nat. Biomed. Eng.*, 2021, Vol. 5, no. 11, pp. 1246-1260.
61. Lev A., Noy R., Oved K., Novak H., Segal D., Walden P., Zehn D., Reiter Y. Tumor-specific Ab-mediated targeting of MHC-peptide complexes induces regression of human tumor xenografts *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2004, Vol. 101, no. 24, pp. 9051-9056.
62. Levin A.M., Bates D.L., Ring A.M., Krieg C., Lin J.T., Su L., Moraga I., Raeber M.E., Bowman G.R., Novick P., Pande V.S., Fathman C.G., Boyman O., Garcia K.C. Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 'superkine'. *Nature*, 2012, Vol. 484, no. 7395, pp. 529-533.
63. Linette G.P., Stadtmauer E.A., Maus M.V., Rapoport A.P., Levine B.L., Emery L., Litzky L., Bagg A., Carreno B.M., Cimino P.J., Binder-Scholl G.K., Smethurst D.P., Gerry A.B., Pumphrey N.J., Bennett A.D., Brewer J.E., Dukes J., Harper J., Tayton-Martin H.K., Jakobsen B.K., Hassan N.J., Kalos M., June C.H. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood*, 2013, Vol. 122, no. 6, pp. 863-871.
64. Man Y.G., Stojadinovic A., Mason J., Avital I., Bilchik A., Bruecher B., Protic M., Nissan A., Izadjoo M., Zhang X., Jewett A. Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories. *J. Cancer*, 2013, Vol. 4, no. 1, pp. 84-95.
65. Marcuzzi E., Angioni R., Molon B., Calì B. Chemokines and chemokine receptors: orchestrating tumor metastasization. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 20, no. 1, 96. doi: 10.3390/ijms20010096.
66. Martinez M., Moon E.K. CAR T cells for solid tumors: new strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 128. doi: 10.3389/fimmu.2019.00128.
67. Matko S., Teichert M., Tunger A., Schmitz M., Bornhauser M., Tonn T., Odendahl M. Enumeration of WT1-specific CD8<sup>+</sup> T cells for clinical application using an MHC Streptamer based no-wash single-platform flow-cytometric assay. *Cytometry A*, 2017, Vol. 91, no. 10, pp. 1001-1008.
68. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., Chew A., Gonzalez V.E., Zheng Z., Lacey S.F., Mahnke Y.D., Melenhorst J.J., Rheingold S.R., Shen A., Teachey D.T., Levine B.L., June C.H., Porter D.L., Grupp S.A. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2014, Vol. 371, no. 16, pp. 1507-1517.
69. Mikucki M.E., Fisher D.T., Matsuzaki J., Skitzki J.J., Gaulin N.B., Muhitch J.B., Ku A.W., Frelinger J.G., Odunsi K., Gajewski T.F., Luster A.D., Evans S.S. Non-redundant requirement for CXCR3 signalling during tumoricidal T-cell trafficking across tumour vascular checkpoints. *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, 7458. doi: 10.1038/ncomms8458.
70. Mitsui J., Nishikawa H., Muraoka D., Wang L., Noguchi T., Sato E., Kondo S., Allison J.P., Sakaguchi S., Old L.J., Kato T., Shiku H. Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clin. Cancer Res.*, 2010, Vol. 16, no. 10, pp. 2781-2791.
71. Morgan R.A., Chinnasamy N., Abate-Daga D., Gros A., Robbins P.F., Zheng Z., Dudley M.E., Feldman S.A., Yang J.C., Sherry R.M., Phan G.Q., Hughes M.S., Kammula U.S., Miller A.D., Hessman C.J., Stewart A.A., Restifo N.P., Quezado M.M., Alimchandani M., Rosenberg A.Z., Nath A., Wang T., Bielekova B., Wuest S.C., Akula N., McMahon F.J., Wilde S., Mosetter B., Schendel D.J., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J. Immunother.*, 2013, Vol. 36, no. 2, pp. 133-151.
72. Nishikawa H., Kato T., Hirayama M., Orito Y., Sato E., Harada N., Gnjatic S., Old L.J., Shiku H. Regulatory T cell-resistant CD8<sup>+</sup> T cells induced by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor signaling. *Cancer Res.*, 2008, Vol. 68, no. 14, pp. 5948-5954.
73. Oates J., Jakobsen B.K. ImmTACs: Novel bi-specific agents for targeted cancer therapy. *Oncoimmunology*, 2013, Vol. 2, no. 2, e22891. doi: 10.4161/onci.22891.
74. Offner S., Hofmeister R., Romaniuk A., Kufer P., Baeuerle P.A. Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Mol. Immunol.*, 2006, Vol. 43, pp. 763-771.
75. Ottolenghi A., Bolet P., Sarkar R., Greenshpan Y., Iraqi M., Ghosh S., Bhattacharya B., Taylor Z.V., Kundu K., Radinsky O., Gazit R., Stepensky D., Apte R.N., Voronov E., Porgador A. Life-extended glycosylated IL-2 promotes Treg induction and suppression of autoimmunity. *Sci. Rep.*, 2021, Vol. 11, no. 1, 7676. doi: 10.1038/s41598-021-87102-4.
76. Parkhurst M.R., Yang J.C., Langan R.C., Dudley M.E., Nathan D.A., Feldman S.A., Davis J.L., Morgan R.A., Merino M.J., Sherry R.M., Hughes M.S., Kammula U.S., Phan G.Q., Lim R.M., Wank S.A., Restifo N.P., Robbins P.F., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol. Ther.*, 2011, Vol. 19, no. 3, pp. 620-626.

77. Rafiq S., Purdon T.J., Daniyan A.F., Koneru M., Dao T., Liu C., Scheinberg D.A., Brentjens R.J. Optimized T-cell receptor-mimic chimeric antigen receptor T cells directed toward the intracellular Wilms Tumor 1 antigen. *Leukemia*, 2017, Vol. 8, pp. 1788-1797.
78. Rapp M., Grassmann S., Chaloupka M., Layritz P., Kruger S., Ormanns S., Rataj F., Janssen K.P., Endres S., Anz D., Kobold S. C-C chemokine receptor type-4 transduction of T cells enhances interaction with dendritic cells, tumor infiltration and therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 5, no. 3, e1105428. doi: 10.1080/2162402X.2015.1105428.
79. Reinhard K., Rengstl B., Oehm P., Michel K., Billmeier A., Hayduk N., Klein O., Kuna K., Ouchan Y., Wöll S., Christ E., Weber D., Suchan M., Bukur T., Birtel M., Jahndel V., Mroz K., Hobohm K., Kranz L., Diken M., Kühlcke K., Türeci Ö., Sahin U. An RNA vaccine drives expansion and efficacy of claudin-CAR-T cells against solid tumors. *Science*, 2020, Vol. 367, no. 6476, pp. 446-453.
80. Restifo N.P., Dudley M.E., Rosenberg S.A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 4, pp. 269-281.
81. Rohaan M.W., Wilgenhof S., Haanen J.B.A.G. Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Arch.*, 2019, Vol. 474, no. 4, pp. 449-461.
82. Rosenberg S.A., Mulé J.J., Spiess P.J., Reichert C.M., Schwarz S.L. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J. Exp. Med.*, 1985, Vol. 161, no. 5, pp. 1169-1188.
83. Rosenberg S.A., Packard B.S., Aebersold P.M., Solomon D., Topalian S.L., Toy S.T., Simon P., Lotze M.T., Yang J.C., Seipp C.A. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.*, 1988, Vol. 319, no. 25, pp. 1676-1680.
84. Rosenberg S.A., Restifo N.P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 2015, Vol. 348, no. 6230, pp. 62-68.
85. Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.*, 2004, Vol. 9, pp. 909-915.
86. Rosenberg S.A., Yang J.C., Topalian S.L., Schwartzentruber D.J., Weber J.S., Parkinson D.R., Seipp C.A., Einhorn J.H., White D.E. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA*, 1994, Vol. 271, no. 12, pp. 907-913.
87. Rosenberg S.A. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 12, pp. 5451-5458.
88. Rosewell S.A., Suzuki M. Oncolytic Viruses Partner With T-Cell Therapy for Solid Tumor Treatment. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2103. doi: 10.3389/fimmu.2018.02103.
89. Scott E.M., Duffy M.R., Freedman J.D., Fisher K.D., Seymour L.W. Solid Tumor Immunotherapy with T Cell Engager-Armed Oncolytic Viruses. *Macromol. Biosci.*, 2018, Vol. 18, no. 1. doi: 10.1002/mabi.201700187.
90. Sharma M., Khong H., Fa'ak F., Bentebibel S.E., Janssen L.M.E., Chesson B.C., Creasy C.A., Forget M.A., Kahn L.M.S., Pazdrak B., Karki B., Hailemichael Y., Singh M., Vianden C., Veniam S., Bharadwaj U., Twardy D.J., Haymaker C., Bernatchez C., Huang S., Rajapakshe K., Coarfa C., Hurwitz M.E., Sznol M., Hwu P., Hoch U., Addepalli M., Charych D.H., Zalevsky J., Diab A., Overwijk W.W. Bempegaldesleukin selectively depletes intratumoral Tregs and potentiates T cell-mediated cancer therapy. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 661. doi: 10.1038/s41467-020-14471-1.
91. Siddiqui I., Erreni M., van Brakel M., Debets R., Allavena P. Enhanced recruitment of genetically modified CX3CR1-positive human T cells into Fractalkine/CX3CL1 expressing tumors: importance of the chemokine gradient. *J. Immunother. Cancer*, 2016, Vol. 4, 21. doi: 10.1186/s40425-016-0125-1.
92. Slaney C.Y., von Scheidt B., Davenport A.J., Beavis P.A., Westwood J.A., Mardiana S., Tscharke D.C., Ellis S., Prince H.M., Trapani J.A., Johnstone R.W., Smyth M.J., Teng M.W., Ali A., Yu Z., Rosenberg S.A., Restifo N.P., Neeson P., Darcy P.K., Kershaw M.H. Dual-specific chimeric antigen receptor T cells and an indirect vaccine eradicate a variety of large solid tumors in an immunocompetent, self-antigen setting. *Clin. Cancer Res.*, 2017, Vol. 23, no. 10, pp. 2478-2490.
93. Sommermeyer D., Hudecek M., Kosasih P.L., Gogishvili T., Maloney D.G., Turtle C.J., Riddell S.R. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> subsets confer superior antitumor reactivity *in vivo*. *Leukemia*, 2016, Vol. 30, no. 2, pp. 492-500.
94. Spangler J.B., Moraga I., Mendoza J.L., Garcia K.C. Insights into cytokine-receptor interactions from cytokine engineering. *Annu. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 33, pp. 139-167.
95. Sukari A., Abdallah N., Nagasaka M. Unleash the power of the mighty T cells-basis of adoptive cellular therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2019, Vol. 136, pp. 1-12.
96. Tähtinen S., Grönberg-Vähä-Koskela S., Lumen D., Merisalo-Soikkeli M., Siurala M., Airaksinen A.J., Vähä-Koskela M., Hemminki A. Adenovirus improves the efficacy of adoptive T-cell therapy by recruiting immune cells to and promoting their activity at the tumor. *Cancer Immunol. Res.*, 2015, Vol. 3, no. 8, pp. 915-925.
97. Tanaka M., Tashiro H., Omer B., Lapteva N., Ando J., Ngo M., Mehta B., Dotti G., Kinchington P.R., Leen A.M., Rossig C., Rooney C.M. Vaccination targeting native receptors to enhance the function and proliferation of chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells. *Clin. Cancer Res.*, 2017, Vol. 23, no. 14, pp. 3499-3509.
98. Tanoue K., Rosewell Shaw A., Watanabe N., Porter C., Rana B., Gottschalk S., Brenner M., Suzuki M. Armed oncolytic adenovirus-expressing PD-L1 mini-body enhances antitumor effects of chimeric antigen receptor T cells in solid tumors. *Cancer Res.*, 2017, Vol. 77, no. 8, pp. 2040-2051.
99. van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P., Lurquin C., De Plaen E., Van den Eynde B., Knuth A., Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 1991, Vol. 254, no. 5038, pp. 1643-1647.

100. Vinay D.S., Ryan E.P., Pawelec G., Talib W.H., Stagg J., Elkord E., Lichtor T., Decker W.K., Whelan R.L., Kumara H.M.C.S., Signori E., Honoki K., Georgakilas A.G., Amin A., Helferich W.G., Boosani C.S., Guha G., Ciriolo M.R., Chen S., Mohammed S.I., Azmi A.S., Keith W.N., Bilsland A., Bhakta D., Halicka D., Fujii H., Aquilano K., Ashraf S.S., Nowsheen S., Yang X., Choi B.K., Kwon B.S. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin. Cancer Biol.*, 2015, Vol. 35 Suppl, pp. S185-S198.
101. Watanabe K., Kuramitsu S., Posey A.D. Jr, June C.H. Expanding the therapeutic window for CAR T cell therapy in solid tumors: the knowns and unknowns of CAR T cell biology. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2486. doi: 10.3389/fimmu.2018.02486.
102. Wagner J., Wickman E., Shaw T.I., Anido A.A., Langfitt D., Zhang J., Porter S.N., Pruett-Miller S.M., Tillman H., Krenciute G., Gottschalk S. Antitumor Effects of CAR T Cells Redirected to the EDB Splice Variant of Fibronectin. *Cancer Immunol. Res.*, 2021, Vol. 3, no. 279-290.
103. Waldmann T.A. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2018, Vol. 10, no. 12, a028472. doi: 10.1101/cshperspect.a028472.
104. Wang W., Ma Y., Li J., Shi H.S., Wang L.Q., Guo F.C., Zhang J., Li D., Mo B.H., Wen F., Liu T., Liu Y.T., Wang Y.S., Wei Y.Q. Specificity redirection by CAR with human VEGFR-1 affinity endows T lymphocytes with tumor-killing ability and anti-angiogenic potency. *Gene Ther.*, 2013, Vol. 20, no. 10, pp. 970-978.
105. Wei S.C., Duffy C.R., Allison J.P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov.*, 2018, Vol. 9, pp. 1069-1086.
106. Wing A., Fajardo C.A., Posey A.D. Jr, Shaw C., Da T., Young R.M., Alemany R., June C.H., Guedan S. Improving CART-Cell therapy of solid tumors with oncolytic virus-driven production of a bispecific T-cell Engager. *Cancer Immunol. Res.*, 2018, Vol. 5, pp. 605-616.
107. Xin G., Schauder D.M., Jing W., Jiang A., Joshi N.S., Johnson B., Cui W. Pathogen boosted adoptive cell transfer immunotherapy to treat solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, Vol. 114, no. 4, pp. 740-745.
108. Yeku O.O., Brentjens R.J. Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy. *Biochem. Soc. Trans.*, 2016, Vol. 44, pp. 412-418.

**Авторы:**

**Кузнецова М.С.** – к.б.н., научный сотрудник  
лаборатории молекулярной иммунологии  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия

**Шику Хироси** – д.м.н., профессор, заведующий  
лабораторией клеточных технологий иммунотерапии  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия; заведующий кафедрой  
иммуногенной терапии и персонализированной  
иммунотерапии рака Высшей школы медицины  
Университета Миэ, Миэ, Япония

**Караулов А.В.** – д.м.н., профессор, академик РАН,  
заведующий кафедрой клинической иммунологии  
и аллергологии ФГАОУ ВО «Первый Московский  
государственный медицинский университет имени  
И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ  
(Сеченовский университет), Москва, Россия

**Сеников С.В.** – д.м.н., профессор, заведующий  
лабораторией молекулярной иммунологии  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»,  
г. Новосибирск, Россия

Поступила 19.10.2022  
Отправлена на доработку 07.11.2022  
Принята к печати 20.11.2022

**Authors:**

**Kuznetsova M.S.**, PhD (Biology), Research Associate,  
Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute  
of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk,  
Russian Federation

**Shiku Hiroshi**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head,  
Laboratory of Cellular Technologies of Immunotherapy,  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,  
Novosibirsk, Russian Federation; Head, Department of  
Immuno-Gene Therapy, Mie University Graduate School  
of Medicine, Mie, Japan

**Karaulov A.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member,  
Russian Academy of Sciences, Head, Department of Clinical  
Immunology and Allergology, I. Sechenov First Moscow State  
Medical University, Moscow, Russian Federation

**Sennikov S.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head,  
Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute  
of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk,  
Russian Federation

Received 19.10.2022  
Revision received 07.11.2022  
Accepted 20.11.2022

# ВЛИЯНИЕ МАКРОФАГОВ НА ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩУЮ СИСТЕМУ В НОРМЕ И ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

Булавинцева Т.С.<sup>1</sup>, Юшков Б.Г.<sup>1</sup>, Данилова И.Г.<sup>1</sup>, Абидов М.Т.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> Институт иммунопатологии и профилактической медицины, г. Любляна, Словения

**Резюме.** Инсулин-синтезирующие клетки (ИСК) поджелудочной железы локализованы как в ее островках, так и экзокринной части в виде одиночных клеток или агломератов. ИСК различаются своими морфофункциональными характеристиками в зависимости от особенностей микроокружения. В формировании их микроокружения участвуют в том числе резидентные макрофаги. Цель – оценить влияние функциональной активности макрофагов на инсулин-синтезирующую систему (панкреатический островок, агломераты и отдельно лежащие инсулин-синтезирующие клетки) в норме и при аллоксановом диабете.

Аллоксановый диабет вызывали у половозрелых крыс самцов линии «Вистар» внутрибрюшинным введением аллоксана (30 мг/100 г). Моделирование функциональной активности макрофагов осуществлялось противовоспалительным препаратом аминофталгидразида (АФГ). В крови экспериментальных животных анализировали содержание инсулина, глюкозы и гликозилированного гемоглобина. В гомогенате поджелудочной железы определяли уровень IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ . На гистологических препаратах органа подсчитывали содержание макрофагов в островковой и экзокринной частях, а также количество панкреатических островков, агломератов и одиночных ИСК. Определяли уровень пролиферации (insulin $^+$ Ki-67 $^+$ ), апоптоза (TUNEL $^+$ insulin $^+$ ) и содержание инсулина (по интенсивности его флюoresценции) ИСК различной локализации. Все панкреатические островки были разделены на 3 типа по интенсивности флюoresценции инсулина – островки с высоким, средним и низким уровнем флюoresценции.

У здоровых крыс иммуномодуляция снижает общий уровень IL-1 $\alpha$  в паренхиме поджелудочной железы без изменения общих показателей углеводного обмена. В экзокринной части органа увеличивается содержание одиночных ИСК в протоковом эпителии и повышается пролиферация ИСК агломератов. В панкреатических островках растет интенсивность апоптоза  $\beta$ -клеток. Уменьшается доля островков с высоким уровнем флюoresценции инсулина и увеличивается доля со средним его уровнем. При этом в первых плотность макрофагов и пролиферация  $\beta$ -клеток ниже, а апоптоз выше чем у интактных животных. В островках с низким содержанием инсулина иммуномодуляция не вы-

## Адрес для переписки:

Булавинцева Татьяна Сергеевна  
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»  
Уральского отделения Российской академии наук  
620049, Россия, г. Екатеринбург,  
ул. Первомайская, 106, к. 123.  
Тел./факс: 8 (343) 374-00-70.  
E-mail: bulavincevat@gmail.com

## Address for correspondence:

Tatyana S. Bulavintseva  
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian  
Academy of Sciences  
106 Pervomaiskaya St, Room 123  
Yekaterinburg  
620049 Russian Federation  
Phone/fax: +7 (343) 374-00-70.  
E-mail: bulavincevat@gmail.com

## Образец цитирования:

Т.С. Булавинцева, Б.Г. Юшков, И.Г. Данилова, М.Т. Абидов «Влияние макрофагов на инсулин-синтезирующую систему в норме и при аллоксановом диабете» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2. С. 287-300. doi: 10.15789/1563-0625-IOM-2534

© Булавинцева Т.С. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии

Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

T.S. Bulavintseva, B.G. Yushkov, I.G. Danilova, M.T. Abidov  
“Influence of macrophages on the insulin-synthesizing system  
under normal conditions and in alloxan diabetes”, Medical  
Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya, 2023,  
Vol. 25, no. 2, pp. 287-300.

doi: 10.15789/1563-0625-IOM-2534

© Bulavintseva T.S. et al., 2023

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-IOM-2534

зывает изменений морфологических характеристик. Введение АФГ при аллоксановом диабете способствует значительному снижению концентрации  $IFN\gamma$  в тканях железы, стабилизирует содержание  $IL-1\alpha$ , при этом уменьшается апоптоз ИСК и макрофагальная инфильтрация во всех отделах железы. В протоковом эпителии сохраняется большое количество одиночных ИСК с высокой синтетической активностью, увеличивается число агломератов и их клеточность. В островках увеличивается количество делящихся  $\beta$ -клеток.

Модуляция функциональной активности макрофагов поджелудочной железы в физиологических условиях оказывает разнонаправленное влияние на инсулин-синтезирующие клетки в зависимости от их локализации. В экзокринной части органа, где располагаются М2-макрофаги, наблюдается активация дифференцировки и пролиферации предшественников ИСК. В то время как в островках, где присутствуют М1-макрофаги, усиливается апоптоз  $\beta$ -клеток. При аллоксановом диабете иммуномодуляция способствует снижению деструкции инсулиноцитов на фоне высокой интенсивности их пролиферации. Гетерогенность реакции ИСК на изменение микроокружения зависит от их синтетической активности. У здоровых крыс в островках с высоким уровнем флюоресценции инсулина повышается уровень апоптоза и снижается пролиферация  $\beta$ -клеток, в то время как морфофункциональные характеристики островков с низким уровнем флюоресценции инсулина не меняются. При аллоксановом диабете в островках с высокими показателями флюоресценции преобладает апоптоз, а в островках с низким содержанием инсулина – пролиферация  $\beta$ -клеток.

*Ключевые слова: макрофаги, инсулин-синтезирующая система, физиологические условия, аллоксановый диабет*

## INFLUENCE OF MACROPHAGES ON THE INSULIN-SYNTHESIZING SYSTEM UNDER NORMAL CONDITIONS AND IN ALLOXAN DIABETES

Bulavintseva T.S.<sup>a</sup>, Yushkov B.G.<sup>a</sup>, Danilova I.G.<sup>a</sup>, Abidov M.T.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Immunopathology and Preventive Medicine, Ljubljana, Slovenia

**Abstract.** Insulin-synthesizing cells (ISCs) of pancreatic gland are localized both in its islets, and in exocrine portion, as single cells or cellular agglomerates. ISCs differ in their morphological and functional characteristics, depending on characteristics of the microenvironment. Resident macrophages are also involved into formation of their microenvironment. Our purpose was to assess the effect of functional macrophages upon the insulin-synthesizing system (pancreatic islets, cell agglomerates, and separately lying insulin-synthesizing cells) under normal conditions and in alloxan diabetes.

Alloxan diabetes was induced in mature male Wistar rats by intraperitoneal injection of alloxan (30 mg/100 g). Functional activity of macrophages was modeled with anti-inflammatory drug aminophthalhydrazide (AMP). Contents of insulin, glucose, and glycosylated hemoglobin were measured in blood of experimental animals. The levels of  $IL-1\alpha$ ,  $TNF\alpha$  and  $IFN\gamma$  were determined in pancreatic homogenate. The number of macrophages was counted in histological preparations from the insular and exocrine parts of the organ, as well as the number of pancreatic islets, agglomerates, and single ISCs. The amounts of proliferating cells ( $insulin^+Ki-67^+$ ), apoptotic forms ( $TUNEL^+insulin^+$ ), and insulin content of ISCs at different sites (according to their fluorescence intensity) were determined. All pancreatic islets were divided into 3 types, according to intensity of insulin fluorescence, i.e., islets with high, median and low levels of fluorescence.

In healthy rats, immunomodulation reduced total level of  $IL-1\alpha$  in pancreatic parenchyma, without changing the overall parameters of carbohydrate metabolism. In the exocrine part of pancreas, the content of single ISCs in ductal epithelium was increased. Likewise, proliferation of the ISC agglomerates became higher. The intensity of  $\beta$ -cell apoptosis increased in pancreatic islets. The proportion of islets with high-level insulin fluorescence was decreased, along with lower density of macrophages and proliferation rates of  $\beta$ -cells, and higher apoptosis rates, than in intact animals. We have also revealed there an increased ratio of cells with average insulin levels. In the islets with low insulin content, immunomodulation did not cause morphological changes. Administration of AMP in alloxan diabetes contributes to a significantly decreased concentration of  $IFN\gamma$  in pancreatic tissues, stabilizes  $IL-1\alpha$  content, along with reduced apoptosis of ISCs and macrophage

infiltration in all parts of the gland. In the ductal epithelium, a large number of single ISCs with high synthetic activity was observed, with retained number of agglomerates and their increased cellularity. The number of dividing  $\beta$ -cells is increased in pancreatic islets.

Modulation of the functional activity of pancreatic macrophages under physiological conditions provides a multidirectional effect on the insulin-synthesizing cells, depending on their localization. In exocrine part of the organ, where M2 macrophages are located, we have observed activated differentiation and proliferation of ISC precursors. Meanwhile, in the islets where M1 macrophages are present, apoptosis of  $\beta$ -cells was enhanced. In alloxan diabetes, immunomodulation was associated with reduced destruction of insulinocytes, along with high intensity of their proliferation. Heterogenous response of ISCs to the changes in the microenvironment depends on their synthetic activity. In healthy rats, the islets with high level of insulin fluorescence, the level of apoptosis is increased, and  $\beta$ -cell proliferation is reduced, while the morphological and functional characteristics of islets with low-level insulin fluorescence did not change. In alloxan diabetes, apoptosis prevailed in islets with high fluorescence values, whereas  $\beta$ -cell proliferation predominated in the islets with low insulin contents.

*Keywords: macrophages, insulin-synthesizing system, physiological conditions, alloxan diabetes*

Работа выполнена в рамках бюджетной темы № 122020900136-4 ИИФ УрО РАН.

Данная исследовательская работа проведена на базе Центра коллективного пользования Института иммунологии и физиологии УрО РАН в рамках Государственного задания № 122020900136-4.

## Введение

Инсулин-синтезирующие клетки (ИСК) поджелудочной железы характеризуются выраженной гетерогенностью своих морфофункциональных характеристик. Основная масса ИСК – это  $\beta$ -клетки панкреатических островков, осуществляющих регуляцию углеводного обмена. И около 2% диффузно распределено в экзокринной части органа в виде одиночных ИСК в составе ацинарного или протокового эпителия и их агломератов [9]. Морфология вне островковых ИСК определяется местом, в котором они локализованы (ацинарный и/или протоковый эпителий). Считается, что агломераты ИСК представляют собой один из этапов эмбрионального формирования островков [32] из клеток-предшественников [18]. Во взрослом организме вне островковые ИСК также являются источником регенерации  $\beta$ -клеток в условиях дефицита ИСК и/или инсулина, как в физиологических условиях (беременность, ожирение), так и при патологии [18]. В то же время они осуществляют паракринную регуляцию экзокринной функции органа, секретируя инсулин в межклеточное пространство и протоки [6], а также участвуют в созревании секретированного  $\beta$ -клетками инсулина выделяя зимоген в кровоток [7].

Помимо своей морфофункциональной гетерогенности ИСК обладают различной чувствительностью к повреждающим факторам, что обусловлено особенностями их микроокружения. В формировании, которого в числе прочего, участвуют резидентные макрофаги. Регулируя тка-

невый гомеостаз, они участвуют в координации эмбрионального развития [34], функционирования и регенерации / репарации инсулин-синтезирующей системы поджелудочной железы [16].

В физиологических условиях резидентные макрофаги, неоднородно распределенные в паренхиме поджелудочной железы, представляют собой долгоживущий самоподдерживающийся тип клеток, различающихся спектром функциональной активации в зависимости от их локализации. Большая часть резидентных макрофагов поджелудочной железы расположена в периодуктальной области и в базальной мемbrane ацинусов. Они демонстрируют M2-профиль активации, экспрессируя IL-10 [12, 13].

Макрофаги островков Лангерганса характеризуются M1 фенотипом, экспрессируя IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$  и TNF $\alpha$  и определяются в небольшом количестве в тесном контакте с  $\beta$ -клетками и кровеносными сосудами [12]. Это способствует фагоцитозу секреторных гранул  $\beta$ -клеток и их антигенной презентации Т-лимфоцитам [13, 35]. Вместе с этим макрофаги участвуют в контроле уровня нутриентов в крови, (в постпрандимальный период) и, секретируя IL-1 $\beta$  в ответ на повышение уровня глюкозы, могут стимулировать продукцию инсулина [15, 19].

В условиях развития сахарного диабета мононуклеарные фагоциты первыми активно инфильтрируют паренхиму поджелудочной железы [4, 14] и рассматриваются в качестве регуляторов аутоиммунной деструкции  $\beta$ -клеток [39]. В качестве хемоаттрактантов для макрофагов могут выступать белки стресса (например, кальгранулин (S100A8)) на поверхности мембраны  $\beta$ -клеток и IL-1 $\alpha$  секретируемый последними в межклеточное пространство [22]. Более того, под действием этих белков стресса происходит активация синтеза провоспалительных цитокинов (IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ ) инфильтрирующими макрофагами [30, 37], которые, наряду с деструкцией  $\beta$ -клеток, угнетают синтез и секрецию инсулина [22].

В то же время, активируя дифференцировку регуляторных Th2-лимфоцитов, макрофаги способны останавливать патологическую аутоиммунную реакцию [29]. А секретируемые ими противовоспалительные цитокины и ростовые факторы (IL-10, EGF, IGF и TGF) играют ключевую роль в стимуляции репаративной регенерации, растворении фибрина и ангиогенезе [36]. Существуют экспериментальные данные, подтверждающие, что альтернативно активированные макрофаги могут предотвращать деструкцию и стимулировать пролиферацию  $\beta$ -клеток в условиях сахарного диабета и тем самым восстанавливать регуляцию углеводного обмена и предотвращать развитие осложнений [36].

В настоящее время известно много исследований, посвященных роли макрофагов в регуляции развития, функции, патологии и регенерации островкового аппарата. Однако практически отсутствуют данные о том, как макрофаги, создавая специфическое микроокружение, влияют на функцию и взаимодействие ИСК различной локализации в поджелудочной железе в физиологических условиях и при развитии сахарного диабета.

**Цель исследования** — оценить влияние функциональной активности макрофагов на инсулин-синтезирующую систему (панкреатический островок, агломераты и отдельно лежащие инсулин-синтезирующие клетки) в норме и в условиях аллоксанового диабета.

## Материалы и методы

Работа выполнена на 35 крысах самцах «Вистар» в возрасте 3 месяца. Исследование проведено в соответствии с этическими нормами, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Директиве 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. На проведение исследования получено разрешение этического комитета ИИФ УрО РАН (протокол № 01/21 от 01.12.2021).

Моделирование аллоксанового диабета осуществляли путем трехкратного внутрибрюшинного введения аллоксана через день натощак в общей дозе 30 мг/100 г веса [5].

Для исследования влияния изменения секреторной активности макрофагов на морфофункциональные характеристики ИСК различной локализации использовали препарат натриевой соли 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-диона (АФГ). АФГ снижает секрецию клетками мононцитарно-макрофагального ряда провоспалительных цитокинов и активных форм радикалов [1, 23], а также повышает продукцию противовоспалительных факторов [28]. АФГ животным вводили внутримышечно в дозировке 2 мг/кг веса в

течение 30 дней по схеме, рекомендованной производителем: 5 дней каждый день, 5 дней через день и 5 дней через два дня.

Экспериментальные животные были разделены на 5 групп по 7 штук в каждой: 1 — интактные животные, 2 — здоровые животные с введением АФГ по схеме в течение 30 суток (АФГ 30 с.), 3 — животные на 30-е сутки после введения аллоксана (Ал 30 с.), 4 — животные на 60-е сутки после введения аллоксана (Ал 60 с.), 5 — животные, которым на 30-е сутки после введения аллоксана проводили инъекции АМФ по схеме в течение 30 суток (Ал 30 с. + АФГ).

Выведение животных из эксперимента на 30-е и 60-е сутки проведено натощак передозировкой золетила (15 мг/кг), предварительно взяв кровь из хвостовой вены.

### Биохимические исследования

В периферической крови определяли концентрацию глюкозы (Novogluk-R; VektorBest, Россия) и относительное количество гликозилированного гемоглобина (Diabetes-test; Fosfosorb OJSC, Россия).

**Иммуноферментный анализ** осуществляли для определения концентрации инсулина (Insulin ELISA, Mercodia AB, Швейцария) в периферической крови крыс. Содержание провоспалительных цитокинов (IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) в паренхиме поджелудочной железы оценивали путем проведения иммуноферментного анализа ее гомогената (Thermo Fisher, США). Подготовка гомогената ткани включала промывку ледяным фосфатно-солевым буфером (рН = 7,4) и гомогенизацию с помощью системы дезагрегации тканей (BD, США) [10].

### Иммуногистохимическое окрашивание

Образцы ткани поджелудочной железы фиксировали в 10% забуференном формальдегиде, далее осуществляли стандартную подготовку образцов на автоматическом процессоре Leica EG 1160 с последующей заливкой в парафин.

Пролиферацию ИСК выявляли путем двойного непрямого последовательного иммунофлуоресцентного окрашивания [24] с использованием первичных антител к инсулину (Millipore, Германия) и маркеру пролиферации Ki-67 (BD, США). В качестве вторичных были использованы антитела, коньюгированные с Texas Red (Abcam, США) для визуализации Ki-67 и с Alexa Flore 488 (Abcam, США) для визуализации инсулина. Контрастное окрашивание ядер проводили красителем NucRed Dead 647 (Life Tec, Германия). Оценку апоптоза ИСК осуществляли путем выявления фрагментации ДНК методом TUNEL (ThermoFisher, США) с последующим иммунофлуоресцентным окрашиванием инсулина (Millipore, Германия) по выше описанному протоколу.

Макрофаги визуализировали также в ходе двойного непрямого последовательного имму-

нофлуоресцентного окрашивания [24], используя антитела к пан-макрофагальному антигену CD68 (BD, США) и инсулину (Millipore, Германия), вторичные антитела были конъюгированы с Texas Red (Abcam, США) и Alexa Flore 488 (Abcam, США) соответственно.

Негативный контроль окрашивания производили на аналогичных срезах поджелудочной железы по соответствующим протоколам, исключая первичные антитела [24].

#### Морфологическое исследование

На гистологических препаратах в 1  $\text{мм}^2$  паренхимы поджелудочной железы определяли количество ( $\text{N}/\text{мм}^2$ ) панкреатических островков, агломератов и отдельно лежащих инсулин-синтезирующих клеток в составе ацинарного и протокового эпителия, а также их общее количество. В качестве агломератов инсулин-синтезирующих клеток (ИСК) рассматривали скопления от 2 до 5 клеток, не окруженные капсулой из базальной мембранны [3, 9]. А также общее содержание макрофагов и их количественное распределение в панкреатических островках, ацинарной и периодуктальной частях поджелудочной железы.

Морфологическое исследование отдельных инсулин-синтезирующих структур включало подсчет количества ИСК в панкреатических островках и агломератах ( $1/\text{мм}^2$  структуры), относительного количества (в процентах от общего их количества, %) пролиферирующих ( $\text{insulin}^+\text{Ki-67}^+$ ) и вступивших в апоптоз ( $\text{TUNEL}^+\text{insulin}^+$ ) ИСК различной локализации.

Функциональную активность ИСК оценивали по интенсивности флюоресценции инсулина-

позитивной области ИСК [17]. В зависимости от интенсивности флюоресценции инсулина все ПО были разделены на три типа: I тип – ПО с высоким содержанием инсулина (интенсивность флюоресценции инсулина от 41 усл. ед.); II тип – ПО со средним содержанием инсулина (интенсивность флюоресценции инсулина от 21 до 40 усл. ед.); III тип – ПО с низким содержанием инсулина (интенсивность флюоресценции до 20 усл. ед.).

Визуализацию изображения осуществляли на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (CARL ZEISS, Германия), а морфометрию с помощью программного обеспечения ZEN2010.

#### Статистический анализ

Полученные данные анализировали с помощью программы STATISTICA 10. Данные представлены в виде среднего арифметического и ошибки среднего. Поскольку численность выборки менее 10 достоверность различий между группами оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни (U).

## Результаты

#### Модуляция функциональной активности макрофагов в физиологических условиях

Введение АФГ интактным крысам не приводит к изменению биохимических показателей углеводного обмена (содержание инсулина, глюкозы и гликозилированного гемоглобина (Нb Ac1) в периферической крови (рис. 1).

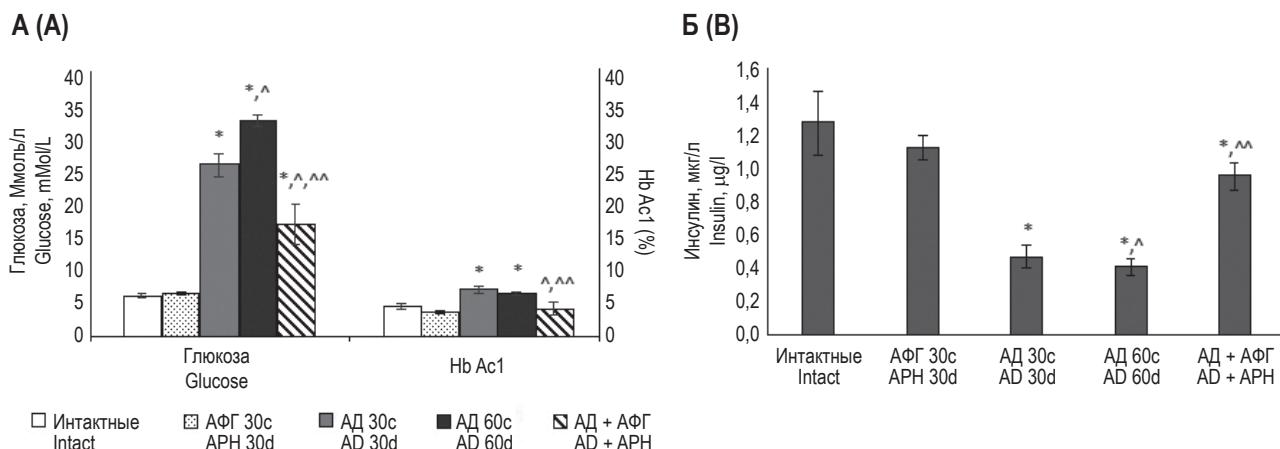


Рисунок 1. Биохимические показатели периферической крови экспериментальных животных. А – уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина (Нb Ac1); Б – концентрация инсулина

Примечание. Нb Ac1 – гликозилированный гемоглобин; \*, достоверные отличия от группы интактных животных ( $p \leq 0,05$ );

^ – достоверные отличия от группы животных с длительностью аллоксанового диабета 30 суток ( $\beta \leq 0,05$ ); ^ – достоверные отличия от группы животных с длительностью аллоксанового диабета 60 суток ( $p \leq 0,05$ ).

Figure 1. Biochemical parameters of peripheral blood of experimental animals. A, the level of glucose and glycosylated hemoglobin (Hb Ac1); B, the concentration of insulin

Note. Hb Ac1, glycated hemoglobin; \*, significant differences from the group of intact animals ( $p \leq 0.05$ ); ^, significant differences from the group of animals with the duration of alloxan diabetes 30 days ( $p \leq 0.05$ ); ^, significant differences from the group of animals with the duration of alloxan diabetes 60 days ( $p \leq 0.05$ ).

Общее содержание макрофагов в паренхиме поджелудочной железы не меняется (табл. 1), однако снижается концентрация IL-1 $\alpha$  в ее ткани относительно интактных животных (табл. 2).

Согласно морфологическим исследованиям на фоне неизменного общего количества инсулин-синтезирующих структур, под влиянием АФГ отмечается значительное увеличение количества одиночных ИСК протокового эпителия

(табл. 3). При этом уровень их пролиферации и апоптоза (рис. 2) соответствует норме. Содержание инсулина в данном типе клеток повышается (табл. 5). Характеристика одиночных ИСК ацинарного эпителия соответствует интактным животным (рис. 2, табл. 3, 5).

Количество агломератов ИСК (табл. 3) и их клеточность (табл. 4) не меняются, однако в них

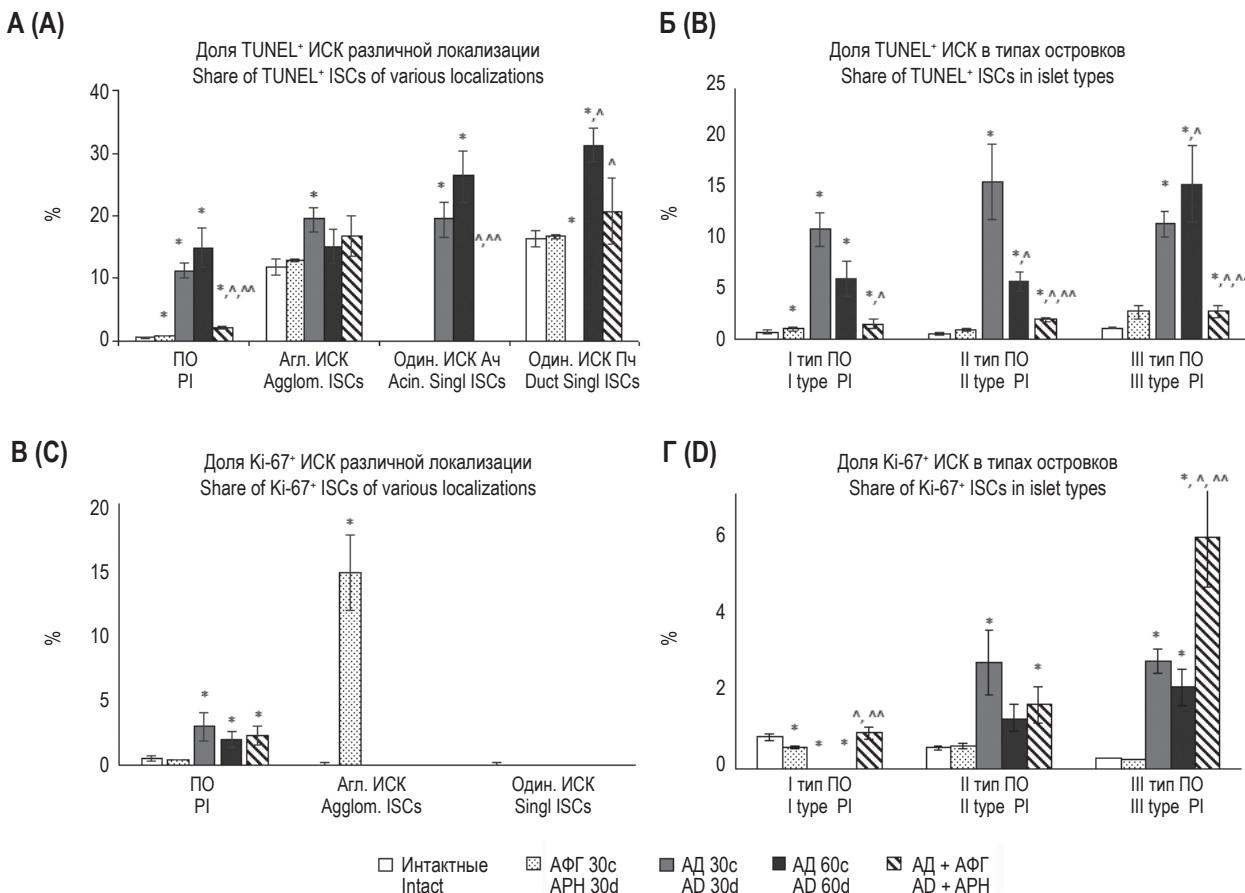


Рисунок 2. Интенсивность апоптоза (А, Б) и пролиферации (В, Г) ИСК различной локализации в поджелудочной железе. А – относительное количество апоптотирующих ИСК (TUNEL<sup>+</sup> ИСК) в структурах; Б – относительное количество апоптотирующих ИСК (TUNEL<sup>+</sup> ИСК) в островках с различным уровнем флуоресценции инсулин-позитивной области; В – относительное количество пролиферирующих ИСК (Ki-67<sup>+</sup> ИСК) в структурах; Г – относительное количество пролиферирующих ИСК (Ki-67<sup>+</sup> ИСК) в островках с различным уровнем флуоресценции инсулин-позитивной области

Примечание. ПО – панкреатический островок; I тип ПО – панкреатический островок с высоким уровнем флуоресценции инсулин позитивной области; II тип ПО – панкреатический островок со средним уровнем флуоресценции инсулин позитивной области; III тип ПО – панкреатический островок с низким уровнем флуоресценции инсулин позитивной области; \* – достоверные отличия от группы интактных животных ( $p \leq 0,05$ ); ^ – достоверные отличия от группы животных с длительностью аллоксанового диабета 30 суток ( $p \leq 0,05$ ); ^ – достоверные отличия от группы животных с длительностью аллоксанового диабета 60 суток ( $p \leq 0,05$ ).

Figure 2. Intensity of apoptosis (A, B) and proliferation (C, D) of ISCs of different localization in the pancreas. A, relative number of apoptotic ISCs (TUNEL<sup>+</sup> ISCs) in the structures; B, relative number of apoptotic ISCs (TUNEL<sup>+</sup> ISCs) in islets with different levels of fluorescence in the insulin-positive region; C, the relative number of proliferating ISCs (Ki-67<sup>+</sup> ISCs) in the structures; D, the relative number of proliferating ISCs (Ki-67<sup>+</sup> ISCs) in islets with different levels of fluorescence in the insulin-positive region

Note. PO, pancreatic islet; Type I PO, pancreatic islet with a high level of fluorescence in the insulin-positive area; II type of PO, pancreatic islet with an average level of fluorescence in the insulin-positive region; Type III PO, pancreatic islet with a low level of fluorescence in the insulin-positive area; \*, significant differences from the group of intact animals.

увеличивается доля пролиферирующих клеток (рис. 2).

В панкреатических островках средняя плотность  $\beta$ -клеток соответствует интактным животным (табл. 4), но, повышается уровень их апоптоза (рис. 2). При этом отмечается неоднородная реакция островков с различным содержанием инсулина на введение АФГ, уменьшается доля островков I типа (с высоким содержанием инсулина), а II типа (со средним содержанием инсулина) – увеличивается, доля островков III типа (с низким содержанием инсулина) сохраняется на уровне интактных животных (табл. 6).

В островках I типа снижается содержание резидентных макрофагов (табл. 1), и на фоне сохранения плотности  $\beta$ -клеток (табл. 4) снижается их пролиферативная активность, в то время как уровень апоптоза повышается (рис. 2).

Островки II типа также содержат меньше макрофагов (табл. 1), однако на фоне сохранения интенсивности пролиферации и апоптоза  $\beta$ -клеток (рис. 2) количество последних превышает норму (табл. 4).

Островки III типа по всем исследованным показателям соответствуют интактным животным (рис. 2, табл. 1, 4).

#### Влияние иммуномодуляции на инсулин-синтезирующую систему при аллоксановом диабете

Биохимический анализ периферической крови животных, которым вводили АФГ на фоне аллоксанового диабета, свидетельствует, о повышении концентрации инсулина (хотя и не до уровня нормы), снижение уровня глюкозы и нормализации относительного количества гликозилированного гемоглобина. Тогда как у «нелеченых»

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МАКРОФАГОВ В ПАРЕНХИМЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

TABLE 1. DISTRIBUTION OF MACROPHAGES IN THE PANCREATIC PARENCHYMA

	Интактные животные Intact animals	АФГ 30 с. АРН 30 days	АД 30 с. AD 30 days	АД 60 с. AD 60 days	АД + АФГ AD + ARN
<b>Общее количество в паренхиме (N/1 мм<sup>2</sup> паренхимы) Total amount in parenchyma (N/1 mm<sup>2</sup> of parenchyma)</b>	19,8±1,4	19,4±2,8	74,6±9,4*	70,8±6,5*	18,0±3,2 <sup>▲</sup> <sup>^^</sup>
<b>Ацинарная часть (N/1 мм<sup>2</sup> паренхимы) Acinar part (N/1 mm<sup>2</sup> of parenchyma)</b>	6,9±0,8	7,1±1,0	40,6±3,9*	35,4±6,1*	5,8±1,0 <sup>▲</sup> <sup>^^</sup>
<b>Перидуктальная часть (N/1 мм<sup>2</sup> паренхимы) Periductal part (N/1 mm<sup>2</sup> parenchyma)</b>	12,4±1,0	12,0±1,9	32,5±4,8*	32,2±4,6*	12,9±0,9 <sup>▲</sup> <sup>^^</sup>
<b>ПО (N/1 мм<sup>2</sup> паренхимы) PI (N/1 mm<sup>2</sup> parenchyma)</b>	0,40±0,04	0,35±0,05	2,3±0,3*	2,1±0,3*	1,0±0,2* <sup>▲</sup> <sup>^^</sup>
<b>Содержание макрофагов в островках различных типов (N/1 мм<sup>2</sup> ПО)</b> Content of macrophages in islets of different types (N/1 mm <sup>2</sup> PI)					
<b>ПО I типа (N/1 мм<sup>2</sup> ПО) PI I type (N/1 mm<sup>2</sup> PI)</b>	25±4	12±2*	376±60*	252±54*	107±22* <sup>▲</sup> <sup>^^</sup>
<b>ПО II типа (N/1 мм<sup>2</sup> ПО) PI III type (N/1 mm<sup>2</sup> PI)</b>	29±6	11±3*	252±36*	181±29*	110±15*
<b>ПО III типа (N/1 мм<sup>2</sup> ПО) PI III type (N/1 mm<sup>2</sup> PI)</b>	36±7	29±4	161±17*	146±32*	78±7* <sup>▲</sup> <sup>^^</sup>

Примечание. \* – достоверные отличия от группы интактных животных ( $p \leq 0,05$ ); <sup>▲</sup> – достоверные отличия от группы животных с длительностью аллоксанового диабета 30 суток ( $p \leq 0,05$ ); <sup>^^</sup> – достоверные отличия от группы животных с длительностью аллоксанового диабета 60 суток ( $p \leq 0,05$ ).

Note. \*, significant differences from the group of intact animals ( $p \leq 0.05$ ); <sup>▲</sup>, significant differences from the group of animals with the duration of alloxan diabetes 30 days ( $p \leq 0.05$ ); <sup>^^</sup>, significant differences from the group of animals with the duration of alloxan diabetes 60 days ( $p \leq 0.05$ ).

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ГОМОГЕНАТЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

TABLE 2. LEVEL OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE HOMOGENATE OF THE PANCREAS

	Интактные животные Intact animals	АМФ 30 с. AMP 30 days	АД 30 с. AD 30 days	АД 60 с. AD 60 days	АД + АМФ AD + AMP
<b>IL-1<math>\alpha</math> (пг/мл) IL-1<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	466 $\pm$ 44	248 $\pm$ 52*	3325 $\pm$ 563*	5906 $\pm$ 1498*	2091 $\pm$ 64* ^^
<b>TNF<math>\alpha</math> (пг/мл) TNF<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	110 $\pm$ 15	67 $\pm$ 9	158 $\pm$ 35	1606 $\pm$ 451* ^	1820 $\pm$ 175* ^
<b>IFN<math>\gamma</math> (пг/мл) IFN<math>\gamma</math> (pg/mL)</b>	3685 $\pm$ 401	2549 $\pm$ 368	22 650 $\pm$ 3218*	10 270 $\pm$ 1557* ^	5908 $\pm$ 611* ^ ^

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

животных, отмечается уменьшение содержания инсулина и нарастание гипергликемии (рис. 1).

В паренхиме поджелудочной железы под действием АФГ отмечается нормализация общего количества макрофагов, а в панкреатических островках их плотность снижается в 2 раза относительно 30-х суток, хотя и остается выше нормы; в отличие от «не леченых» животных на 60-е сутки, где их количество остается высоким (табл. 1).

В тканях органа введение АФГ способствует снижению концентрации IFN $\gamma$  и IL-1 $\alpha$ , в то время как содержание TNF $\alpha$  не меняется относительно «не леченых» животных на 60-е сутки наблюдения (табл. 2).

Общее количество инсулин-синтезирующих структур (островков, одиночных ИСК и их агломератов) сохраняется на уровне интактных животных, в отличие от крыс без АФГ, где их со-

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩИХ СТРУКТУР В ПАРЕНХИМЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 3. QUANTITATIVE DISTRIBUTION OF INSULIN-SYNTHESIZING STRUCTURES IN THE PANCREATIC PARENCHYMA OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Количество в 1 мм <sup>2</sup> паренхимы Quantity in 1 mm <sup>2</sup> of parenchyma	Интактные животные Intact animals	АМФ 30 с. AMP 30 days	АД 30 с. AD 30 days	АД 60 с. AD 60 days	АД + АМФ AD + AMP
<b>Общее количество Total quantity</b>	3,2 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,5	2,9 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,1* ^	3,1 $\pm$ 0,4^ ^
<b>Одиночные ИСК ацинарного эпителия Single ISCs of acinar epithelium</b>	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1
<b>Одиночных ИСК протокового эпителия Solitary ISCs of ductal epithelium</b>	0,20 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,1*	0,5 $\pm$ 0,1*	0,5 $\pm$ 0,1*	0,4 $\pm$ 0,1*
<b>Агломерат ИСК Agglomerate ISK</b>	0,6 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,50 $\pm$ 0,04	0,9 $\pm$ 0,1* ^ ^
<b>Панкреатический островок Pancreatic islet</b>	2,0 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,1* ^	1,2 $\pm$ 0,1* ^ ^

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

держание уменьшается (табл. 3). Плотность распределения одиночных ИСК в ацинарном и протоковом эпителии соответствует 30-м суткам наблюдения, а содержание агломератов (табл. 3) и их клеточность увеличивается до значений здоровых животных (табл. 4). Доля апоптоза среди одиночных ИСК в ацинарном эпителии значительно снижается, а в протоковом – увеличивается до нормы (рис. 2). Однако пролиферирующие

клетки среди вне островковых ИСК не выявляются также как в норме и у животных с аллоксановым диабетом (рис. 2). Интенсивность флюоресценции инсулина во вне островковых ИСК сохраняется на уровне 30-х суток наблюдения, в отличие от животных без АМФ на 60-е сутки, где наблюдается ее снижение (табл. 5).

Под влиянием препарата АФГ, в панкреатических островках, сохраняется высокая доля про-

ТАБЛИЦА 4. ПЛОТНОСТЬ ИСК В ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКАХ И АГЛОМЕРАТАХ (N/мм<sup>2</sup> СТРУКТУРУ)

TABLE 4. ISC DENSITY IN PANCREATIC ISLETS AND AGGLOMERATES (N/mm<sup>2</sup> STRUCTURE)

	Интактные животные Intact animals	АМФ 30 с. AMP 30 days	АД 30 с. AD 30 days	АД 60 с. AD 60 days	АД + АМФ AD + AMP
<b>Агломерат ИСК</b> Agglomerate ISK	12971±359	12406±477	9170±597*	10050±662*	13207±603* ^ ^
<b>Средний панкреатический островок</b> Average pancreatic islet	6750±198	7558±394	2582±345*	1767±313* ^	4007±401* ^ ^
<b>ПО I типа</b> PI I type	6800±229	7745±695	2994±254*	2995±594*	5203±559* ^ ^
<b>ПО II типа</b> PI II type	6732±232	7928±358*	2985±163*	1964±370* ^	5208±335* ^ ^
<b>ПО III типа</b> PI III type	7511±438	7544±536	2132±155*	1799±298* ^	4978±546* ^ ^

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 5. СИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИСК РАЗЛИЧНОЙ ПОКАЛИЗАЦИИ (усл. ед.)

TABLE 5. SYNTHETIC ACTIVITY OF ISCs OF DIFFERENT LOCALIZATION (conv. units)

	Интактные животные Intact animals	АМФ 30 с. AMP 30 days	АД 30 с. AD 30 days	АД 60 с. AD 60 days	АД + АМФ AD + AMP
<b>Одиночные ИСК ацинарного эпителия</b> Single ISCs of acinar epithelium	42,3±4,3	41,7±6,1	43,0±5,7	29,8±4,6*	42,3±4,3^
<b>Одиночные ИСК протокового эпителия</b> Single ISCs of ductal epithelium	29,7±2,9	40,5±4,8*	47,0±5,0*	29,9±3,5^	41,1±2,7* ^
<b>ИСК агломерата</b> ISCs of agglomerate	38,0±4,3	39,5±4,9	48,1±2,8	31,5±4,2	42,9±4,8^
<b>β-клетки ПО</b> β cells of PI	33,7±1,7	32,8±2,1	16,2±2,7*	22,0±2,9*	47,3±5,4* ^

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 6. СООТНОШЕНИЕ ОСТРОВКОВ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ИНСУЛИНА (% ОТ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА)

TABLE 6. RATIO OF ISLETS WITH DIFFERENT LEVELS OF INSULIN (% OF THE TOTAL)

	Интактные животные Intact animals	АМФ 30 с. AMP 30 days	АД 30 с. AD 30 days	АД 60 с. AD 60 days	АД + АМФ AD + AMP
ПО I типа PI I type	36,8±2,5	19,9±3,7*	11,2±1,0*	10,8±2,9*	39,5±6,5 <sup>▲</sup> <sup>^^</sup>
ПО II типа PI II type	45,4±2,7	63,6±3,2*	49,7±2,5	43,9±5,5	38,1±4,0
ПО III типа PI III type	18,3±3,0	18,6±3,1	41,9±2,8*	44,2±6,7*	21,8±4,9 <sup>▲</sup> <sup>^^</sup>

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

лифирирующих  $\beta$ -клеток и в отличие от животных без введения АФГ на 60-е сутки, пятикратно снижается степень их деструкции относительно 30-х суток (рис. 2). Эти изменения приводят к двукратному увеличению плотности  $\beta$ -клеток (табл. 4) и предотвращают гибель островков (табл. 3).

Вместе с этим интенсивность флюоресценции инсулина в  $\beta$ -клетках увеличивается относительно не только крыс без АФГ, но и интактных животных (табл. 5).

Анализ морфофункциональных особенностей островков с различным содержанием инсулина продемонстрировал нормализацию их соотношения (табл. 6) и неоднородность реакции на введение АФГ на фоне аллоксанового диабета.

Островки I типа характеризуются снижением уровня макрофагальной инфильтрации (табл. 1) и апоптоза  $\beta$ -клеток относительно 30-х суток наблюдения, а количество Ki-67<sup>+</sup>  $\beta$ -клеток увеличивается до значений интактных животных (рис. 2). Это приводит к повышению плотности  $\beta$ -клеток относительно 30-х суток (табл. 4), в отличие от группы животных без АФГ на 60-е сутки, где на фоне отсутствия пролиферации  $\beta$ -клеток (рис. 2) значительно снижается их количество (табл. 4).

В островках II типа степень макрофагальной инфильтрации (табл. 1) и доля пролиферирующих  $\beta$ -клеток сохраняется на уровне предыдущего срока наблюдения (рис. 2). А снижение интенсивности апоптоза  $\beta$ -клеток в 10 раз (рис. 2) приводит к увеличению плотности  $\beta$ -клеток относительно животных без АМФ на 60-е сутки наблюдения (табл. 4).

В панкреатических островках III типа наблюдается значительное уменьшение содержания макрофагов (табл. 1) и апоптотирующих  $\beta$ -клеток (рис. 2) относительно группы животных на 30-е

сутки. Тогда как количество  $\beta$ -клеток (табл. 4) и их пролиферация не меняется (рис. 2).

## Обсуждение

Функциональная активность  $\beta$ -клеток поджелудочной железы как в физиологических условиях, так и при патологии во многом определяется состоянием их микроокружения, одно из центральных мест в котором занимают макрофаги. Так, у здоровых крыс препарат АФГ вызывает понижение активности М1-макрофагов (снижение общего уровня IL-1 $\alpha$  в паренхиме поджелудочной железы). Это не оказывает влияния на углеводный обмен в целом, но сопровождается ремоделированием инсулин-синтезирующих структур, характер которого зависит от поляризации макрофагов в микроокружении ИСК и синтетической активности последних. В протоках и агломератах отмечается активация пролиферации и дифференцировки инсулин-синтезирующих клеток-предшественников [9]. Это приводит к увеличению количества одиночных ИСК в протоковом эпителии и повышению пролиферации среди ИСК агломератов. Данная активация клеток-предшественников, возможно определяется влиянием М2-макрофагов в их микроокружении [13], которые усиливают секрецию IL-10 и VEGF под действием препарата АМФ [28]. В панкреатических же островках, где локализованы макрофаги с М1 профилем активации, исходно синтезирующие IL-1 $\alpha$  [12], снижение концентрации данного цитокина способствует повышению интенсивности апоптоза  $\beta$ -клеток. Данный цитокин необходим также для формирования панкреатических островков в эмбриональном периоде и глюкоз-зависимой секреции инсулина во взрослом организме [11, 15].

Неоднородность реакции ИСК на иммуномодуляцию выявлена и у панкреатических островков с различным содержанием инсулина. В части островков с высоким уровнем флюoresценции инсулина на фоне снижения количества макрофагов наблюдается падение базального синтеза инсулина  $\beta$ -клетками. Более того, снижение количества IL-1 $\alpha$  приводит к усилению апоптоза  $\beta$ -клеток, снижению их пролиферативной активности при сохранении общей плотности  $\beta$ -клеток. В результате уменьшается доля островков с высоким содержанием инсулина увеличивается доля островков со средним его количеством.

В островках с низким содержанием инсулина снижение концентрации IL-1 $\alpha$  не вызывает изменений их морфологических характеристик (плотность макрофагов и  $\beta$ -клеток, интенсивность апоптоза и пролиферации последних).

Гетерогенность отдельных образований ИСК проявляется и в их чувствительности к повреждению. Так, ИСК агломератов наиболее устойчивы к действию повреждающих факторов, поскольку в условиях аллоксанового диабета уровень их апоптоза не меняется и соответствует интактным животным. Показано также, что они устойчивы и к гипоксии [22]. В то время как  $\beta$ -клетки островков и ИСК ацинарного эпителия к повреждению наиболее чувствительны.

Активация апоптоза и секретируемые поврежденными клетками белки стресса (S100A8 и IL-1 $\alpha$ ) [22] при аллоксановом диабете вызывают повышение макрофагальной инфильтрации паренхимы органа преимущественно в островковой и ацинарной частях, где и наблюдается наибольшая степень деструкции ИСК. Последняя приводит к формированию хронической гипергликемии, которая способствует активации M1-моноцитов/макрофагов [8] и повышению концентрации провоспалительных цитокинов (IL-1 $\alpha$ , IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ ) в гомогенате поджелудочной железы. Это в свою очередь вызывает нарушение микроциркуляции в органе, усиление апоптоза/некроза инсулиноцитов [25, 26] а также угнетение синтеза и секреции инсулина в ответ на глюкозу в результате ингибирования глюкокиназы [22, 33].

Введение в этих условиях противовоспалительного препарата АФГ способствует значительному снижению концентрации IFN $\gamma$  в тканях железы, обладающего выраженным цитотоксическим действием, практически до нормальных значений, стабилизирует содержание IL-1 $\alpha$ , хотя и на более высоком уровне, чем у здоровых жи-

вотных, в то время как на увеличение уровня TNF $\alpha$  введение препарата не влияет.

Известно, что эффект исследованных цитокинов зависит от их комбинации [33]. Так, IFN $\gamma$  значительно усиливает цитотокическое действие IL-1 $\alpha$  и TNF $\alpha$ . В то время как их комбинация без IFN $\gamma$  способствует ангиогенезу [2], что благотворно сказывается на reparации островков, обладающих высокой плотностью капилляров [22]. Кроме того, TNF $\alpha$  оказывает противодиабетическое действие [26], основанное на угнетении апоптоза и стимуляции пролиферации  $\beta$ -клеток [22, 31].

Эти изменения цитокинового профиля в тканях железы оказывают на ИСК сходное влияние вне зависимости от локализации. Значительно уменьшается уровень апоптоза ИСК и соответственно макрофагальной инфильтрации. При этом данные показатели в экзокринной части достигают уровня интактных животных, а в островках нет. Поскольку понижение концентрации IFN $\gamma$  оказывает стимулирующее действие на функциональную активность  $\beta$ -клеток, а также на дифференцировку и созревание клеток-предшественников инсулиноцитов [26] в протоковом эпителии сохраняется большее количество одиночных ИСК с высокой синтетической активностью, а увеличение числа агломератов ИСК (рассматриваемых в качестве начальной стадии образования островков [9]) и их клеточности может свидетельствовать о новообразовании панкреатических островков.

У островков же в условиях аллоксанового диабета сохраняется различная чувствительность к действию регуляторных факторов. В островках с низким уровнем флюoresценции инсулина на фоне уменьшения апоптоза активируется пролиферация  $\beta$ -клеток, которая значительно превышает уровень их деструкции. В островках с высоким содержанием инсулина также отмечается увеличение количества делящихся  $\beta$ -клеток, но недостаточно для компенсации апоптоза. Вместе с этим рост количества инсулиноцитов может свидетельствовать о высоком уровне их трансдифференцировки из других типов остроцитов, например  $\alpha$ -клеток [27].

## Заключение

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что в условиях сахарного диабета формируется порочный круг повреждение  $\beta$ -клеток  $\rightarrow$  повышение апоптоза  $\beta$ -клеток  $\rightarrow$  снижение продукции инсулина  $\rightarrow$  повышение уровня глюкозы в крови  $\rightarrow$  повышение апоптоза

β-клеток. Обычно в условиях клиники его разрывают, понижая уровень глюкозы заместительным введением инсулина, фармакологической стимуляцией его продукции или повышением утилизации сахара тканями. Представленные же данные свидетельствуют, что аналогично-го эффекта торможения процессов апоптоза ИСК можно добиться, воздействуя на макро-

фаги как компонент их микроокружения. Существует также второй вариант заместительной терапии – это трансплантация панкреатических островков. В этом случае необходимо учитывать присущую гетерогенность морфофункциональных характеристик инсулин-синтезирующих структур и различную их устойчивость к повреждающим факторам.

## Список литературы / References

1. Абидов М.Т. Иммунотропная активность тамерита // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2000. Приложение 3. С. 11-19. [Abidov M.T. Immunotropic activity of tamerite. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2000, app. 3, pp. 11-19. (In Russ.)]
2. Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Старикова Э.А., Фрейдлин И.С. Цитокиновый контрольangiогенеза // Медицинская иммунология, 2003. Т. 5, № 5-6. С. 493-506. [Amtchislavski E.I., Sokolov D.I., Starickova E.A., Freidlin I.S. Cytokine control of angiogenesis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2003, Vol. 5, no. 5-6, pp. 493-506. (In Russ.)]
3. Булавинцева Т.С., Юшков Б.Г., Данилова И.Г. Морфофункциональная характеристика инсулин-синтезирующих клеток различной локализации в поджелудочной железе интактных крыс // Цитология, 2022. Т. 64, № 1. С. 70-76. [Bulavintseva T.S., Yushkov B.G., Danilova I.G. Morphofunctional characteristic of insulin-producing cells of different localization in the pancreas of intact rats. *Tsitologiya = Tsitobiologiya*, 2022, Vol. 64, no. 1, pp. 70-76. (In Russ.)]
4. Булавинцева Т.С., Юшков Б.Г., Соколова К.В., Данилова И.Г. Особенности развития компенсаторных процессов в инсулинсintéзирующей системе при аллоксановом диабете // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2018. Т. 104, № 11. С. 1291-1300. [Bulavintseva T.S., Ushkov B.G., Sokolova K.V., Danilova I.G. Compensatory processes in the production system in alloxan diabetes. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*, 2018, Vol. 104, no. 11, pp. 1291-1300. (In Russ.)]
5. Медведева С.Ю., Булавинцева Т.С., Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Сенцов В.Г. Токсическое действие аллоксана в динамике развития аллоксанового диабета // Вестник уральской медицинской академической науки, 2012. № 3. С. 30-33. [Medvedeva S.Yu., Bulavintseva T.S., Danilova I.G., Goethe I.F., Sentsov V.G. Toxic effect of alloxan in the dynamics of development of alloxan diabetes. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2012, no. 3, pp. 30-33. (In Russ.)]
6. Можейко Л.А. Эндокринно-экзокринные взаимоотношения поджелудочной железы: история вопроса. Журнал Гродненского государственного медицинского университета, 2007. № 3. С. 7-11. [Mozheyko L.A. Interrelation between the exocrine and endocrine parts of the pancreas: history of the problem. *Zhurnal Grodzenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of Grodno State Medical University*, 2007, no. 3, pp. 7-11. (In Russ.)]
7. Яглов В.В., Яглова Н.В. Актуальные проблемы биологии ациноостровковых клеток поджелудочной железы // Вестник Российской АМН, 2010. № 7. С. 28-35. [Yaglov V.V., Yaglova N.V. Actual problems of biology of pancreatic acino-insular cells. *Vestnik Rossiyskoy AMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2010, no. 7, pp. 28-35. (In Russ.)]
8. Alrdahe S., Sadoun H.A., Torbica T., McKenzie E.A., Bowling F.L., Boulton A.J.M., Mace K.A. Dysregulation of macrophage development and phenotype in diabetic human macrophages can be rescued by Hoxa3 protein transduction. *PLoS One*, 2019, Vol. 14, no. 10, e0223980. doi: 10.1371/journal.pone.0223980.
9. Beamish C.A., Strutt B.J., Arany E.J., Hill D.J. Insulin-positive, Glut2-low cells present within mouse pancreas exhibit lineage plasticity and are enriched within extra-islet endocrine cell clusters. *Islets*, 2016, Vol. 8, no. 3, pp. 65-82.
10. Brammer R.D., Bramhall S.R., Eggo M.C. Endostatin expression in pancreatic tissue is modulated by elastase. *Br. J. Cancer*, 2005, no. 92, pp. 89-93.
11. Burke S.J., Batdorf H.M., Burk D.H., Martin T.M., Mendoza T., Stadler K., Alami W., Karlstad M.D., Robson M.J., Blakely R.D., Mynatt R.L., Collier J.J. Pancreatic deletion of the interleukin-1 receptor disrupts whole body glucose homeostasis and promotes islet β-cell de-differentiation. *Mol. Metab.*, 2018, Vol. 14, pp. 95-107.

12. Calderon B., Carrero J.A., Ferris S.T., Sojka D.K., Moore L., Epelman S., Murphy K.M., Yokoyama W.M., Randolph G.J., Unanue E.R. The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages. *J. Exp. Med.*, 2015, Vol. 212, no. 10, pp. 1497-1512.
13. Calderon B., Suri A., Miller M.J., Unanue E.R. Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2008, Vol. 105, no. 16, pp. 6121-6126.
14. Carrero J.A., McCarthy D.P., Ferrisa S.T., Wana X., Hua H., Zinselmeyera B.H., Vomunda A.N., Unanue E.R. Resident macrophages of pancreatic islets have a seminal role in the initiation of autoimmune diabetes of NOD mice. *PANS*, 2017, Vol. 114, no. 48, pp. E10418-E10427.
15. Collier J.J., Batdorf H.M., Martin T.M., Rohli K.E., Burk D.H., Lu D., Cooley C.R., Karlstad M.D., Jackson J.W., Sparer T.E., Zhang J., Mynatt R.L., Burke S.J. Pancreatic, but not myeloid-cell, expression of interleukin-1alpha is required for maintenance of insulin secretion and whole body glucose homeostasis. *Mol. Metab.*, 2021, Vol. 44, 101140. doi: 10.1016/j.molmet.2020.101140.
16. Cosentino C., Regazzi R. Crosstalk between macrophages and pancreatic  $\beta$ -Cells in islet development, homeostasis and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, Vol. 22, no. 4, 1765. doi: 10.3390/ijms22041765.
17. de França Carvalho C.P., Martins J.C.R., da Cunha D.A., Boschero A.C., Collares-Buzato C.B. Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islet tissue during *in vivo* maturation of rat pancreas. *Anat. Anz.*, 2006, Vol. 188, no. 3, pp. 221-234.
18. Desgraz R., Bonal C., Herrera P.L.  $\beta$ -cell regeneration: the pancreatic intrinsic faculty. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2011, Vol. 22, no. 1, pp. 34-43.
19. Dror E., Dalmas E., Meier D.T., Wuest S., Thévenet J., Thienel C., Timper K., Nordmann T.M., Traub S., Schulze F., Item F., Vallois D., Pattou F., Kerr-Conte J., Lavallard V., Berney T., Thorens B., Konrad D., Böni-Schnetzler M., Donath M.Y. Postprandial macrophage-derived IL-1 $\beta$  stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 3, pp. 283-292.
20. El-Gohary Y., Sims-Lucas S., Lath N., Tulachan S., Guo P., Xiao X., Welsh C., Paredes J., Wiersch J., Prasadan K., Shiota C., Gittes G.K. Three-dimensional analysis of the islet vasculature. *Anatom. Record.*, 2012, Vol. 295, no. 9, pp. 1473-1481.
21. Gaur U., Aggarwal B.B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, Vol. 66, pp. 1403-1408.
22. Inoue H., Shirakawa J., Togashi Y., Tajima K., Okuyama T., Kyohara M., Tanaka Y., Orime K., Saisho Y., Yamada T., Shibue K., Kulkarni R.N., Terauchi Y. Signaling between pancreatic  $\beta$  cells and macrophages via S100 calcium-binding protein A8 exacerbates  $\beta$ -cell apoptosis and islet inflammation. *J. Biol. Chem.*, 2018, Vol. 293, no. 16, pp. 5934-5946.
23. Jukić T., Abidov M., Ihan A. A tetrahydrophthalazine derivative "sodium nucleinate" exerts a potent suppressive effect upon LPS-stimulated mononuclear cells *in vitro* and *in vivo*. *Coll. Antropol.*, 2011, Vol. 35, no. 4, pp. 1219-1223.
24. Kumar G.L., Rudbeck L. Education guide. Immunohistochemical (IHC) staining methods. California: Dako North, 2009. 218 p.
25. Kumar P., Swain M.M., Pal A. Hyperglycemia-induced inflammation caused down-regulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in murine macrophages is mediated by oxidative-nitrosative stress-dependent pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2016, Vol. 73, pp. 82-98.
26. Lu J., Liu J., Li L., Lan Y., Liang Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clin. Transl. Immunol.*, 2020, Vol. 9, no. 3, e1122. doi: 10.1002/cti2.1122.
27. Lu J., Jaafer R., Bonnivion R., Bertolino P., Zhang C.-X. Transdifferentiation of pancreatic  $\alpha$ -cells into insulinsecreting cells: From experimental models to underlying mechanisms. *World J. Diabetes*, 2014, Vol. 5, no. 6, pp. 847-853.
28. Lungu G., Kuang X., Stoica G., Wong P.K. Monosodium luminol upregulates the expression of Bcl-2 and VEGF in retrovirus-infected mice through downregulation of corresponding miRNAs. *Acta Virol.*, 2010, Vol. 54, no. 1, pp. 27-32.
29. Luo X., Tarbell K.V., Yang H., Pothoven K., Bailey S.L., Ding R., Steinman R.M., Suthanthiran M. Dendritic cells with TGF- $\beta$ 1 differentiate naïve CD4 $^+$ CD25 $^+$ T-cells into islet-protective Foxp3 $^+$  regulatory T-cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 8, pp. 2821-2826.
30. Maedler K., Sergeev P., Ris F., Oberholzer J., Joller-Jemelka H.I., Spinas G.A., Kaiser N., Halban P.A., Donath M.Y. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 110, no. 6, pp. 851-860.

31. Malka D., Vasseur S., Bödeker H., Ortiz E.M., Dusetti N.J., Verrando P., Dagorn J.C., Iovanna J.L. Tumor necrosis factor alpha triggers antiapoptotic mechanisms in rat pancreatic cells through pancreatitis-associated protein I activation. *Gastroenterology*, 2000, Vol. 119, no. 3, pp. 816-828.
32. Merkwitz C., Blaschuk O.W., Schulz A., Lochhead P., Meister J., Ehrlich A., Ricken A.M. The ductal origin of structural and functional heterogeneity between pancreatic islets. *Prog. Histochem. Cytochem.*, 2013, Vol. 48, pp. 103-140
33. Thomas H.E., Darwiche R., Corbett J.A., Kay T.W. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. *Diabetes*, 2002, Vol. 51, no. 2, pp. 311-316.
34. van Gassen N., Staels W., van Overmeire E., de Groef S., Sojoodi M., Heremans Y., Leuckx G., van de Casteele M., van Ginderachter J.A., Heimberg H., de Leu N. Concise review: macrophages: versatile gatekeepers during pancreatic  $\beta$ -cell development, injury, and regeneration. *Stem Cells Transl. Med.*, 2015, Vol. 4, no. 6, pp. 555-563.
35. Vomund A.N., Zinselmeyer B.H., Hughes J., Calderon B., Valderrama C., Ferris S.T., Wan X., Kanekura K., Carrero J.A., Urano F., Unanue E.R. Beta cells transfer vesicles containing insulin to phagocytes for presentation to T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 40, pp. E5496-5502.
36. Xiao X., Gittes G.K. Concise review: new insights into the role of macrophages in  $\beta$ -cell proliferation. *Stem Cells Transl. Med.*, 2015, Vol. 4, pp. 655-658.
37. Xiu F., Stanojcic M., Diao L., Jeschke M.G. Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells. *Int. J. Endocrinol.*, 2014, Vol. 2014, 486403. doi: 10.1155/2014/486403.

---

**Авторы:**

**Булавинцева Т.С.** – научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

**Юшков Б.Г.** – д.м.н., член-корр. РАН, заслуженный деятель науки РФ, заведующий лабораторией иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

**Данилова И.Г.** – д.б.н., заведующая лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

**Абидов М.Т.** – д.м.н., директор Института иммунопатологии и профилактической медицины, г. Любляна, Словения

**Authors:**

**Bulavintseva T.S.**, Research Associate, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Yushkov B.G.**, PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Honored Scientist of the Russian Federation, Head, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Danilova I.G.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

**Abidov M.T.**, PhD, MD (Medicine), Director, Institute of Immunopathology and Preventive Medicine, Ljubljana, Slovenia

---

Поступила 17.06.2022

Отправлена на доработку 27.06.2022

Принята к печати 04.10.2022

Received 17.06.2022

Revision received 27.06.2022

Accepted 04.10.2022

# АЛЛОГЕННЫЙ БИОМАТЕРИАЛ – ИНГИБИТОР ФИБРОЗА В ИШЕМИЧЕСКИ ПОВРЕЖДЕННОМ МИОКАРДЕ

Лебедева А.И.<sup>1</sup>, Гареев Е.М.<sup>1</sup>, Афанасьев С.А.<sup>2</sup>, Кондратьева Д.С.<sup>2</sup>,  
Муслимов С.А.<sup>1</sup>, Попов С.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский  
медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

**Резюме.** Инъекционные аллогенные децеллюляризованные биоматериалы разрабатываются как в качестве скаффолдов для доставки клеточных продуктов, так и в виде самостоятельных фармакологических средств, оказывающих воздействие на каскад тканевых реакций в период постишемического ремоделирования миокарда. Продукты биодеградации биоматериалов могут влиять на клеточные процессы и цитокиновую направленность, которая определяет стратегию заживления поврежденной ткани. В данной работе показано влияние биоматериала на экспрессию ключевых фиброгенных клеточных факторов клетками тканевого ложа и определена степень повреждения миокарда при его ишемическом повреждении в эксперименте.

Цель исследования – определение зоны рубцового перерождения миокарда и выявление ключевых фиброгенных факторов (bFGF-1, TGF $\beta$ 1, MMP-9), а также TIMP-2 (антагонист MMP-9) при острой и подострой стадиях инфаркта миокарда в условиях имплантации аллогенного диспергированного биоматериала в эксперименте.

Крысам-самцам линии «Вистар» лигировали коронарную артерию левого желудочка. Все животные были разделены на 3 группы – I опытную (n = 50), II опытную (n = 50), контрольную (n = 50). В I опытной группе лигирование артерии одновременно сопровождали интрамиокардиальным введением суспензии аллогенного диспергированного биоматериала (2 мг), во II опытной группе введение аллогенного диспергированного биоматериала осуществляли спустя 5 суток после коронароокклюзии, в контрольной группе вводили физиологический раствор. Животных выводили из опыта на 3-и, 7-е, 14-е, 30-е, 45-е сутки. Применяли общегистологические (окрашивание гематоксилином и эозином, по Маллори) и иммуногистохимические (MMP-9, TGF $\beta$ 1, bFGF-1, TIMP-2), статистические методы исследования. Проводили подсчет положительно окрашенных клеток и индекс площади рубца.

#### Адрес для переписки:

Лебедева Анна Ивановна  
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения РФ  
450075, Россия, Республика Башкортостан,  
г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1.  
Тел.: 8 (3472) 93-42-35.  
E-mail: Jeol02@mail.ru

#### Address for correspondence:

Anna I. Lebedeva  
Federal State Budgetary Education Institution  
«Bashkir State Medical University»  
67/1 R. Zorge St  
Ufa  
Republic of Bashkortostan  
450075 Russian Federation  
Phone: +7 (3472) 93-42-35.  
E-mail: Jeol02@mail.ru

#### Образец цитирования:

А.И. Лебедева, Е.М. Гареев, С.А. Афанасьев,  
Д.С. Кондратьева, С.А. Муслимов, С.В. Попов  
«Аллогенный биоматериал – ингибитор  
фиброза в ишемически поврежденном миокарде»  
// Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2.  
С. 301-308. doi: 10.15789/1563-0625-ABA-2359  
© Лебедева А.И. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

#### For citation:

A.I. Lebedeva, E.M. Gareev, S.A. Afanasiev,  
D.S. Kondratyeva, S.A. Muslimov, S.V. Popov “Allogeneic  
biomaterial: a fibrosis inhibitor in ischemic myocardial  
damage”, Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya  
Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 301-308.  
doi: 10.15789/1563-0625-ABA-2359  
© Lebedeva A.I. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-ABA-2359

Выявлено, что при применении аллогенного диспергированного биоматериала наблюдалось пятикратное снижение степени рубцового перерождения в обеих опытных группах при острой и подострой стадиях ишемического повреждения миокарда по сравнению с контрольной группой. Обнаружено значительное снижение уровня экспрессии клетками фиброгенных факторов на протяжении всего эксперимента: MMP-9, TGFb1, bFGF-1 и повышение степени активности ингибитора металло-протеиназ TIMP-2 клетками соединительной ткани.

Децеллюляризованный аллогенный биоматериал служит ингибитором фиброза, способен изменить паракринную регуляцию миокарда и способствует кардиопротекции при ремоделировании миокарда в начальных сроках после ишемического повреждения.

*Ключевые слова:* аллогенный биоматериал, миокард, ишемия, ингибитор фиброза

## ALLOGENEIC BIOMATERIAL: A FIBROSIS INHIBITOR IN ISCHEMIC MYOCARDIAL DAMAGE

**Lebedeva A.I.<sup>a</sup>, Gareev E.M.<sup>a</sup>, Afanasiev S.A.<sup>b</sup>, Kondratyeva D.S.<sup>b</sup>,  
Muslimov S.A.<sup>a</sup>, Popov S.V.<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Federal State Budgetary Education Institution «Bashkir State Medical University», Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

<sup>b</sup> Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Tomsk, Russian Federation

**Abstract.** Injectable allogeneic decellularized biomaterials are being developed both as scaffolds for delivery of cellular products and as independent pharmacological agents that affect the cascade of tissue reactions during the period of post-ischemic myocardial remodeling. Biomaterial degradation products can affect cellular processes and modulate cytokine effects, thus determining the healing strategy of damaged tissue. In this work, the influence of biomaterial on the expression of key fibrogenic factors by the cells of tissue bed was demonstrated, and the degree of damage to the myocardium during its ischemic damage was experimentally determined. The aim of our study was to determine the area of myocardial scar degeneration and detection of key fibrogenic factors (bFGF-1, TGFb1, MMP-9), as well as TIMP-2 (MMP-9 antagonist) at the acute and subacute stages of myocardial infarction after implantation of allogeneic powder-like biomaterial in an experimental model.

In the course of experiments, the left ventricular coronary artery was ligated in male Wistar rats (experimental group). All animals were divided into 3 groups: experimental group I ( $n = 50$ ), experimental group II ( $n = 50$ ), and controls ( $n = 50$ ). In experimental group I, the artery ligation was simultaneously accompanied by intramyocardial administration of powder-like biomaterial suspension (2 mg). In experimental group II, the allogeneic powder-like biomaterial was administered 5 days after coronary occlusion, and only physiological saline was administered in the control group. The animals were withdrawn from experiment on days +3, +7, +14, +30, and +45. Standard histological assessment (hematoxylin and eosin staining, according to Mallory) and immunohistochemical examination (MMP-9, TGFb1, bFGF-1, TIMP-2) were made, and statistical evaluation was performed. The cells with positive staining were counted, and the scar area index was calculated.

We have found that administration of dispersed allogeneic biomaterial was followed by a five-fold decrease in the degree of scar degeneration in both experimental groups at the acute and subacute stages of ischemic myocardial damage as compared to the control group. A significantly decreased expression of fibrogenic factors (MMP-9, TGFb1, bFGF-1) by the local cells was found, along with increased activity of metalloproteinase inhibitor (TIMP-2) in connective tissue cells.

Decellularized allogeneic powder-like biomaterial serves as a fibrosis inhibitor and promotes cardioprotection during myocardial remodeling at the initial stages after ischemic injury.

The authors do not have a conflicts of interest.

*Keywords:* biomaterial, allogeneic, myocardium, ischemia, fibrosis inhibitor

Работа выполнена в рамках государственного задания: регистрационный номер НИОКР № 056-00124-21-00.

## Введение

Инъекционные аллогенные децеллюляризованные биоматериалы разрабатываются как в качестве скаффолдов для доставки клеточных продуктов, так и в виде самостоятельных фармакологических средств, оказывающих воздействие на каскад тканевых реакций в период постишемического ремоделирования миокарда. Продукты биодеградации биоматериалов могут влиять на такие клеточные процессы, как апоптоз, ангиогенез. Они могут быть использованы для рекрутования стволовых клеток при репарации [11]. Избыточное отложение внеклеточного матрикса ограничивает нормальную функцию миокарда и возможные регенеративные способности кардиомиоцитов. Разрешение вопроса о стимулировании кардиомиогенного клеточного потенциала заключается в нивелировании фиброза. В наших предыдущих работах показаны возможности аллогенного биоматериала по привлечению и стимулированию прогениторных клеток, которые приобретают черты и характеристики кардиомиогенных [2]. Однако влияние биоматериала на экспрессию фиброгенных клеточных факторов не исследовано. К профиброгенным факторам относится довольно большой спектр цитокинов и ростовых факторов, которые оказывают непосредственное влияние на развитие фибробластического дифферона и определяют стратегию заживления поврежденной ткани.

**Целью данного исследования** явилось определение зоны рубцового перерождения миокарда и выявление ключевых фиброгенных факторов (bFGF-1, TGFb1, MMP-9), а также TIMP-2 (антагонист MMP-9) при острой и подострой фазах инфаркта миокарда (ИМ) в условиях имплантации аллогенного биоматериала.

## Материалы и методы

Исследования проведены на 150 крысах-самцах линии «Вистар» 0,18-0,20 кг, из которых были сформированы две опытные и одна контрольная группы, по 50 особей в каждой. Крысам всех групп моделировали ИМ, накладывая шов «викрил» на верхнюю треть левой коронарной артерии. Крысам I опытной группы сразу после моделировали ИМ, по границе левого желудочка, выполняли по 6 внутримиокардиальных инъекций супензии децеллюляризованного аллогенного биоматериала (ДБМ). Крысам II опытной группы введение ДБМ выполняли по той же схеме, но через 5 суток после моделирования ИМ при по-

вторной торакотомии. В качестве ДБМ использовали бесклеточный материал, изготовленный из сухожилий крыс и диспергированный до размера частиц 50-80 мкм для свободного прохождения через инъекционную иглу. Супензию ДБМ в стерильном физиологическом растворе готовили непосредственно перед применением. Во всех случаях, каждая инъекция содержала 2 мг ДБМ и по объему не превышала 10 мкл. Используемая доза и схема введения ДБМ подобраны в предварительных исследованиях [3]. Крысам контрольной группы после ИМ вместо ДБМ проводили инъекции физиологического раствора. Все манипуляции с крысами проводили под общим наркозом (раствор золетила в дозе 1 мг/кг внутримышечно). После проведенных вмешательств животных помещали в виварий и содержали со свободным доступом к корму и воде. Животных выводили из эксперимента на 3-и, 7-е, 14-е, 30-е, 45-е сутки, используя инсуфляцию паров эфира. На каждую точку исследования использовали по 10 животных. Исследования выполнялись согласно правилам лабораторной практики в Российской Федерации в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных (Strasburg, 1986). Сердца животных фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия), окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори. Иммуногистохимические исследования проводили с использованием парафиновых срезов толщиной 4-5 мкм, окрашивали на иммуногистостейнере Leica Microsystems Bond<sup>TM</sup> (Германия). Применили первичные антитела: MMP-9, TGFb1, bFGF-1, TIMP-2 (1:300) (Santa Cruz Biotechnology, США). Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra<sup>TM</sup>, Германия). Подсчет клеток производили в 20 полях зрения каждого образца при увеличении  $\times 400$ . Исследование и визуализацию препаратов анализировали с использованием светооптического микроскопа Leica DMD 108 (Германия).

Индекс площади рубца (ИПР) сердец крыс измеряли на препаратах с использованием программы ITEM (Olympus) следующим образом: отношение площади рубца к площади стенки левого желудочка умножали на 100%.

Для анализа данных использовали статистические непараметрические (ранговые) методы – однофакторный дисперсионный анализ по Краскелу–Уоллису и сравнение независимых выборок по критерию Манна–Уитни. Для пред-

ставления результатов использовали медиану ( $Me$ ), квартили ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ) или границы вариации ( $X_{\min} \div X_{\max}$ ).

## Результаты

В контрольной группе через 7–14 дней после коронароокклюзии мы наблюдали типичную картину некротически измененного миокарда с признаками колликвационного некроза, окруженного демаркационным клеточным валом, представленным макрофагами, фибробластами, лимфоцитами, нейтрофилами. При этом, васкулярный рисунок ткани был обеднен (рис. 1А, см. 3-ю стр. обложки). Спустя 30–45 суток наряду с сохраняющейся большой клеточной плотностью выявлялись признаки формирования плотного грубоволокнистого рубца с накоплением упорядоченных толстых пучков коллагеновых волокон. В этот период основу клеточного инфильтрата составляли фибробластические клетки: фибробlastы, миофибробlastы, фиброциты.

В I и во II опытных группах, для 7–14 суток, на фоне колликвационного некроза кардиомиоцитов было характерно выявление частиц ДБМ в окружении макрофагов и малодифференцированных клеток. По мере резорбции биоматериала и некротизированных кардиомиоцитов фагоцитами выявлялась рыхлая волокнистая соединительная ткань с большим количеством гемокапилляров. Также привлекались фибробlastы, лимфоциты, нейтрофилы, лаброциты в небольшом количестве (рис. 1Б, В, см. 3-ю стр. обложки). Через 30–45 суток в обеих опытных группах обнаруживались признаки формирования васкуляризированного соединительнотканно-мышечного регенерата.

На 45-е сутки, при выведении из эксперимента, у крыс контрольной группе отмечалось истончение мышечной стенки левого желудочка и формирование аневризмы на фоне развивающегося трансмурального некроза в 80% случаев. К этому сроку погибло 2 из 10 особей. Использование ДБМ привело к иным результатам. В I и во II опытной группах формирование выраженных аневризм происходило у 50% и 40% животных соответственно при условии, что случаев гибели животных не зафиксировано. На поперечных срезах сердца, четко идентифицировались границы мышечной и соединительной тканей (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки).

Так, в контрольной группе границы вариации ИПР составили 0,43–48,3%, а в I и II опытных 0–33,8% и 0–40,9% соответственно. Однако в контрольной группе  $Me = 26,5\%$  и  $Q3\% > 17,74\%$ , в то время как в I опытной группе  $Me = 5,34\%$  ( $Q75\% < 18,6\%$ ), а во II  $Me = 5,17\%$  ( $Q75\% < 22,2\%$ ). Сравнение по U-критерию Ман-

на–Уитни показало, что в контрольной группе уровень ИПР значительно выше, чем в I ( $Z = 2,17$ ,  $p < 0,04$ ) и во II ( $Z = 2,42$ ;  $p < 0,02$ ) опытных группах. Между опытными группами различия оказались статистически незначимыми ( $Z = 0,37$ ,  $p > 0,70$ ). Таким образом, медиана распределения значений ИПР в обеих опытных группах оказалась примерно пятикратно ниже, чем в контрольной (рис. 3).

При исследовании  $bFGF-1^+$  клеток через 3 суток в I опытной группе  $Me = 44$  клетки (38–55). Через 7 дней их численность значительно ( $p < 0,0001$ ) повышалась.  $Me = 61$  клетка (54–68). Однако спустя 14 дней резко возрастала межиндивидуальная вариация численности  $bFGF-1^+$  клеток –  $Me = 60$  клеток, (22–72), но прирост был статистически незначим ( $p > 0,46$ ). Через 30 суток количество  $bFGF-1^+$  клеток в I группе резко снижалось –  $Me = 11$  клеток (9–16), а на 45-й день снижалось незначительно ( $Me = 9$  клеток, 4–16), но статистически значимо ( $p < 0,03$ ). В контрольной группе число  $bFGF-1^+$  клеток было невелико  $Me = 10$  клеток (5–15) на 3-й день,  $Me = 14$  клеток (10–9) на 7-й день. Но через 14–30 дней количество  $bFGF-1^+$  клеток в контрольной группе резко возрастало –  $Me = 84$  клеток (80–109) и  $Me = 101$  клеток (67–104) соответственно. Значимое ( $p < 0,0001$ ) снижение числа  $bFGF-1^+$  клеток ( $Me = 64, 54\div96$ ) в данной группе происходило только к 45-м суткам. Т. е. в период 14–45 суток вариация числа данных клеток в I опытной группе резко снижалась, в то время как в контрольной группе в период 7–30 суток происходил резкий рост их численности и сохранение ее на высоком уровне продолжительное время (рис. 4А, см. 3-ю стр. обложки).

Численность  $TGFb-1^+$  клеток в I опытной группе значительно зависела от сроков наблюдения ( $\chi = 52,1$ ;  $p < 0,0001$ ). На 3-й день численность  $TGFb-1^+$  клеток превышала контрольную –  $Me = 40$  клетки (29–9) против  $Me = 10$  клетки (6–16). На 7-й день в I опытной группе численность клеток значительно ( $p < 0,005$ ) снижалась ( $Me = 18, 10\div47$  клеток), а в контрольной повышалась ( $Me = 64, 25\div110$  клеток). Через 14-й суток в опытной группе численность таких клеток увеличивалась незначимо ( $Me = 32, 26\div37$  клеток) ( $p > 0,07$ ), а в контрольной значительно возрастила –  $Me = 98$  клеток (82–112) ( $p < 0,003$ ). К 45-му дню численность клеток в контрольной группе снизилась ( $Me = 28, 17 \div 32$  клеток), а в I опытной группе значительно ( $p < 0,0001$ ) уменьшилась до  $Me = 5$  клеток (1–8) (рис. 4Б, см. 3-ю стр. обложки).

Тенденция к увеличению численности  $MMP-9^+$  клеток и в контрольной, и в I опытной группе в период от 3–14 суток была высоко значи-

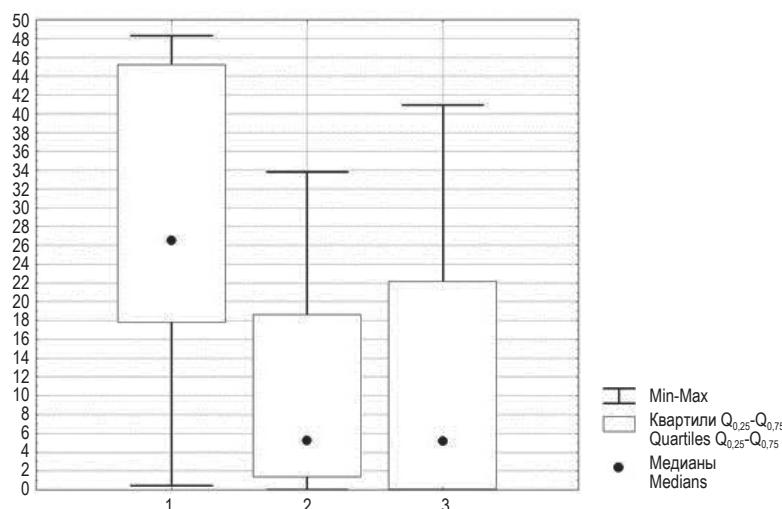


Рисунок 3. Индекс площади рубца в экспериментальных группах через 45 суток

Примечание. Ось абсцисс – группы: 1 – контрольная, 2 – I опытная, 3 – II опытная. Ось ординат – %.

Figure 3. Index of the scar area in the experimental groups after 45 days

Note. The axis of the abscissa group: 1, control; 2, I experimental; 3, II experimental. The ordinate axis is %.

ма ( $\chi = 80,2$  и  $\chi = 57,7$ ;  $p < 0,0001$ ). Количество MMP-9<sup>+</sup> клеток в контрольной группе было значимо ( $p < 0,001$ ) выше, чем в I опытной по всем срокам наблюдения, кроме 3-го ( $p > 0,26$ ) и 7-го ( $p > 0,05$ ) дней, где происходила ишемически индуцированная острая воспалительная реакция. Так, через 14 суток в контрольной группе  $Me = 13$  клеток ( $12 \div 18$ ) против  $Me = 5$  клеток ( $1 \div 15$ ) в I опытной, а в период 30 и 45 суток  $Me = 9$  клеток ( $3 \div 11$ ) и  $Me = 12$  клеток ( $10 \div 36$ ) против 3 ( $0 \div 8$ ) и 8 ( $5 \div 11$ ) клеток соответственно (рис. 4В, см. 3-ю стр. обложки).

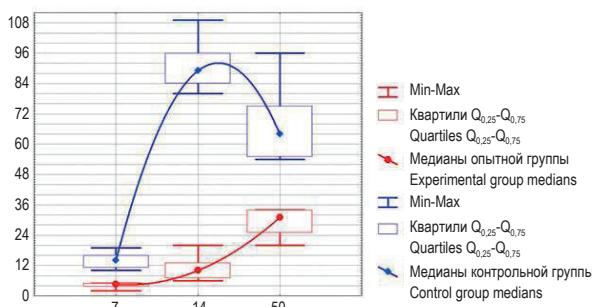
Через 3 суток в контрольной группе значения TIMP-2<sup>+</sup> клеток составило  $Me = 4$  клетки ( $0 \div 7$ ), через 7 суток 6 клеток ( $3 \div 14$ ), спустя 14 суток 13 клеток ( $1 \div 29$ ), через 30 суток 7 клеток ( $2 \div 14$ ), а на 45-е сутки  $Me = 12$  ( $7 \div 21$ ) клеток. В I опытной группе все последовательные значения в период 3-7 суток от  $Me = 4$  клетки ( $17 \div 50$ ) до  $Me = 36$  клеток ( $18 \div 54$ ) попарно не различались ( $p > 0,06$  –  $p > 23$ ) и держались кратно на высоком уровне. Через 14 суток количество TIMP-2<sup>+</sup> клеток постепенно и значимо ( $p < 0,004$ ) снижалось, достигнув на 45-е сутки  $Me = 19$  клеток ( $11 \div 31$ ), что соответствовало затуханию пластических процессов в миокарде. Таким образом, численность TIMP-2<sup>+</sup> клеток в I опытной группе оставалась выше, чем в контрольной группе на протяжении всего срока наблюдений ( $p < 0,0004$ ) (рис. 4Г, см. 3-ю стр. обложки).

Зависимость численности bFGF-1<sup>+</sup> клеток от сроков наблюдения для II опытной и для контрольной групп оказалась почти равноценной

( $\chi = 30$ ,  $p < 0,0001$  и  $\chi = 22$ ,  $p < 0,0001$ ). Через 7 суток численность bFGF-1<sup>+</sup> клеток в контрольной группе была статистически значимо выше, чем в опытной –  $Me = 14$  клеток ( $10 \div 19$ ) против  $Me = 5$  ( $2 \div 5$ ) соответственно. Через 14 суток численность bFGF-1<sup>+</sup> клеток в контрольной группе оказалась многократно выше, чем в опытной –  $Me = 90$  клеток ( $80 \div 119$ ) против  $Me = 10$  клеток ( $6 \div 20$ ). К окончанию эксперимента (50 суток) по мере затухания воспалительного процесса и начала стадии заживления численность bFGF-1<sup>+</sup> клеток в контрольной группе значимо ( $p < 0,0002$ ) снижалась до  $Me = 64$  (Limits  $58 \div 96$ ) клеток, а во II опытной повышалась ( $Z = 4,4$ ,  $p < 0,0001$ ) до  $Me = 31$  (Limits  $20 \div 35$ ), оставаясь существенно ниже, чем в контрольной (рис. 5А).

Численность TIMP-2<sup>+</sup> клеток во II опытной группе зависела от этапов наблюдения –  $\chi = 28,6$ ,  $p < 0,0001$ . Через 7 суток в опытной группе  $Me = 16$  клеток ( $3 \div 9$ ) и была значимо ( $p < 0,001$ ) выше, чем в контрольной группе ( $Me = 6$  клеток,  $3 \div 14$ ). На 14-й день численность клеток TIMP-2<sup>+</sup> во II опытной группе резко и значимо ( $p < 0,0001$ ) возрастала ( $Me = 50$  клеток,  $19 \div 76$ ,  $Q3 > 43$ ), а в контрольной рост был менее существенным ( $Me = 13$ ,  $10 \div 29$ ) и общий уровень оставался значимо ( $p < 0,0001$ ) ниже. Спустя 50 суток численность TIMP-2<sup>+</sup> клеток в опытной группе значимо ( $p < 0,004$ ) снижалась ( $Me = 34$  клеток,  $27 \div 52$ ), а в контрольной изменялась незначительно ( $Me = 10$  клеток,  $7 \div 21$ ) и незначимо ( $p > 0,38$ ) отличалась от 14-го дня наблюдения

А (А)



Б (Б)

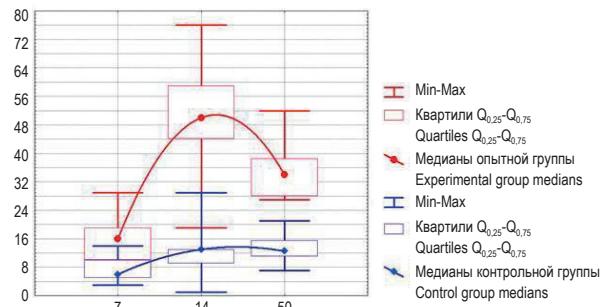


Рисунок 5. Выявление фиброгенных факторов в миокарде в подостром периоде

Примечание. А – bFGF-1<sup>+</sup> клетки в контрольной группе (синий график) и во II опытной группе (красный график). Б – численность TIMP-2<sup>+</sup> клеток в контрольной группе (синий график) и во II опытной группе (красный график). По оси абсцисс – дни, по оси ординат – количество.

Figure 5. Detection of fibrogenic factors in the myocardium in the subacute period

Note. (A) bFGF-1<sup>+</sup> cells in the control group (blue graph) and in the experimental group II (red graph). (B) the number of TIMP-2<sup>+</sup> cells in the control group (blue graph) and in the experimental group II (red graph). On the abscissa axis – days, on the ordinate axis – quantity.

(рис. 5Б), оставаясь существенно ниже, чем в опытной.

Представленные результаты позволяют считать, что использование ДБМ в острой и подострой фазах инфаркта миокарда способствовало ингибированию экспрессии клетками фиброгенных факторов MMP-9, TGF $\beta$ 1, bFGF-1, и увеличению уровня ингибитора металлопротеиназ – TIMP-2.

## Обсуждение

Растущее число эмпирических доказательств того, что инъекционные гидрогели могут стабилизировать ИМ, не помогло прояснить основной механизм эффекта. С одной стороны, биоматериал может действовать как пассивный наполнитель для укрепления сердечной стенки и изменения механики. В этом сценарии предполагается, что механические свойства гидрогеля играют ключевую роль в модуляции полезных эффектов [14]. С другой стороны, биоматериал может радикально изменить сердечное ремоделирование, главным образом, за счет биоактивной роли, связанной с составом материала, его биодеградацией *in situ*.

В составе ДБМ превалируют коллаген, протеогликаны, гликозаминогликаны [1]. Известно, что коллаген, являясь средством заместительной терапии, ингибирует фибробластическую деятельность по типу обратной связи и участвует в инактивации фибробластов посредством контактного ингибирования или через цитокин-опосредованные сигнальные пути, как это происходит при инволюции рубца [5]. А такие гликозаминогликаны как гиалуроновая кислота,

хондроитинсульфаты, дерматансульфат и гепарансульфат, высвобождающиеся при биодеградации ДБМ, достоверно ингибируют синтез ДНК в фибробластических клетках нормальных тканей и опухолевых [4]. Следовательно, экзогенный экстраклеточный интерфейс становится регулятором клеточно-стромальных взаимодействий в ткани через влияние компонентов его биодеградации.

Исследование показывает, что в I опытной группе в период 3-7 суток bFGF-1<sup>+</sup> и TGF- $\beta$ <sup>+</sup> клетки значимо превышали значения контрольной, что свидетельствовало о наступлении более ранней пролиферативной стадии воспаления и макрофагально-фибробластического влияния, усиления ангиогенеза, вызванного воздействием продуктов биодеградации ДБМ. Выраженная экспрессия bFGF-1 и TGF $\beta$  является антагонистом провоспалительного спектра цитокинов и подавляет цепь цитотоксических реакций [8]. В последующем (14-45 суток) экспрессия цитокинов значительно снижалась по мере затухания воспалительных процессов в миокарде и заживления миокарда. А в контрольной группе динамика экспрессии напротив увеличивалась, что соответствовало стремительному накоплению коллагеновых волокон и формированию плотного волокнистого рубца. Во II опытной группе, где имплантация ДБМ происходила в отсроченный период, в зоне с развивающимся колликовационным некрозом количество FGFb1 были статистически ниже значений контрольной группы. Семейство FGF и TGF- $\beta$ , с одной стороны являясь мощным индуктором пролиферации и выживания фибробластов, синтеза коллагена, заживления, рубцевания и т. д., может способствовать патоло-

гическому ремоделированию сердца и развитию фиброза [7, 12]. С другой стороны, они являются кардиопротектором, стимулируют неоваскуляризацию. Механическая активность может индуцировать высвобождение FGF2 из сердечных миоцитов, вызывая паракринную гипертрофическую реакцию и сдерживать апоптоз, тем самым повышать сердечную функцию [6, 9].

Роль металлопротеиназ заключается не только в деградации межклеточного матрикса, но и инициации синтеза избыточного коллагена в отдаленный период [10]. В начальные сроки численность MMP-9<sup>+</sup> клеток в опытных и контрольной группах практически не отличалась в реактивной зоне повреждения. В дальнейшем (14-45 суток) по мере деградации ДБМ, происходили изменения характера клеточной инфильтрации и смена воспалительных фаз с альтерации на пролиферацию, что способствовало изменению динамики экспрессии MMP-9<sup>+</sup>. Численность клеток в контрольной группе значительно превышала количество данных клеток обеих опытных групп. На гомеостаз миокардиального экстрацеллюлярного матрикса влияет баланс металлопротеиназ (MMP-9) и их ингибиторов (TIMP-2), т. к. они играют синергетическую роль в миокарде [15]. TIMP-2 не только коррелирует с ремоделирова-

нием матрикса, но и участвует в подавлении воспаления, оказывая гистопротекторный эффект в поврежденном миокарде, оказывает антиапоптотический эффект, подавляя функцию матриксных металлопротеиназ [13].

## Заключение

Обнаружено пятикратное снижение степени рубцового перерождения, по сравнению с контрольной группой, что сопряжено с дефицитом таких факторов как FGF-b<sup>+</sup>, TGF- $\beta$ <sup>+</sup>, MMP-9<sup>+</sup> и повышения уровня TIMP-2 как в остром, так и в подостром периодах экспериментального ИМ, индуцированного интрамиокардиальным введением ДБМ. Предстоит проделать значительную работу по выяснению механизмов действия аллогенного биоматериала в диспергированной модификации в качестве инъекционного геля и оптимизации свойств: механики, профилей деградации, клеточных взаимоотношений, степени пролонгирования действия биоматериала, в том числе с использованием моделей крупных животных в клинически значимых сценариях. Интерес к этому терапевтическому подходу высок в связи с возможностью разработки чрескожных методов лечения для ограничения ремоделирования миокарда.

## Список литературы / References

1. Лебедева А.И. Регуляция паренхиматозно-стромальных взаимоотношений при коррекции дефектов скелетной мышцы аллогенным биоматериалом // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология, 2014. № 1. С. 51-56. [Lebedeva A.I. Allogeneic biomaterial regulation of parenchyma-stroma relationships in the correction of skeletal muscle tissue. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya dermatokosmetologiya = Experimental and Clinical Dermatocosmetology*, 2014, no. 1, pp. 51-56. (In Russ.)]
2. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М., Попов С.В., Афанасьев С.А. Стимуляция аутологичных прогениторных и коммитированных клеток в ишемически поврежденном миокарде // Российский кардиологический журнал, 2018. № 11. С. 123-129. [Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Popov S.V., Afanasiev S.A. Stimulation of autologous progenitorial and committed cells in ischemically damaged myocardium. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*, 2018, no. 11, pp. 123-129. (In Russ.)]
3. Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М., Попов С.В., Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С. Экспериментальный кардиомиогенез в условиях применения различных доз аллогенного биоматериала // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2018. Т. 165, № 6. С. 753-756. [Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Gareev E.M., Popov S.V., Afanasiev S.A., Kondratieva D.S. Experimental cardiomyogenesis under conditions of administration of different doses of the allogeneic biomaterial. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2018, Vol. 165, no 6, pp. 790-792. (In Russ.)]
4. Мулдашев Э.Р., Уимен Т.Дж., Курчатова Н.Н. Влияние экстракта трансплантата для пластики века серии Alloplant<sup>TM</sup> на синтез ДНК в культуре клеток // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1994. Т. 1. С. 75-79. [Muldashev E.R., Wyman T.J., Kurchatova N.N. Effect of Alloplant<sup>TM</sup> series graft extract for eyelid plasty on DNA synthesis in cell culture. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1994, Vol. 1, pp. 75-79. (In Russ.)]
5. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. М.: Медицина, 1981. 312 с. [Serov V.V., Shekhter A.B. Connective tissue]. Moscow: Meditsina, 1981. 312 p.
6. Clarke M.S., Caldwell R.W., Chiao H., Miyake K., McNeil P.L. Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart. *Circ. Res.*, 1995, Vol. 76, no. 6, pp. 927-934.
7. Faul C. Cardiac actions of fibroblast growth factor 23. *Bone*, 2017, Vol. 100, pp. 69-79.

8. Joki Y., Ohashi K., Yuasa D., Shibata R., Ito M., Matsuo K., Kambara T., Uemura Y., Hayakawa S., Hiramatsu-Ito M., Kanemura N., Ogawa H., Daida H., Murohara T., Ouchi N. FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015, Vol. 459, no. 1, pp. 124-130.
9. Kaye D., Pimental D., Prasad S., Mäki T., Berger H.J., McNeil P.L., Smith T.W., Kelly R.A. Role of transiently altered sarcolemmal membrane permeability and basic fibroblast growth factor release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocytes to increased mechanical activity *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 1996, Vol. 97, no. 2, pp. 281-291.
10. LeBert D.C., Squirrell J.M., Rindy J., Broadbridge E., Lui Y., Zakrzewska A., Eliceiri K.W., Meijer A.H., Huttenlocher A. Matrix metalloproteinase 9 modulates collagen matrices and wound repair. *Development*, 2015, Vol. 142, no. 12, pp. 2136-2146.
11. Liao H., Zhou G.-Q. Development and progress of engineering of skeletal muscle tissue. *Tissue Eng. Part B. Rev.*, 2009, Vol. 15, no. 3, pp. 319-331.
12. Morikawa M., Deryck R., Miyazono K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2016, Vol. 8, no. 5, a021873. doi: 10.1101/cshperspect.a021873.
13. Peterson J.T., Hallak H., Johnson L., Li H., O'Brien P.M., Sliskovic D.R., Bocan T.M., Coker M.L., Etoh T., Spinale F.G. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation*, 2001, Vol. 103, no. 18, pp. 2303-2309.
14. Wall S.T., Yeh C.C., Tu R.Y.K., Mann M.J., Healy K.E. Biomimetic matrices for myocardial stabilization and stem cell transplantation. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 2010, Vol. 95, no. 4, pp. 1055-1066.
15. Ziora D., Dworniczak S., Kozielski J. Induced sputum metalloproteinases and their inhibitors in relation to exhaled nitrogen oxide and sputum nitric oxides and other inflammatory cytokines in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2008, Vol. 59, Suppl. 6, pp. 809-817.

**Авторы:**

**Лебедева А.И.** – д.б.н., старший научный сотрудник отдела морфологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

**Гареев Е.М.** – к.б.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

**Афанасьев С.А.** – д.м.н., заведующий лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

**Кондратьева Д.С.** – к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

**Муслимов С.А.** – д.м.н., ведущий научный сотрудник, заведующий отделом морфологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

**Попов С.В.** – академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, директор Научно-исследовательского института кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

**Authors:**

**Lebedeva A.I.**, PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Department of Morphology, Federal State Budgetary Education Institution «Bashkir State Medical University», Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

**Gareev E.M.**, PhD (Biology), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Neurophysiology, Federal State Budgetary Education Institution «Bashkir State Medical University», Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

**Afanasiev S.A.**, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Molecular Cell Pathology and Gene Diagnostics, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Tomsk, Russian Federation

**Kondratyeva D.S.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Molecular Cell Pathology and Gene Diagnostics, Research Institute of Cardiology, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Tomsk, Russian Federation

**Muslimov S.A.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Head, Department of Morphology, Federal State Budgetary Education Institution «Bashkir State Medical University», Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

**Popov S.V.**, Full Member, Russian Academy of Sciences, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Director, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Tomsk, Russian Federation

# ВЛИЯНИЕ АЗИТРОМИЦИНА НА МИГРАЦИЮ NK-КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Кадушкин А.Г.<sup>1</sup>, Таганович А.Д.<sup>1</sup>, Мовчан Л.В.<sup>2</sup>, Зафранская М.М.<sup>3</sup>,  
Шман Т.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»,  
д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь

<sup>3</sup> УО «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова» Белорусского  
государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

**Резюме.** До настоящего времени не выявлены лекарственные средства, которые могли бы замедлить неуклонное прогрессирование хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) или оказали существенное влияние на смертность пациентов. Поэтому продолжаются исследования, направленные на изучение механизмов развития ХОБЛ и поиск препаратов, влияющих на молекулярные звенья его патогенеза. Целью данной работы явилось определить способность комбинации азитромицина и кортикоステроидов влиять на миграцию NK-клеток крови пациентов с ХОБЛ. В настоящем исследовании с помощью метода проточной цитометрии определена экспрессия хемокиновых рецепторов CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR6 на поверхности NK-клеток периферической крови (с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) у 54 курящих пациентов с ХОБЛ, 21 курящего здорового человека и 20 здоровых некурящих лиц. Кроме того, изучено влияние азитромицина (10 мкг/мл) и будесонида (10 нМ) на миграцию NK-клеток пациентов с ХОБЛ (n = 8) к хемокинам CCL5 (10 нМ) и CXCL10 (10 нМ). Установлено, что у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими здоровыми и некурящими здоровыми людьми в крови повышенено процентное содержание NK-клеток, экспрессирующих на своей поверхности хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR5. При этом отсутствуют различия относительного количества этих субпопуляций NK-клеток между здоровыми курильщиками и здоровыми некурящими людьми. Процентное содержание NK-клеток, обладающих хемокиновыми рецепторами CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7, не различается между тремя группами обследованных лиц. Добавление к клеточной суспензии будесонида приводило к снижению миграции NK-клеток крови к хемокинам CCL5 и CXCL10. Азитромицин также подавлял перемещение NK-клеток крови к этим хемокинам. Сочетанное использование азитромицина и будесонида оказывало более выраженное ингибирующее воздействие на хемотаксис NK-клеток к хемокинам CCL5 и CXCL10, чем любой

#### Адрес для переписки:

Кадушкин Алексей Геннадьевич  
УО «Белорусский государственный медицинский  
университет»  
220083, Республика Беларусь, г. Минск,  
пр. Дзержинского, 83.  
Тел.: 8 (10-37517) 373-93-92.  
E-mail: kadushkyn@gmail.com

#### Address for correspondence:

Aliaksei G. Kadushkin  
Belarusian State Medical University  
83 Dzerzhinski Ave  
Minsk  
220083 Republic of Belarus  
Phone: +375 (17) 373-93-92.  
E-mail: kadushkyn@gmail.com

#### Образец цитирования:

А.Г. Кадушкин, А.Д. Таганович, Л.В. Мовчан,  
М.М. Зафранская, Т.В. Шман «Влияние азитромицина  
на миграцию NK-клеток крови пациентов с  
хронической обструктивной болезнью легких»  
// Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2.  
С. 309-318. doi: 10.15789/1563-0625-EOA-2581

© Кадушкин А.Г. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

#### For citation:

A.G. Kadushkin, A.D. Tahanovich, L.V. Movchan,  
M.M. Zafranskaya, T.V. Shman “Effect of azithromycin  
on migration of peripheral blood NK cells from patients with  
chronic obstructive pulmonary disease”, Medical Immunology  
(Russia)/Meditinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2,  
pp. 309-318. doi: 10.15789/1563-0625-EOA-2581

© Kadushkin A.G. et al., 2023

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EOA-2581

из этих препаратов по отдельности. Полученные результаты свидетельствуют об изменении профиля хемокиновых рецепторов NK-клеток при ХОБЛ и демонстрируют преимущества комбинированного использования глюокортикоидов и азитромицина для лечения этого заболевания.

*Ключевые слова:* ХОБЛ, NK-клетки, хемокиновые рецепторы, хемотаксис, CCL5, CXCL10, азитромицин, будесонид

## EFFECT OF AZITHROMYCIN ON MIGRATION OF PERIPHERAL BLOOD NK CELLS FROM PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

**Kadushkin A.G.<sup>a</sup>, Tahanovich A.D.<sup>a</sup>, Movchan L.V.<sup>b</sup>, Zafranskaya M.M.<sup>c</sup>, Shman T.V.<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>b</sup> Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyani, Minsk Region, Republic of Belarus

<sup>c</sup> International A. Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

**Abstract.** Currently, no drugs have been identified that could slow progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), or have a significant impact on patient mortality. Therefore, research continues aimed at studying the mechanisms of COPD development and searching for drugs that affect its molecular pathogenesis. The aim of our work was to determine the ability of azithromycin combined with corticosteroids to affect the migration of peripheral blood NK cells from the COPD patients. In the present study, we have measured expression of chemokine receptors CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR4, CXCR6 on the surface of peripheral blood NK cells (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) by means of flow cytometry in 54 smoking patients with COPD, 21 healthy smokers, and 20 healthy non-smokers. Moreover, the effect of azithromycin (10 µg/mL) and budesonide (10 nM) on the migration of NK cells from COPD patients (n = 8) towards CCL5 (10 nM) and CXCL10 (10 nM) was determined. We found that the percentage of NK cells expressing CXCR3 and CCR5 chemokine receptors was increased in smoking patients with COPD compared with healthy smokers and healthy non-smokers. However, the proportion of these NK cell subsets did not differ between healthy smokers and healthy non-smokers. There were no significant differences in the percentage of NK cells expressing CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7 chemokine receptors between the three groups of subjects. Addition of budesonide to the cell suspensions decreased the migration of blood NK cells towards CCL5 and CXCL10. Azithromycin was also shown to suppress the migration of blood NK cells towards these chemokines. The combination of azithromycin and budesonide was more potent at inhibiting NK cell chemotaxis towards CCL5 and CXCL10 than any of these drugs added alone. Our results demonstrate a change in the chemokine receptor profile of NK cells in COPD patients and indicate the advantages of the combined use of corticosteroids and azithromycin for COPD treatment.

*Keywords:* COPD, NK cells, chemokine receptors, chemotaxis, CCL5, CXCL10, azithromycin, budesonide

### Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) занимает лидирующие позиции среди причин заболеваемости и смертности во всем мире. По подсчетам ученых от этого заболевания страдают более 300 миллионов человек, большинство из которых проживают в странах с низким и средним уровнем дохода [24].

Клетки иммунной системы, включая нейтрофилы, макрофаги, субпопуляции лимфоцитов и дендритные клетки, играют ключевую роль в развитии воспаления дыхательных путей и деструкции легочной ткани при ХОБЛ [4]. NK-клетки (другое название – естественные киллеры), которые относят к клеткам врожденного иммунитета, находятся на острие защиты организма человека

от инфекций – фактора риска развития обострений ХОБЛ [12, 19]. Относительное количество этих клеток повышенено в индуцированной мокроте курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими и некурящими людьми [23], а также в крови пациентов с поздними (3-4) стадиями ХОБЛ по сравнению с больными с начальными (1-2) стадиями [18], что свидетельствует об их вовлеченности в развитие и прогрессирование заболевания.

Миграция NK-клеток крови в дыхательные пути происходит за счет расположенных на их поверхности хемокиновых рецепторов CXCR3, CXCR4, CXCR6, CCR5, CCR6, CCR7. Встреча данных рецепторов со своими лигандами (хемокинами) определяет перемещение клеток по градиенту концентрации хемокинов в места воспаления [22]. Достигнув очага воспаления в легких, NK-клетки продуцируют цитокины (интерферон  $\gamma$ , фактор некроза опухоли  $\alpha$ , интерлейкин-8 (IL-8), IL-17A, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и цитотоксические молекулы (перфорины, гранзим B), индуцируя гибель клеток-мишеней [2, 8]. Вместе с тем точные сведения об изменении экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности NK-клеток крови при ХОБЛ отсутствуют [19].

Сообщается, что NK-клетки пациентов с ХОБЛ являются устойчивыми к действию глюкокортикоидов (ГКС), лекарственных средств с противовоспалительным механизмом действия [9], что может служить причиной ограниченного терапевтического ответа при использовании этих препаратов [17]. Проведенные нами ранее исследования позволили установить синергичное супрессирующее действие ГКС и азитромицина в отношении секреции цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) в целом и NK-клетками крови в частности [14, 15].

Макролидный антибиотик азитромицин обладает бактериостатической активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а также атипичных возбудителей инфекций. Он ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, ослабляя миграцию клеток иммунной системы в дыхательные пути [15, 20]. Однако способность этого препарата потенцировать эффекты ГКС, связанные с угнетением миграции NK-клеток, до сих пор не известна.

**Целью настоящего исследования** явилось определить способность комбинации азитромицина и кортикоидов влиять на миграцию NK-клеток крови пациентов с ХОБЛ.

## Материалы и методы

### Характеристика пациентов

В исследование экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности NK-клеток периферической крови были включены 54 курящих пациента с ХОБЛ, 21 курящий здоровый человек и 20 здоровых некурящих лиц. Донорами крови для изучения хемотаксиса явились 8 больных ХОБЛ (табл. 1). Исследования, выполненные в рамках данной работы, были проведены до начала распространения новой коронавирусной инфекции (COVID-19).

Критериями включения больных в исследование были установленный в соответствии с критериями Глобальной инициативы по хронической обструктивной болезни легких (GOLD) диагноз ХОБЛ, индекс курящего человека более 10 пачка/лет, возраст старше 40 лет, отсутствие других заболеваний бронхолегочной системы (бронхиальной астмы, бронхоэктатической болезни, интерстициальных заболеваний легких), аллергических и онкологических заболеваний, декомпенсации сахарного диабета, нарушений свертывающей системы крови. Пациенты с ХОБЛ исключались из исследования, если принимали системные ГКС, перенесли инфекционное заболевание или обострение ХОБЛ в течение 6 недель до начала исследования.

В контрольные группы вошли условно здоровые добровольцы с нормальными показателями спирометрии, не имевшие в анамнезе патологии бронхолегочной системы и других хронических заболеваний.

Все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (протокол № 8 от 21.01.2019).

### Анализ экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности NK-клеток крови

Венозную кровь (2 мл) у пациентов с ХОБЛ и здоровых лиц забирали утром в пробирку, содержащую антикоагулянт К3 ЭДТА. Все исследования проводили в день взятия крови. К 100 мкл крови добавляли моноклональные антитела к поверхностным антигенам в различных сочетаниях: (1) CXCR3 FITC / CCR5 PE / CD3 PE-DyLight 594 / CD56 PE-Cy7 / CCR6 APC / CD45 APC-Cy7; (2) CXCR4 FITC / CCR7 PE / CD3 PE-DyLight 594 / CD56 PE-Cy7 / CD45 APC-Cy7; (3) CXCR6 PE / CD3 PE-DyLight 594 / CD56 PE-Cy7 / CD45 APC-Cy7 (Exbio, Прага, Чешская Республика; R&D Systems, Минneapolis, Миннесота, США). Со-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF STUDY PARTICIPANTS

Показатель Parameter	Экспрессия хемокиновых рецепторов Expression of chemokine receptors			Хемотаксис Chemotaxis
	Курящие пациенты с ХОБЛ Smokers with COPD	Курящие здоровые люди Healthy smokers	Некурящие здоровые люди Healthy non-smokers	
<b>Общее количество</b> No. of subjects	54	21	20	8
Пол, м/ж Sex, M/F	44/10	17/4	16/4	6/2
<b>Возраст, годы</b> Age, years	64,0 (59,8-69,0)	62,0 (55,0-65,5)	61,0 (54,0-66,0)	61,5 (59,0-68,3)
<b>Активные курильщики /</b> <b>экс-курильщики</b> Current smokers / ex-smokers	26/28	12/9	0/0	4/4
<b>Индекс курящего человека, пачка/лет</b> Smoking history, pack-years	35,0 (22,0-42,8)	32,0 (21,0-36,0)	0	39,0 (16,3-43,8)
<b>ОФВ<sub>1</sub>, % от должного</b> FEV <sub>1</sub> , % predicted	44,0 (32,8-51,0)	102,0 (98,5-109,0)	101,5 (95,0-112,3)	53,5 (43,3-63,8)
<b>ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ, %</b> FEV <sub>1</sub> /FVC, %	57,0 (50,0-62,0)	82,0 (78,5-87,0)	84,0 (78,0-88,8)	59,0 (42,8-63,5)
<b>Степень тяжести ХОБЛ в соответствии с GOLD (1/2/3/4), количество больных</b> GOLD stage (1/2/3/4), No. of patients	0/17/31/6	–	–	0/5/3/0

**Примечание.** Данные представлены в абсолютных значениях или в виде медианы и интерквартильного размаха (25-й – 75-й процентили). ОФВ<sub>1</sub> – объем форсированного выдоха за первую секунду; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких; GOLD – Глобальная инициатива по хронической обструктивной болезни легких. Приведенные в таблице значения ОФВ<sub>1</sub> и ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ для курящих пациентов с ХОБЛ получены после проведения бронходилатационной пробы.

Note. Data are presented as absolute number or median and interquartile range (25<sup>th</sup> – 75<sup>th</sup> percentiles). FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; GOLD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. FEV<sub>1</sub> and FEV<sub>1</sub>/FVC values given in the table for smokers with COPD were obtained on the basis of post-bronchodilator spirometry.

ответствующие изотипические антитела, конъюгированные с флуорохромами FITC (флуоресцеин изотиоцианат), PE (фикаэритрин) или APC (аллофикацин), использовали в качестве контролей. Образцы тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в темноте. Спустя 20 минут разрушали эритроциты путем добавления 1 мл лизирующего раствора Versalyse (Beckman Coulter, Марсель, Франция). Фенотипирование клеток проводили на проточном цитометре Navios с использованием программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США). НК-клетки опреде-

ляли как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> события, аналогично стратегии, описанной ранее [9]. Далее оценивали экспрессию хемокиновых рецепторов на поверхности этой субпопуляции лимфоцитов.

#### Выделение МКПК

Для проведения культуральных работ венозную кровь пациентов в объеме 15 мл помещали в пробирку, содержащую антикоагулянт гепарин натрия (10 ЕД/мл, Белмедпрепараты, Минск, Республика Беларусь). Используя раствор Lymphopure (BioLegend, Сан Диего, Калифорния, США), путем центрифugирования на градиенте плотности 1,077 г/мл из периферической крови выделя-

ли МКПК. Затем эти клетки ресуспенсировали в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco, Гранд Айленд, Нью-Йорк, США), обогащенной 1%-ной фетальной телячьей сывороткой (ФТС, Capricorn Scientific, Эбслорфергрунд, Германия).

#### Оценка миграции NK-клеток под влиянием лекарственных средств

Клеточную супензию (1 мл) помещали в стерильные пробирки и инкубировали с кортикостероидом будесонидом (10 нМ), антибиотиком азитромицином (10 мкг/мл) (Glentham Life Sciences Ltd, Коршам, Уилтшир, Великобритания) или их комбинацией в увлажненной 5%  $\text{CO}_2$ /95% воздушной среде при 37°C. По истечении 1 часа 100 мкл клеточной супензии переносили в верхние камеры (лунки) 24-луночного планшета, имеющие поры диаметром 5 мкм (Costar Corning, США). В нижние камеры планшета помещали 600 мкл буфера, содержащего культуральную среду RPMI 1640, обогащенную 1% ФТС и хемокинами CXCL10 (10 нМ, Gibco, Карлсбад, Калифорния, США) или CCL5 (10 нМ, R&D systems, Миннеаполис, Миннесота, США). Буфер, не содержащий хемокины, использовали в качестве контроля. Планшеты инкубировали при 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ /95% атмосферного воздуха в течение 2 часов. Клетки, мигрировавшие в нижнюю камеру, собирали и отмывали при помощи фосфатного солевого буфера (ФСБ, Cell Wash, BD Biosciences, Польша). Пробирки центрифугировали при 500 g, комнатной температуре в течение 5 минут, после чего клетки ресуспенсировали в ФСБ. Добавляли моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами (CD3-FITC, CD56-PC7, CD45-APC Alexa Fluor 750, Beckman Coulter, Марсель, Франция; Exbio, Прага, Чешская Республика). Клетки инкубировали в темноте (20 минут, 4 °C), отмывали при помощи 3 мл ФСБ, содержащего 0,2%-ный бычий сывороточный альбумин (BD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния, США) и фиксировали с использованием 300 мкл 1%-ного раствора параформальдегида. После настройки проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США) на среднюю скорость потока клеток подсчитывали количество NK-клеток в течение 100 секунд.

#### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы GraphPad Prism версия 7.00 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). При анализе экспрессии хемокиновых рецепторов на поверхности NK-клеток крови для сравнения трех независимых выборок применяли непараметрический тест Краскела–Уоллиса. Далее показатели сравнива-

ли попарно путем определения критерия Данна. Оценка результатов хемотаксиса осуществлялась методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным попарным сравнением показателей с помощью критерия Тьюки. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

#### Экспрессия хемокиновых рецепторов на NK-клетках крови

Результаты нашего исследования показали, что процентное содержание NK-клеток, экспрессирующих рецепторы CXCR3, повышено в крови у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми курящими и некурящими людьми (рис. 1). При этом различия в процентном содержании этих клеток между здоровыми курильщиками и здоровыми некурящими людьми отсутствовали. Аналогичные результаты были получены при сравнении относительного количества NK-клеток, несущих на своей поверхности рецепторы CCR5, между тремя группами людей, включенных в исследование.

Проведенный в настоящей работе цитометрический анализ продемонстрировал, что большинство NK-клеток крови пациентов с ХОБЛ и здоровых людей экспрессируют хемокиновые рецепторы CXCR4. Так, 78,1% (медиана) популяции NK-клеток у здоровых некурящих людей экспрессируют CXCR4, 79,7% – у здоровых курильщиков, 80,1% – у пациентов с ХОБЛ. При этом отсутствуют различия процентного содержания NK-клеток, содержащих эти хемокиновые рецепторы, между пациентами с ХОБЛ, здоровыми курильщиками и здоровыми некурящими людьми.

Как и в случае с рецепторами CXCR4, относительное количество NK-клеток крови, имеющих на своей поверхности рецепторы CCR6, CCR7 и CXCR6, не отличается у пациентов с ХОБЛ и двух групп сравнения. Однако доля NK-клеток, экспрессирующих эти хемокиновые рецепторы, составляет меньшую часть всей популяции данных клеток: 7,8% – CCR6, 15,2% – CCR7 и 2,8% – CXCR6 (приведены медианные значения, полученные у здоровых некурящих людей).

#### Влияние лекарственных средств на миграцию NK-клеток крови

Добавление к клеточной супензии будесонида приводило к снижению миграции NK-клеток крови к хемокинам CCL5 и CXCL10 (рис. 2). Азитромицин также подавлял перемещение NK-клеток крови к хемокинам CCL5 и CXCL10, но его способность ингибировать хемотаксис NK-клеток превосходила действие будесонида. При

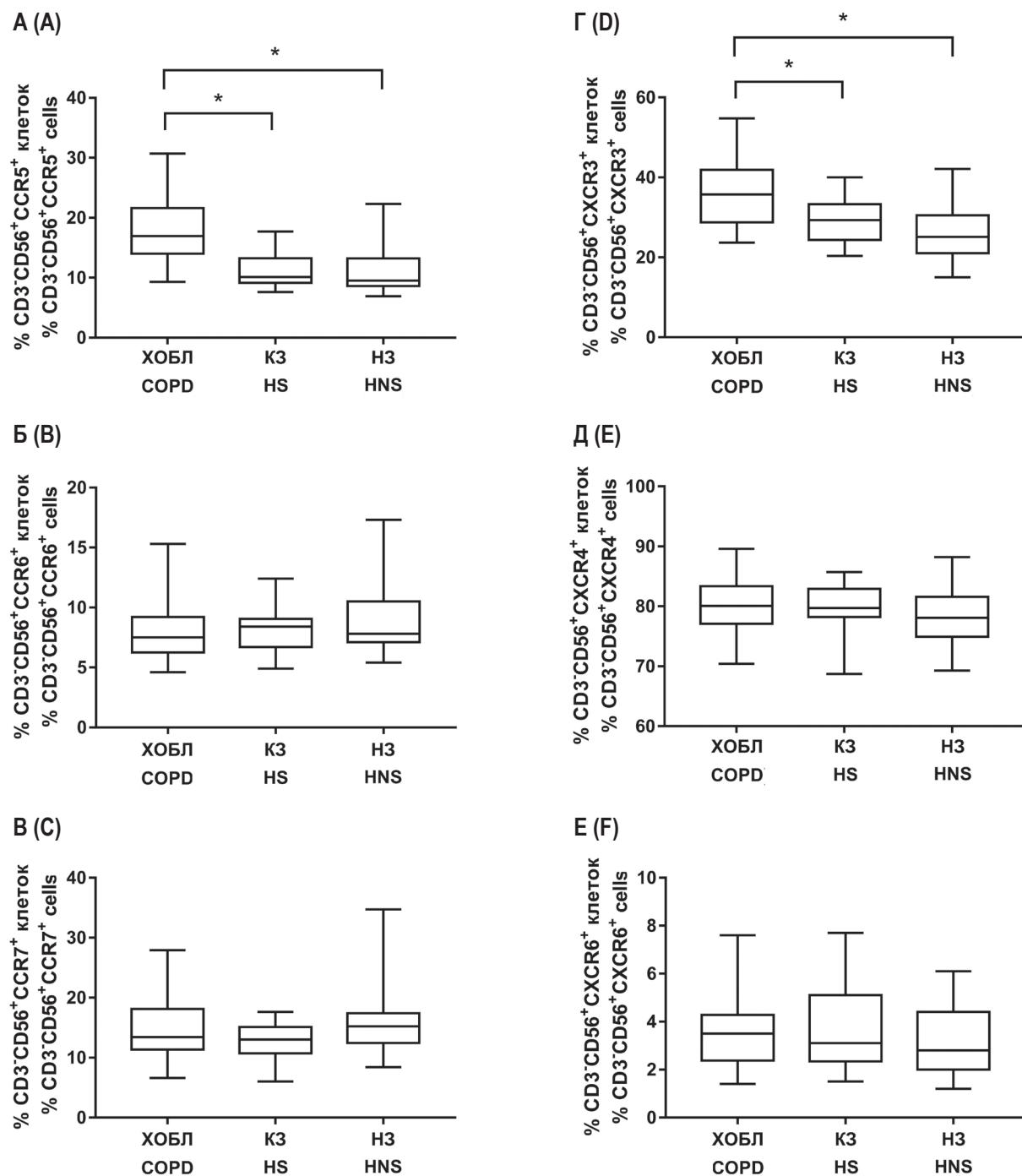


Рисунок 1. Экспрессия хемокиновых рецепторов на поверхности NK-клеток периферической крови

Примечание. Приведены графики, демонстрирующие процентное содержание NK-клеток (относительно всех NK-клеток), имеющих хемокиновые рецепторы CCR5 (А), CCR6 (Б), CCR7 (В), CXCR3 (Г), CXCR4 (Д), CXCR6 (Е), в периферической крови обследованных лиц. Диаграммы демонстрируют диапазон значений, медиану, 25-й и 75-й процентили; ХОБЛ – пациенты с хронической обструктивной болезнью легких, К3 – курящие здоровые люди, Н3 – некурящие здоровые люди; \* – p < 0,05 по сравнению с соответствующей контрольной группой.

Figure 1. Expression of chemokine receptors on the surface of peripheral blood NK cells

Note. Graphs demonstrate the percentage of NK cells (in relation to all NK cells) expressing chemokine receptors CCR5 (A), CCR6 (B), CCR7 (C), CXCR3 (D), CXCR4 (E), CXCR6 (F) in the peripheral blood of the examined subjects. Plots show range, median, 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles; COPD, patients with chronic obstructive pulmonary disease; HS, healthy smokers; HN, healthy non-smokers; \*, p < 0.05 compared with the corresponding control group.

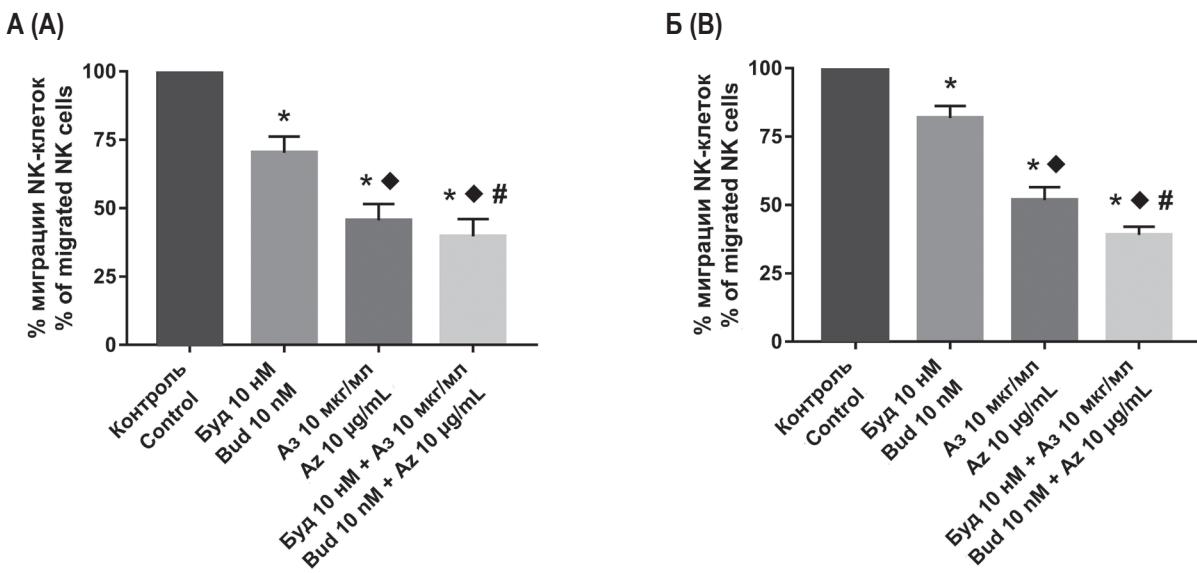


Рисунок 2. Влияние азитромицина и будесонида на хемотаксис NK-клеток периферической крови пациентов с ХОБЛ в направлении CCL5 и CXCL10

Примечание. Представлены графики, демонстрирующие влияние азитромицина (Аз, 10 мкг/мл), будесонида (Буд, 10 нМ) и их сочетания на миграцию NK-клеток, индуцированную 10 нМ CCL5 (А) и 10 нМ CXCL10 (Б). Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего;  $n = 8$ . \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (клетками крови, находившимися в присутствии хемокина, но в отсутствие лекарственных средств); \* –  $p < 0,05$  по сравнению с Буд 10 нМ; # –  $p < 0,05$  по сравнению с Аз 10 мкг/мл.

Figure 2. Effect of azithromycin and budesonide on the chemotaxis of peripheral blood NK cells from COPD patients towards CCL5 and CXCL10

Note. Graphs show the effect of azithromycin (Az, 10 µg/ml), budesonide (Bud, 10 nM) and their combination on NK cell migration induced by 10 nM CCL5 (A) and 10 nM CXCL10 (B). Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean;  $n = 8$ . \*,  $p < 0.05$  compared with control (blood cells cultured in the presence of chemokine, but in the absence of drugs); \*,  $p < 0.05$  compared with Bud 10 nM; #,  $p < 0.05$  compared with Az 10 µg/mL.

совместном применении азитромицина и будесонида наблюдалось синергичное ингибирующее действие этих препаратов на миграцию NK-клеток крови в направлении обоих хемокинов.

## Обсуждение

Настоящая работа проведена в два этапа. Вначале мы определили хемокиновые рецепторы, экспрессия которых повышена на поверхности NK-клеток периферической крови пациентов с ХОБЛ. Так, у данной категории больных обнаружено повышение процентного содержания естественных киллеров крови, обладающих рецепторами CXCR3 и CCR5, по сравнению с курящими здоровыми и некурящими здоровыми людьми. Ранее нами был продемонстрирован рост относительного количества Т- и В-лимфоцитов, снабженных данными хемокиновыми рецепторами, у пациентов с ХОБЛ [1, 16]. В совокупности полученные данные свидетельствуют о гиперэкспрессии рецепторов CXCR3 и CCR5, обусловленной ХОБЛ, на различных субпопуляциях лимфоцитов. NK-клетки крови как больных ХОБЛ, так

и здоровых людей несут на своей поверхности и другие хемокиновые рецепторы (CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7), но доля этих клеток не различается у обследованных лиц. Такие результаты наводят на мысль о том, что рецепторы CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7 не вовлечены в развитие ХОБЛ.

Миграция клеток крови происходит при взаимодействии хемокиновых рецепторов и их лигандов. Так, для перемещения клеток, снабженных рецептором CXCR3, требуется связывание с одним из трех хемокинов – CXCL9, CXCL10 или CXCL11. Основными лигандами для рецептора CCR5 являются CCL3, CCL4 и CCL5 [11, 22]. Обнаружена повышенная концентрация CXCL9, CXCL10, CXCL11 и CCL5 в мокроте пациентов с ХОБЛ [6], что является еще одним доказательством участия рецепторов CXCR3 и CCR5 в развитии заболевания. Более того, МКПК пациентов с ХОБЛ, снабженные рецепторами CCR5 и CXCR3, мигрировали в направлении CCL5 и лигандов рецептора CXCR3 в большем количестве, чем МКПК здоровых курящих и здоровых некурящих людей [7].

Естественные киллеры, оказавшись в легких пациентов с ХОБЛ, могут поражать собственные эпителиальные клетки, способствуя формированию и прогрессированию эмфиземы [8]. Приведенные данные демонстрируют значимость рецептор-лигандных взаимодействий CCR5-CCL5 и CXCR3-CXCL9/CXCL10/CXCL11 для миграции NK-клеток в дыхательные пути. Поэтому поиск препаратов, способных прямо или опосредованно влиять на перемещение NK-клеток, представляется перспективным с точки зрения лечения ХОБЛ.

На следующем этапе исследования мы проанализировали способность макролидного антибиотика азитромицина потенцировать действие будесонида на миграцию NK-клеток пациентов с ХОБЛ. Выбор хемокинов (CCL5 и CXCL10) для инициации хемотаксиса NK-клеток основывался на результатах первого этапа нашей работы.

Как известно, ХОБЛ, наряду с бронхиальной астмой, системной красной волчанкой, язвенным колитом и ревматоидным артритом, относится к заболеваниям, характеризующимся устойчивостью к ГКС [3, 10, 25]. Причиной стероидорезистентности при ХОБЛ является окислительный стресс, развитие которого индуцируют активные формы кислорода, находящиеся в сигаретном дыме или производственной пыли [5]. Как следствие, изменяется экспрессия ряда сигнальных молекул — глюокортикоидного рецептора  $\beta$  (ГР $\beta$ ), фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, ферментов гистондеацетилазы 2 и p38 митоген-активируемой протеинкиназы, что ведет к неадекватному (сниженному) ответу клеток на кортикостероиды [3, 13].

В настоящей работе будесонид статистически значимо, но лишь на 29,7% (при вычитании среднего миграции под влиянием будесонида от среднего миграции в его отсутствии, т. е. от контроля, принятого за 100%) меньше контроля подавлял перемещение NK-клеток в направлении CCL5 и на 18,2% меньше контроля — в направлении CXCL10. Мы полагаем, что такой уровень ингибиции не позволяет кардинально замедлить перемещение NK-клеток.

Макролидный антибиотик азитромицин продемонстрировал лучший профиль супрессии миграции NK-клеток, чем будесонид. Так, количество NK-клеток, мигрировавших к CCL5 в присутствии азитромицина, было на 54,5% меньше контроля, а в направлении CXCL10 — на 48,2% меньше контроля. Совместное использование двух препаратов позволило добиться ощутимой супрессии перемещения NK-клеток, которая превосходила способность каждого из препаратов по отдельности: миграция NK-клеток снизилась по сравнению с контролем в 2,52 раза в на-

правлении CCL5 и в 2,56 раза — в направлении CXCL10.

К установленным механизмам, позволяющим азитромицину восстанавливать чувствительность клеток к стероидам, относят его способность повышать экспрессию фермента гистондеацетилазы 2 и ГР $\alpha$ , ингибиовать сигнальный путь, опосредованный фосфотидилинозитол-3-киназой  $\delta$  [21]. Азитромицин подавляет активность ERK-киназы и JNK-киназы [26]. Эти ферменты фосфорилируют ГР $\alpha$ , препятствуя его перемещению в ядро клетки, что снижает чувствительность клеток к ГКС [3]. Известно о способности азитромицина угнетать активность факторов транскрипции AP-1 и NF-к $\kappa$ В [26], которые индуцируют экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины, ферменты и молекулы адгезии.

В предыдущих работах мы показали более выраженное супрессирующее воздействие комбинации азитромицина и будесонида, чем действие одного будесонида, на секрецию IL-4, IL-5, IL-8, IL-17A, тимического стромального лимфопоэтина МКПК, а также на продукцию IL-4 и IL-8 Т-хелперами, цитотоксическими Т-лимфоцитами и NK-клетками крови [14, 15]. Настоящее исследование расширяет представления о способности азитромицина потенцировать противовоспалительные эффекты кортикостероидов.

## Заключение

У курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с курящими здоровыми и некурящими здоровыми людьми в крови повышено относительное количество NK-клеток, экспрессирующих на своей поверхности хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR5, и отсутствуют значимые различия доли NK-клеток, содержащих хемокиновые рецепторы CXCR4, CXCR6, CCR6, CCR7.

Будесонид и азитромицин по отдельности подавляют миграцию NK-клеток крови в направлении хемокинов CCL5 и CXCL10. Сочетание азитромицина и будесонида оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на хемотаксис NK-клеток к хемокинам CCL5 и CXCL10, чем действие любого из этих препаратов. Полученные результаты демонстрируют преимущества комбинированного использования ГКС совместно с азитромицином для лечения ХОБЛ.

## Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке белорусской государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки — медицине» (задание № 2.56).

## Список литературы / References

1. Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Мовчан Л.В., Зафранская М.М., Дядичкина О.В., Шман Т.В. Субпопуляционный состав В-лимфоцитов крови, коэкспрессирующих CD5 и хемокиновые рецепторы, у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. Иммунология, 2022. Т. 43, № 2. С. 197-207. [Kadushkin A.G., Tahanovich A.D., Movchan L.V., Zafranskaya M.M., Dziadzichkina V.V., Shman T.V. Peripheral blood B-lymphocyte subpopulations coexpressing CD5 and chemokine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Immunologiya = Immunologiya*, 2022, Vol. 43, no. 2, pp. 197-207. (In Russ.)]
2. Abel A.M., Yang C., Thakar M.S., Malarkannan S. Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869.
3. Barnes P.J. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, no. 3, pp. 636-645.
4. Barnes P.J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 138, no. 1, pp. 16-27.
5. Barnes P.J. Oxidative stress-based therapeutics in COPD. *Redox Biol.*, 2020, Vol. 33, 101544. doi: 10.1016/j.redox.2020.101544.
6. Costa C., Rufino R., Traves S.L., Lapa E Silva J.R., Barnes P.J., Donnelly L.E. CXCR3 and CCR5 chemokines in induced sputum from patients with COPD. *Chest*, 2008, Vol. 133, no. 1, pp. 26-33.
7. Costa C., Traves S.L., Tudhope S.J., Fenwick P.S., Belchamber K.B., Russell R.E., Barnes P.J., Donnelly L.E. Enhanced monocyte migration to CXCR3 and CCR5 chemokines in COPD. *Eur. Respir. J.*, 2016, Vol. 47, no. 4, pp. 1093-1102.
8. Freeman C.M., Stolberg V.R., Crudgington S., Martinez F.J., Han M.K., Chensue S.W., Arenberg D.A., Meldrum C.A., McCloskey L., Curtis J.L. Human CD56<sup>+</sup> cytotoxic lung lymphocytes kill autologous lung cells in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 7, e103840. doi: 10.1371/journal.pone.0103840
9. Hodge G., Hodge S. Therapeutic targeting steroid resistant pro-inflammatory NK and NKT-Like cells in chronic inflammatory lung disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 6, 1511.
10. Henderson I., Caiazzo E., McSharry C., Guzik T.J., Maffia P. Why do some asthma patients respond poorly to glucocorticoid therapy? *Pharmacol. Res.*, 2020, Vol. 160, 105189. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105189.
11. Henrot P., Prevel R., Berger P., Dupin I. Chemokines in COPD: From Implication to Therapeutic Use. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 11, 2785. doi: 10.3390/ijms20112785.
12. Hewitt R., Farne H., Ritchie A., Luke E., Johnston S.L., Mallia P. The role of viral infections in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Ther. Adv. Respir. Dis.*, 2016, Vol. 10, no. 2, pp. 158-174.
13. Jiang Z., Zhu L. Update on molecular mechanisms of corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2016, Vol. 37, pp. 1-8.
14. Kadushkin A.G., Tahanovich A.D., Movchan L.V., Kolesnikova T.S., Khadasouskaya A.V., Shman T.V. The effect of glucocorticoids in combination with azithromycin or theophylline on cytokine production by NK and NKT-Like blood cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.*, 2021, Vol. 15, no. 4, pp. 337-344.
15. Kadushkin A., Tahanovich A., Movchan L., Talabayeva E., Plastinina A., Shman T. Azithromycin modulates release of steroid-insensitive cytokines from peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Adv. Respir. Med.*, 2022, Vol. 90, no. 1, pp. 17-27.
16. Kadushkin A.G., Tahanovich A.D., Movchan L.V., Zafranskaya M.M., Dziadzichkina V.V., Shman T.V. Population rearrangement of B lymphocytes expressing chemokine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.*, 2022, Vol. 16, no 3, pp. 216-224.
17. Mei D., Tan W.S.D., Wong W.S.F. Pharmacological strategies to regain steroid sensitivity in severe asthma and COPD. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2019, Vol. 46, pp. 73-81.
18. Pascual-Guardia S., Ataya M., Ramírez-Martínez I., Yélamos J., Chalela R., Bellido S., López-Botet M., Gea J. Adaptive NKG2C<sup>+</sup> natural killer cells are related to exacerbations and nutritional abnormalities in COPD patients. *Respir. Res.*, 2020, Vol. 21, no. 1, 63. doi: 10.1186/s12931-020-1323-4.
19. Rao Y., Le Y., Xiong J., Pei Y., Sun Y. NK cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 666045. doi: 10.3389/fimmu.2021.666045.
20. Reijnders T.D.Y., Saris A., Schultz M.J., van der Poll T. Immunomodulation by macrolides: therapeutic potential for critical care. *Lancet Respir. Med.*, 2020, Vol. 8, no. 6, pp. 619-630.
21. Sun X.J., Li Z.H., Zhang Y., Zhou G., Zhang J.Q., Deng J.M., Bai J., Liu G.N., Li M.H., MacNee W., Zhong X.N., He Z.Y. Combination of erythromycin and dexamethasone improves corticosteroid sensitivity induced by CSE through inhibiting PI3K-δ/Akt pathway and increasing GR expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2015, Vol. 309, no. 2, pp. L139-L146.
22. Tomankova T., Kriegova E., Liu M. Chemokine receptors and their therapeutic opportunities in diseased lung: far beyond leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2015, Vol. 308, no. 7, pp. L603-L618.
23. Urbanowicz R.A., Lamb J.R., Todd I., Corne J.M., Fairclough L.C. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir. Res.*, 2010, Vol. 11, no. 1, 76. doi: 10.1186/1465-9921-11-76.

24. Vos T., Lim S.S., Abbafati C., Abbas K.M., Abbasi M., Abbasifard M., GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*, 2020, Vol. 396, no. 10258, pp. 1204-1222.
25. Wu B., Tong J., Ran Z. Tacrolimus Therapy in Steroid-Refractory Ulcerative Colitis: A Review. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2020, Vol. 26, no. 1, pp. 24-32.
26. Yang J. Mechanism of azithromycin in airway diseases. *J. Int. Med. Res.*, 2020, Vol. 48, no. 6, 300060520932104. doi: 10.1177/0300060520932104.

---

**Авторы:**

**Кадушкин А.Г.** – к.м.н., доцент кафедры биологической химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

**Таганович А.Д.** – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

**Мовчан Л.В.** – к.б.н., врач лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь

**Зафранская М.М.** – д.м.н., доцент, заведующая кафедрой иммунологии УО «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

**Шман Т.В.** – к.б.н., заведующая лабораторией иммунологических исследований ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь

Поступила 09.09.2022  
Отправлена на доработку 13.09.2022  
Принята к печати 08.11.2022  
Дата онлайн-публикации 14.11.2022

**Authors:**

**Kadushkin A.G.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Biological Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

**Tahanovich A.D.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Biological Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

**Movchan L.V.**, PhD (Biology), Doctor of Laboratory Diagnostics, Clinical Diagnostic Laboratory, Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyani, Minsk Region, Republic of Belarus

**Zafranskaya M.M.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Immunology Department, International A. Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

**Shman T.V.**, PhD (Biology), Head, Immunological Research Laboratory, Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyani, Minsk Region, Republic of Belarus

Received 09.09.2022  
Revision received 13.09.2022  
Accepted 08.11.2022  
Date of publication online 14.11.2022

# КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФЕНОТИПЫ ТЕЧЕНИЯ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Черевко Н.А.<sup>1</sup>, Худякова М.И.<sup>1</sup>, Климов В.В.<sup>1</sup>, Новиков П.С.<sup>1,2</sup>,  
Никитина А.А.<sup>2</sup>, Березовская К.В.<sup>2</sup>, Кошкарова Н.С.<sup>1</sup>, Денисов А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Томск, Россия

<sup>2</sup> ООО «Центр семейной медицины», г. Томск, Россия

**Резюме.** РАС страдает каждый 59-й ребенок. У пациентов с РАС чаще, чем в популяции в целом, присутствуют сопутствующие расстройства, которые могут усугубить течение основного заболевания или повлиять на постановку диагноза.

Цель работы – выделить клинико-иммунологические фенотипы течения РАС.

Материалом исследования служили образцы крови детей двух групп исследования: дети с РАС (n = 100) и клинически здоровые (n = 30). На основании наличия сопутствующих заболеваний дети были разделены на 3 фенотипа: судорожный, инфекционный, дермато-респираторный и желудочно-кишечный.

В сыворотке крови определяли концентрации цитокинов IL-4, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ , IL-17A. Модифицированным методом ИФА с применением методологии Immunohealth<sup>TM</sup> определяли концентрацию spIgG к 111 пищевым антигенам (пАГ). Оценку показателей когнитивных и психофизиологических показателей у детей проводили с помощью анкеты АТЕС.

В результате исследования выделены клинико-иммунологические фенотипы течения РАС, связанные с особым типом пищевой реактивности, цитокиновым профилем, клинической тяжестью психо-физиологических расстройств и сопутствующими коморбидными заболеваниями.

Во всех четырех фенотипах установлена повышенная активность синтеза специфических антител, связанного с изученным пАГ гуморального иммунитета, повышенная концентрация суммарного spIgG к пАГ и концентрации spIgG к бобовым продуктам и казеину, значения С-реактивного белка.

При этом в судорожном фенотипе (сопутствующие эпилепсия и судороги) максимальные концентрации spIgG установлены к пасленовым продуктам, повышена концентрация IL-10 и снижена концентрация IL-4, снижено содержание сывороточного железа и ферритина.

В инфекционном фенотипе (часто болеющие дети) – к зерновым и бродильным продуктам, повышенены концентрации IL-10 и IFN $\gamma$  и снижена концентрация IL-4, повышенены абсолютное и относительное количество лимфоцитов и фибриноген.

## Адрес для переписки:

Черевко Наталья Анатольевна  
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
634055, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2.  
Тел.: 8 (913) 920-50-52.  
E-mail: chna@0370.ru

## Address for correspondence:

Natalya A. Cherevko  
Siberian State Medical University  
2 Moskovskiy tract  
Tomsk  
634055 Russian Federation  
Phone: +7 (913) 920-50-52.  
E-mail: chna@0370.ru

## Образец цитирования:

Н.А. Черевко, М.И. Худякова, В.В. Климов,  
П.С. Новиков, А.А. Никитина, К.В. Березовская,  
Н.С. Кошкарова, А.А. Денисов «Клинико-  
иммунологические фенотипы течения расстройств  
аутистического спектра» // Медицинская  
имmunология, 2023. Т. 25, № 2. С. 319-330.  
doi: 10.15789/1563-0625-CIP-2588

© Черевко Н.А. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

N.A. Cherevko, M.I. Khudiakova, V.V. Klimov, P.S. Novikov,  
A.A. Nikitina, K.V. Berezovskaya, N.S. Koshkarova,  
A.A. Denisov “Clinical-immunological phenotypes of the  
autistic spectrum disorders”, Medical Immunology (Russia)/  
Meditinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2,  
pp. 319-330. doi: 10.15789/1563-0625-CIP-2588

© Cherevko N.A. et al., 2023

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-CIP-2588

В дермато-респираторном фенотипе (кожные высыпания) — к молочным продуктам, повышены концентрации IL-4 и IL-17A.

В желудочно-кишечном фенотипе зарегистрировано самое высокое количество реакций повышенных IgG к наибольшему спектру пАГ на фоне тенденции изменения в цитокиновом профиле в сторону повышения IFN $\gamma$  в соотношениях IFN $\gamma$ /IL-4 и IFN $\gamma$ /IL-10.

Таким образом, выделенные фенотипы течения РАС связаны с влиянием пАГ и отражают особый вариант иммунологического воспалительного патогенеза, что позволяет персонализировать элиминационные диеты, предложить мероприятия по коррекции и индивидуальной профилактике и, вероятно, рассчитать прогноз течения заболевания.

**Ключевые слова:** *расстройства аутистического спектра, фенотипы РАС, инфекционный фенотип, дермато-респираторный фенотип, желудочно-кишечный фенотип*

## CLINICAL-IMMUNOLOGICAL PHENOTYPES OF THE AUTISTIC SPECTRUM DISORDERS

**Cherevko N.A.<sup>a</sup>, Khudiakova M.I.<sup>a</sup>, Klimov V.V.<sup>a</sup>, Novikov P.S.<sup>a, b</sup>,  
Nikitina A.A.<sup>b</sup>, Berezovskaya K.V.<sup>a</sup>, Koshkarova N.S.<sup>a</sup>, Denisov A.A.<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Center for Family Medicine LLC, Tomsk, Russian Federation

**Abstract.** Autistic spectrum disorders (ASD) affect about one in every 59 children. It is noteworthy that patients with ASD are more likely to have other comorbidities than the general population. Undoubtedly, they may aggravate clinical course of the underlying disease or affect the diagnostics. The aim of this work was to identify clinical and immunological phenotypes of the ASD clinical course. Patients and methods. The study included children classified in 2 groups: pediatric patients with ASD (n = 100), and clinically healthy children (n = 30). Based on the presence of comorbidities, the children were divided into 3 types of clinical patterns: convulsive, infectious, dermatо-respiratory and gastrointestinal phenotypes. Cytokine concentrations in blood serum were determined by ELISA using Bender Medsystems (Austria) for IL-17A and Vector-Best (Russia) for IL-4, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ . The concentration of spIgG to 111 nutritional antigens (IgG) was determined by a modified ELISA method using the Immunohealth™ technique. Assessment of cognitive and psychophysiological indices in children was carried out using the ATEC questionnaire. As a result of the study, clinical and immunological phenotypes were identified among the ASD patients, being associated with certain types of food tolerance, cytokine profile, clinical severity of psycho-physiological disorders and concomitant comorbid diseases. In all four phenotypes, were have revealed an increased synthesis of specific antibodies associated with humoral immunity for the studied food antigens, increased concentration of total spIgG to food antigens, concentration of spIgG to legumes and casein, and C-reactive protein levels.

Moreover, in convulsive phenotype (concomitant epilepsy and convulsions), the maximal concentrations of spIgG are shown for Solanaceae products, the concentration of IL-10 is increased, IL-4 amounts are reduced, and the content of serum iron and ferritin is also lowered. In the infectious phenotype (frequently ill children) the spIg's to grain and fermented products are detected, IL-10 and IFN $\gamma$  concentrations are increased and IL-4 contents is reduced, along with increased absolute and relative number of lymphocytes and fibrinogen. In the dermatо-respiratory phenotype (skin rashes) — to dairy products, the concentrations of IL-4 and IL-17A are increased. In the gastrointestinal phenotype, the highest number of elevated IgG responses to the largest range of food antigens was found in presence of changing cytokine profile , i.e., an increase in IFN $\gamma$  in IFN $\gamma$ /IL-4 and IFN $\gamma$ /IL-10 ratios. Thus, the identified phenotypes of the ASD course are associated with the influence of food antigens and reflect a special variant of the immunological inflammatory pathogenesis, which makes it possible to personalize elimination diets, propose measures for correction and individual prevention, and, probably, to predict clinical course of the disease.

**Keywords:** *autistic spectrum disorders, phenotypes, dermatо-respiratory, gastrointestinal*

Работа выполнена за счет средств ООО «Центр семейной медицины» (г. Томск), благотворительного фонда «Созидание» (г. Москва), с участием АРДА «АУРА» (г. Томск).

## Введение

Расстройство аутистического спектра (РАС) представляет собой группу сложных многофакторных нарушений развития нервной системы, характеризующихся широким и вариабельным набором психоневрологических симптомов, включая дефицит социального общения, ограниченные интересы и повторяющееся поведение [10].

По оценкам Центра по контролю и профилактике заболеваний РАС страдает каждый 59-й ребенок [5]. Примечательно, что у пациентов с РАС чаще, чем в популяции в целом, присутствуют коморбидные расстройства. По данным различных исследований совместно с РАС отмечаются от 4 и более коморбидных заболеваний [36]. Их сочетания варьируют в разных случаях и имеют свои особенности в клинических проявлениях.

Обычно с РАС встречаются такие проблемы, как желудочно-кишечные расстройства, эпилепсия, хронические инфекции, синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), расстройства развития, умственная отсталость, нарушения сна, обсессивно-компульсивное расстройство или депрессия, генетические болезни, включая синдром ломкой X-хромосомы и туберозный склероз [16, 33].

Следует отметить, что некоторые из этих состояний могут иметь общие биологические механизмы реализации с РАС. Например, показано, что паттерны экспрессии генов у пациентов с РАС аналогичны паттернам у людей с шизофренией или биполярным расстройством [13]. Люди с этими состояниями также могут иметь общие генетические варианты и черты, такие как языковые трудности или агрессия.

Наиболее частыми сопутствующими заболеваниями у пациентов с РАС являются желудочно-кишечные симптомы (боль в животе, хронические запоры, диарея, вздутие живота) [9]. Нарушение функции желудочно-кишечного тракта, сопровождающееся болью и метеоризмами, может вызывать проблемы с кормлением и усиливать негативное поведение, в том числе самоповреждение, у пациентов с РАС.

Есть данные, что измененная микробиота кишечника способна производить нейроэндокринные факторы, формируя пищевые предпочтения [29]. Так, 90% детей с РАС предпочитают в выборе пищи крахмалосодержащие продукты и проявляют неприязнь к овощам и фруктам [46]. Имеются научные работы о проблемах нарушения переваривания и транспорта углеводов на

фоне недостаточной ферментативной активности дисахаридов, данные об особой фекальной микробиоте с нарушенными функциями, влияющими на проницаемость кишечной стенки [17].

Нарушение проницаемости барьера слизистой оболочки кишечника, обнаруженное у пациентов с РАС, может приводить к транслокации повышенного количества как экзогенных нейротоксических пептидов бактериального происхождения (липополисахариды), так и пептидов диетического происхождения в иммунокомпетентные зоны за границами энteroцитов, запускать перепрограммирование дендритных клеток, макрофагов и лимфоцитов, потенцировать развитие адаптивного иммунного ответа, увеличивать количество цитокинов и эффекторных клеток в кровотоке, приводить к изменению механизмов контроля толерантности за пищевыми антигенами (ПАГ) [46].

Есть данные, что примерно каждый третий пациент с РАС (по разным источникам от 10% до 30%) страдает сопутствующей эпилепсией, а люди с эпилепсией, по сравнению с населением, в целом подвержены восьмикратному риску развития РАС [7, 49], по другим источникам 8% детей с эпилепсией имеют диагноз РАС [40]. Связь может быть частично генетической, но также возможно, что эпилепсия приводит к определенным патологиям. Так, 60% детей с РАС имеют аномальную электроэнцефалограмму по сравнению с 6-7% в группе здоровых детей.

В разных исследованиях отмечается связь между наличием вирусной [40], бактериальной [28] инфекцией и РАС. Показано, что дети с РАС чаще, чем сверстники, подвержены инфекционным заболеваниям [4, 18]. Дети с РАС более склонны к инфекции в неонатальном периоде и в первые три года жизни по сравнению с обычными детьми [45].

У детей с РАС чаще встречается пищевая аллергия, ринит, астма и атопический дерматит, псориаз [22, 35]. Кроме того, аллергические состояния (астма, атопический дерматит, аллергический ринит, конъюнктивит) в раннем детстве связаны с высокой частотой более поздней постановки диагнозов РАС и СДВГ [11].

На основании приведенных данных следует вывод об отсутствии единого мнения, какие же заболевания влияют на развитие и течение РАС, подтверждая в целом актуальность изучения влияния триггеров коморбидных заболеваний. Понимание моделей совместной встречаемости сопутствующих заболеваний при РАС, выделение клинико-иммунологических фенотипов позволяет оценить особенности иммунопатогенеза, а также открыть подходы к персональной терапии, сделать воспаление управляемым, а значит – остановить прогрессирование основного заболевания.

Исходя из этого, целью нашей работы стало выделение клинико-иммунологических фенотипов течения РАС, связанных с балансом цитокинов, показателями пищевой гиперчувствительности и психо-физиологическими параметрами у детей с РАС.

## Материалы и методы

Исследование было проведено на базе поликлинического отделения ООО «Центр семейной медицины». В нем приняло участие 130 детей, которые были разделены на две группы. Основная группа была представлена 100 детьми, у каждого из которых было диагностировано РАС различной степени тяжести. Стаж постановки диагноза составил 3-4 года. Контрольная группа была представлена 30 соматически здоровыми детьми. Средний возраст детей в обеих группах составил  $7 \pm 2$  года. В обеих группах детей ранее мы выделили дифференцированные реакции пищевой гиперчувствительности.

Все родители детей подписывали информированное согласие на проведение комплексных исследований и обработку персональных данных.

По результатам анамнестических данных 97% обследованных детей с РАС имели жалобы, связанные с желудочно-кишечными симптомами, такими как: потеря аппетита, метеоризм, вздутие, запоры, диарея. Эти симптомы подтверждают данные о распространенности общего присутствия фенотипа ЖКТ при РАС, характеризующегося повышенной проницаемостью кишечника и аномалиями со стороны иммунной системы (ИС) кишечника, что подробно описывается в разной литературе [8, 24]. Поэтому было принято решение стратифицировать группу, учитывая базовый фенотип связанный с ЖКТ, по

дополнительным коморбидным заболеваниям, и провести сравнение показателей между всеми группами между собой и группой здоровых детей.

Таким образом, были выделены следующие группы в зависимости от коморбидных заболеваний: «Судорожный тип» (сопутствующие эпилепсия и судороги и проблемы ЖКТ в 100%, n = 8), «Дермато-респираторный тип» (кожные заболевания и проблемы ЖКТ в 100%, n = 31), «Инфекционный тип» (часто болеющие дети, присутствуют проблемы ЖКТ в 97%, n = 24) и дети с РАС с отсутствием дополнительных коморбидных заболеваний за исключением проблем с ЖКТ (n = 26) (табл. 1). Не вошли в состав групп дети с РАС, у которых отмечались болезни сердца (n = 6) и щитовидной железы (n = 5). Для сравнения использовалась контрольная группа клинически здоровых детей (n = 30).

В качестве материала исследования использовали кровь, взятую натощак или после 4 часов голодания из подкожных вен области локтевого сгиба. Исследовались следующие параметры: концентрации IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN $\gamma$  – методом ИФА с применением наборов Bender Medsystems (Австрия) к IL-17A и «Вектор-Бест» (Россия) к IL-4, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ .

Модифицированным методом ИФА с применением методологии Immunohealth™ определяли концентрацию spIgG к 111 пАГ и персональный расчет риска «норма-патология» [1].

Для оценки показателей когнитивных и психофизиологических изменений у детей с РАС, а также определения степени тяжести заболевания, родители детей на основании собственных наблюдений, заполняли специализированную анкету – Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC). Результаты анкетирования родителей детей контрольной группы не превышали 10 бал-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП ПО ПРИЗНАКАМ КОГНИТИВНЫХ И ПСИХОНЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ БАЛЛОВ АТЕС, СООТВЕТСТВУЮЩИХ ТЯЖЕСТИ ПРОЯВЛЕНИЙ РАС

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE STUDIED GROUPS ACCORDING TO THE SIGNS OF COGNITIVE AND PSYCHONEUROPHYSIOLOGICAL CHANGES IN ATEC SCORES CORRESPONDING TO THE SEVERITY OF ASD MANIFESTATIONS

Подгруппа Subgroup	1 Судорожный тип Convulsive type	2 Инфекционный тип Infectious type	3 Дермато- респираторный тип Dermato- respiratory type	4 Желудочно- кишечный тип Gastrointestinal type	5 Контрольная группа Control group
Размер выборки Size sample	8	24	31	26	30
Тест АТЕС Test ATEC	124 (122-132)	112 (104-119)	91 (69-103)	71 (50-99)	0

лов, что свидетельствовало об отсутствии заболевания у детей.

Статистический анализ был выполнен в программе IBM SPSS Statistics 23.0 (США) с использованием критериев Колмогорова–Смирнова, U-критерия Манна–Уитни и коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Во всех четырех исследуемых группах были повышены значения spIgG к бобовым продуктам, казеину и значения С-реактивного белка.

Для оценки психонейрологических показателей у детей с РАС использовали тест АТЕС. Самые высокие значения АТЕС, равные 124 (122–132) баллам, определялись у детей с РАС из группы «Судорожный тип». В анамнезе заболевания детей данной группы врачами-психоневрологами были зафиксированы случаи приступов эпилепсии и судорог.

Некоторые исследователи полагают, что аутичные проявления у детей могут являться частью нейрологической составляющей эпилепсии [47]. Было высказано предположение, что, возможно, причиной одновременного возникновения РАС и эпилепсии является то, что одна и та же патология головного мозга вызывает оба расстройства [51]. Например, общие патогенетические процессы, связанные с нейронными патологиями (аномальное накопление агрегатов белка альфа-синуклеина в нейронах, нервных волокнах или глиальных клетках, дисфункция синапсов в головном, спинном мозге или периферической нервной системе и т. д.) [26]. Также известно, что дупликации локуса 15q11-13 или вариантов числа копий 15q13 часто связаны с РАС и эпилепсией и несколько ключевых генов-кандидатов расположены в этих локусах [49], но возможны и другие варианты *de novo* в различных генах, ассоциированных с риском развития эпилепсии.

В группе «Судорожного типа» были обнаружены самые высокие концентрации суммарного spIgG к пАГ ( $U = 21$ ,  $p = 0,001$ ) и концентрация spIgG к пАГ пасленовых продуктов ( $U = 9,5$ ,  $p = 0,021$ ) по сравнению со всеми исследуемыми группами (табл. 2). На фоне этого выявлен дисбаланс цитокинов. Концентрация IL-4 понижена ( $U = 19$ ,  $p = 0,01$ ), а концентрация IL-10 увеличена ( $U = 22$ ,  $p = 0,05$ ) (табл. 3).

Концентрация spIgG к *C. albicans* была выше, чем в контрольной группе ( $U = 18$ ,  $p = 0,003$ ). Среди исследуемых клинико-лабораторных показателей выявлены низкие значения сывороточного железа ( $U = 6$ ,  $p = 0,05$ ) и ферритина ( $U = 6$ ,  $p = 0,019$ ) (табл. 4).

Таким образом, выявленные самые высокие значения суммарного spIgG к пАГ, сопряженные

с самыми высокими показателями теста АТЕС, указывают на высокую степень иммунного реагирования на пАГ.

Превалирующим в данном случае механизме воздействия может являться влияние пАГ пасленовых продуктов – именно к ним выявлены самые высокие значения spIgG по сравнению со всеми исследуемыми группами.

В пасленовых продуктах содержатся гликоалкалоиды (соланин и хаконин), разрушающие холестеринсодержащие мембранны кишечного эпителия и способствующие увеличению его проницаемости [6].

Во второй исследуемой группе – «Инфекционный тип» (часто болеющие дети, преимущественно ОРВИ 6–7 раз в год) результаты теста АТЕС составили 112 (104–119) баллов. Были обнаружены повышенные концентрации суммарного spIgG к пАГ ( $U = 47$ ,  $p = 0,011$ ) и spIgG к зерновым продуктам ( $U = 56$ ,  $p = 0,027$ ) и самые высокие концентрации spIgG к бродильным продуктам ( $U = 47$ ,  $p = 0,029$ ) (табл. 2).

Концентрации IFN $\gamma$  ( $U = 4$ ,  $p = 0,006$ ) и IL-10 ( $U = 26$ ,  $p = 0,004$ ) были повышенны, а IL-4 ( $U = 28$ ,  $p = 0,001$ ) снижена по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Установлена высокая концентрация spIgG к *C. albicans* (табл. 4). Статистически значимо повышенны показатели, характеризующие протекание воспалительного процесса: общее количество лейкоцитов ( $U = 6$ ,  $p = 0,032$ ), абсолютное количество лейкоцитов – и процесса свертывания крови – фибриноген ( $U = 6$ ,  $p = 0,028$ ) (табл. 5).

Самые высокие концентрации spIgG по сравнению со всеми исследуемыми группами установлены к пАГ бродильных продуктов, что свидетельствует об усилении бродильных процессов в кишечнике, что создает благоприятные условия для роста грибов рода *Candida*, чья концентрация также повышена у данной группы детей.

В группе «Дермато-респираторный тип» у детей в анамнезе жизни имелись указания о наличии кожных высыпаний, дерматитов, посещений врачей аллергологов и дообследование по сопутствующим заболеваниям, связанным с аллергическими воспалениями. В данной группе детей результаты теста АТЕС составили 91 (69–103) балл. Установлены повышенные концентрации суммарного spIgG к пАГ ( $U = 272$ ,  $p = 0,033$ ) и spIgG к бродильным продуктам ( $U = 276$ ,  $p = 0,039$ ). В данной группе обнаружена самая высокая концентрация spIgG к молочным продуктам ( $U = 115$ ,  $p = 0,021$ ) (табл. 2).

Концентрация IL-4 статистически значимо была выше по сравнению с контрольной группой ( $U = 35$ ,  $p = 0,003$ ), «Судорожным типом» и детьми без проявлений ( $U = 101$ ,  $p = 0,001$ ) (табл. 3). Установлены повышенные концентрации IL-17A

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ sIgG К ПИЩЕВЫМ АНТИГЕНАМ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 2. CONCENTRATIONS OF sIgG TO FOOD ANTIGENS IN THE STUDIED GROUPS

Группа Group	1 Судорожный тип Convulsive type	2 Инфекцион- ный тип Infectious type	3 Дermato-ре- спираторный тип Dermato- respiratory type	4 Желудочно- кишечный тип Gastrointestinal type	5 Контрольная группа Control group
<b>Суммарный sIgG, мкг/мл</b> Total sIgG, $\mu$ g/mL	6268 (6099-8548)*	5008 (4062-6333)*	4079 (3680-5222)*	4859 (3888-6287)*	3060 (2152-4537)
<b>sIgG к зерновым продуктам, мкг/мл</b> sIgG to grain products, $\mu$ g/mL	571 (506-874)	778 (352-1261)*	250 (122-342)	551 (281-988)*	194 (106-562)
<b>sIgG к глютену, мкг/мл</b> sIgG to gluten, $\mu$ g/mL	247 (195-273)	275 (244-416)	178 (154-216)	189 (138-294)	157 (106-212)
<b>sIgG к молочным продуктам, мкг/мл</b> sIgG to dairy products, $\mu$ g/mL	932 (759-8548)	1599 (1151-1664)	1776 (1047-2092)*	1559 (718-2541)*	1074 (339-2234)
<b>sIgG к казеину, мкг/мл</b> Casein sIgG, $\mu$ g/mL	236 (211-390)*	163 (130-207)*	170 (146-299)*	201 (134-330)*	140 (107-170)
<b>sIgG к бобовым продуктам, мкг/мл</b> sIgG to legumes, $\mu$ g/mL	346 (286-440)*	363 (225-477)*	332 (234-409)*	305 (148-483)*	149 (44,5-217,5)
<b>sIgG к бродильным продуктам, мкг/мл</b> sIgG to fermentation products, $\mu$ g/mL	601 (548-805)	1125 (678-1236)*	683 (504-722)*	666 (460-846)*	499 (328-646)
<b>sIgG к пасленовым продуктам, мкг/мл</b> sIgG to solanaceae products, $\mu$ g/mL	486 (458-693)*	257 (159-379)	314 (222-354)	142 (121-178)	153 (109-288)

Примечание. \* – уровень значимости  $p < 0,05$ .

Note. \*, significance level  $p < 0.05$ .

ТАБЛИЦА 3. КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 3. CONCENTRATIONS OF CYTOKINES IN THE STUDIED GROUPS

Группа Group	1 Судорожный тип Convulsive type	2 Инфекционный тип Infectious type	3 Дermato-ре- спираторный тип Dermato- respiratory type	4 Желудочно- кишечный тип Gastrointestinal type	5 Контрольная группа Control group
<b>IL-17A, пг/мл</b> IL-17A, pg/mL	7,1 (4,2-16,6)	8,7 (6,2-11,2)	10,6 (8,2-14,3)*	6,1 (3,9-11,8)	6,9 (2,9-15,0)
<b>IL-4, пг/мл</b> IL-4, pg/mL	7,3 (4,6-9,9)*	4,1 (0,9-10,5)*	17,7 (15,6-19,8)*	14,6 (11,1-16,1)	16,3 (15,6-17,1)
<b>IL-6, пг/мл</b> IL-6, pg/mL	15,95 (9,1-22,8)	8,0 (1,4-25,7)	15,3 (4,1-18,0)	12,8 (10,6-17,9)	15,8 (18,3-20,4)
<b>IL-10, пг/мл</b> IL-10, pg/mL	30,8 (23,6-38,0)*	24,4 (19,2-30,7)*	16,2 (12,9-19,1)	17,4 (15,6-21,2)	17,5 (16,3-19,5)
<b>IFN<math>\gamma</math>, пг/мл</b> IFN $\gamma$ , pg/mL	7,9 (4,3-11,4)	24,5 (8,6-25,1)*	13,1 (2,6-15,9)	12,9 (4,7-14,9)	13,4 (11,2-14,2)

Примечание. \* – уровень значимости  $p < 0,05$ .

Note. \*, significance level  $p < 0.05$ .

ТАБЛИЦА 4. КОНЦЕНТРАЦИИ spIgG К CANDIDA ALBICANS В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 4. CONCENTRATIONS OF spIgG TO CANDIDA ALBICANS IN THE STUDIED GROUPS

Группа Group	1 Судорожный тип Convulsive type	2 Инфекционный тип Infectious type	3 Дермато- респираторный тип Dermato- respiratory type	4 Желудочно- кишечный тип Gastrointestinal type	5 Контрольная группа Control group
spIgG к <i>Candida albicans</i> , мкг/мл spIgG to <i>Candida albicans</i> , µg/mL	282 (275-302)*	597 (433-792)*	477 (328-527)*	401 (268-504)*	248 (220-276)

Примечание. \* – уровень значимости  $p < 0,05$ .

Note. \*, significance level  $p < 0.05$ .

( $U = 12$ ,  $p = 0,014$ ) и spIgG к *C. albicans* ( $U = 154$ ,  $p = 0,002$ ) (табл. 5).

В четвертой группе детей «Желудочно-кишечного типа» отмечался самый низкий результат по тестам АТЕС, равный 71 (50-99) баллу и концентрации цитокинов статистически значимо не отличались от контрольной группы, однако в то же время установлены высокие показатели spIgG к пАГ. Суммарный spIgG к пАГ ( $U = 425$ ,  $p = 0,001$ ), концентрация spIgG к зерновым ( $U = 466$ ,  $p = 0,001$ ), молочным ( $U = 66$ ,  $p = 0,001$ ), бобовым ( $U = 556$ ,  $p = 0,017$ ), бродильным ( $U = 564$ ,  $p = 0,022$ ) (табл. 2) продуктам была статистически значимо выше, чем в контрольной группе. Эта группа представляет особый интерес, так как в ней было зарегистрировано самое высокое количество реакций повышенных IgG к наибольшему спектру пАГ. В литературе часто описывается, что у детей с РАС имеется одновременная пищевая гиперчувствительность к зерновым и молочным продуктам, что зарегистрировано именно в данной группе.

При этом в группе детей «Желудочно-кишечного типа» отношение  $IFN\gamma/IL-4$  (0,88) выше, чем  $IFN\gamma/IL-10$  (0,79). Это указывает на дисбаланс цитокинов и активацию провоспалительного типа иммунного ответа по Th1-пути, что также наблюдается и в других исследованиях [30, 32].

## Обсуждение

В литературе описано, что лектины, содержащиеся в бобовых продуктах, повышают проницаемость слизистой кишечника для бактериальных токсинов, агглютинируют эритроциты, вызывая нарушение всасывания в кишечнике. Имеются данные, что рецепторами для лектинов бобовых продуктов являются углеводные рецепторы (С-лектиновые PRR) на энтероцитах кишечника и иммунокомпетентных клетках, активируя ответные реакции на высвобождения аларминов [34].

Наличие повышенных концентраций spIgG к пАГ молочных продуктов и их потенциальная циркуляция может оказывать существенное влияние на когнитивную функцию детей с РАС. Это может быть связано с перекрестной реакцией ИС на белок казеин и основной белок миелина, благодаря схожести их антигенных детерминант. Продукты неполного расщепления казеина – казоморфины из бычьего  $\beta$ -казеина являются опиоидными пептидами, которые связываются с  $\mu$ -опиоидными рецепторами в дофаминергических, серотонинергических и ГАМКергических путях [41].

В сочетании с низким уровнем циркулирующих пептидаз и повышенной проницаемостью гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) это может вызывать накопление опиоидных пептидов в крови и головном мозге. Следствием этого является опиоид-зависимая модуляция нейромедиаторной системы и функционирования центральной нервной системы (ЦНС), что может привести к развитию РАС [20]. Исследования *in vitro* показали, что  $\beta$ -казоморфин-7 может изменять пролиферацию лимфоцитов и вызывать продукцию провоспалительных цитокинов [39].

Употребление в пищу картофеля, содержащего гликоалкалоиды, может значительно усугубить воспаление кишечника. Это показано *in vivo* на мышах с дефицитом гена *IL10*, рацион которых состоял из картофеля [29].

Низкие концентрации IL-4 как нейропротектора, возможно, негативно влияют на функционирование ЦНС. Так, уменьшение концентрации IL-4 приводит к воспалению в менингеальных миелоидных клетках и снижению когнитивных способностей. У мышей с нокаутом гена *IL4* наблюдаются когнитивные нарушения [15].

В то же время повышение концентрации IL-10, возможно, происходит в ответ на воспаление с целью сдерживания эпилепсии, снижения гиперреактивности и противоэпилептических приступов. IL-10 эндогенно высвобождается им-

ТАБЛИЦА 5. ЗНАЧЕНИЯ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 5. VALUES OF CLINICAL AND LABORATORY PARAMETERS IN THE STUDIES GROUPS

Группа Group	1 Судорожный типа Convulsive type	2 Инфекцион- ный тип Infectious type	3 Дермато-ре- спираторный типа Dermato- respiratory type	4 Желудочно- кишечный тип Gastrointestinal type	5 Контрольная группа Control group
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	111 (110-121)	129 (126-129)	123 (119-129)	122 (118-131)	127 (120-129)
Гематокрит, % Hematocrit, %	36 (35-37)	37 (36-39)	38 (35-40)	38 (36-39)	37 (36-39)
Количество эритроцитов, $10^{12}/\text{л}$ RBC count, $10^{12}/\text{L}$	4,7 (4,2-4,7)	4,8 (4,5-5,2)	4,7 (4,3-4,9)	4,6 (4,3-4,8)	4,5 (4,4-4,7)
Ферритин, мкг/л Ferritin, $\mu\text{g}/\text{L}$	23 (19-27)*	44 (35-47)	36 (23-51)	46 (32-66)	42 (40-65)
Сывороточное железо, мкмоль/л Serum iron, $\mu\text{mol}/\text{L}$	15 (14-16)*	21,9 (18,5-23)	14,5 (11,6-16,6)	16 (8-19)	22,1 (18,4-22,7)
СОЭ, см ESR, cm	3 (2-5)	8 (6-10)	5 (2-7)	5 (3-7)	6 (5-7)
Общее количество лейкоцитов, г/л Total number of leukocytes, g/L	7,1 (5,7-8,4)	9,1 (8,1-12,2)*	6,7 (5,5-8,5)	7,2 (5,9-8,9)	5,1 (5,6-6,9)
Абсолютное количество лейкоцитов, $10^9/\text{л}$ Absolute white blood cell count, $10^9/\text{L}$	2,8 (2,5-3,3)	5,0 (4,1-5,6)*	3 (2,5-3,7)	3,0 (2,6-3,7)	2,6 (1,8-3,2)
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	51 (40-52)	48 (35-55)	42 (39-47)	44 (40-50)	44 (37-52)
С-реактивный белок, мг/л C-reactive protein, mg/L	0,7 (0,35-1,35)*	2,10 (2,00-2,45)*	0,95 (0,52-1,15)*	0,8 (0,2-1,2)	0,15 (0,0-0,7)
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/L	2,1 (1,9-2,3)	3,06 (2,90-3,58)*	2,49 (2,40-2,84)	2,7 (2,3-3,3)	2,2 (2,1-2,7)
Общий белок, г/л Total protein, g/L	69 (38-70)	71 (70-74)	67 (65-73)	70 (67-73)	66,5 (64,0-68,2)

Примечание. \* – уровень значимости  $p < 0,05$ .

Note. \*, significance level  $p < 0.05$ .

мунными клетками и глией посредством отрицательной обратной связи при воспалении [21] и вовлечен в патогенез нейроиммунных заболеваний различной этиологии, такие как черепно-мозговая травма, периферическое воспаление, нейродегенерация и аутоиммунный процесс. Общей чертой этих нарушений является недо-

статочность передачи сигналов/биодоступности IL-10 и воспаление [25]. На животных моделях показано, что воспаление способствует развитию эпилепсии и ухудшению ее течения [48].

*C. albicans* имеет схожие антигенные детерминанты с глютеном, что делает возможным перекрестной реакции, в результате чего может

повышаться иммунная агрессия на белки злаковых продуктов, провоцируя симптомы сходные с целиакией [14]. Нарушается нормальное переваривание злаковых продуктов, фруктов и овощей, усиливаются бродильные процессы в толстом кишечнике и нарушается расщепление клетчатки, вследствие чего создаются благоприятные условия для дальнейшего роста гриба *Candida*, который в свою очередь через TLR стимулирует выработку IFN $\gamma$ . IFN $\gamma$  способствует синтезу IgG и активирует макрофаги, экзоцитирующие, наряду с провоспалительными цитокинами, простагландины, усиливающие проницаемость кишечной стенки для нерасщепленных белков пищи и сенсибилизацию к этим белкам, вызывая нарушение пищевой толерантности ко все большему числу продуктов. Поддерживается воспаление и происходит вторичное нарушение пищеварения. Кроме того, в процессе распада органических веществ из глюкозы *C. albicans* производит ацетальдегид, который воздействует на центральную допаминергическую систему, увеличивая уровни допамина, тем самым влияя на когнитивные функции человека, способствуя развитию аутистического поведения.

Стереотипное поведение – один из симптомов РАС, по данным исследований разных авторов, коррелирует со снижением активности TGF- $\beta 1$  и GM-CSF, а также с повышением активности IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL12p40, TNF $\alpha$  и интерферон IFN $\gamma$  [42].

По литературным данным, пациенты с РАС в 1,6 раза чаще страдают экземой и атопическим дерматитом [19], а дети с аллергическими заболеваниями имеют повышенный риск развития РАС [27]. Есть исследования, показывающие, что существует дозозависимая связь между более частыми сопутствующими атопическими заболеваниями и повышенным риском развития СДВГ или РАС в более позднем возрасте по сравнению с детьми, у которых никогда не диагностировались какие-либо аллергические заболевания.

Как известно, аллергическое воспаление связано с активацией тучных клеток и эозинофилов и продукцией IgE. Однако дети с РАС в нашем исследовании не имели статистически значимых повышенных значений общего IgE в сыворотке крови.

В то же время показано, что высокие концентрации IL-4 связаны с риском развития РАС высокой степени тяжести [23], что связано с когнитивными функциями. IL-4 индуцирует дифференцировку Th2 клеток. Впоследствии Th2-клетки производят IL-4, также цитокин производится тучными клетками, эозинофилами и базофилами [52]. Наличие дерматитов связывает вовлечение кожного барьера в течение

основного заболевания как дополнительного шокового органа сенсибилизации.

Однако в группе «Дермато-респираторный тип» также повышены концентрации IL-17A, производимый клетками Th17. Клетки Th17 играют центральную роль в борьбе с внеклеточными патогенами, особенно в тканях слизистых оболочек [50]. Также тучные клетки могут способствовать продукции IL-17A [10, 35, 49]. IL-17A увеличивается в сыворотке крови детей с РАС [1], что наблюдалось и в ранее проведенном нами исследовании [2]. Известные работы связывают повышение концентрации IL-17A с отменой пищевой толерантности, что отражает механизмы реагирования на пищевые продукты с участием Th17. Кроме того, IL-17 является важным медиатором аномалий развития нервной системы, связанных с материнской иммунной активацией во время беременности, и было обнаружено, что IL-17 вызывает пороки развития коры головного мозга [44].

IL-17A действует на эпителиальные, мезенхимальные и иммунные клетки, производя ряд медиаторов воспаления, включая хемоаттрактанты нейтрофилов, моноцитов и факторы роста, антимикробные пептиды и белки острой фазы [50]. Хотя эти медиаторы воспаления помогают поддерживать эффективную защиту от патогенов, нарушение регуляции может привести к чрезмерному воспалению, а Th17-путь иммунорегуляции вовлечен во многие аутоиммунные расстройства, включая те, которые влияют на ЖКТ, такие как болезнь Крона и язвенный колит, поэтому особенно важен для поддержания равновесия между защитой от патогенов и толерантностью к комменсалам [38, 50]. IL-17A, как известно, активируется при некоторых аутоиммунных системных и неврологических заболеваниях [31, 43]. И в нашем исследовании отмечается повышенная концентрация sIgG к *C. albicans* по сравнению со всеми исследуемыми группами, что тоже говорит о вовлечении IL-17A.

Одним из объяснений повышения и IL-4 и IL-17A является способность клеток Th17 легко трансдифференцироваться в Th1. Это дает возможность быстрого перехода от борьбы с внеклеточными патогенами к внутриклеточным [43].

Во многих исследованиях сообщается о дисбалансе как противо-, так и провоспалительных цитокинов при РАС и эти данные довольно противоречивы. Используемое в нашем исследовании разделение детей с РАС на группы позволяет объяснить получаемые различия в концентрациях цитокинов как особые клинико-иммунологические фенотипы течения РАС.

Иммунная гипотеза развития РАС в настоящее время считается основной, и с помощью нее становится возможным объяснить различия

клинических фенотипов и сопутствующих заболеваний, влияющих на течение и тяжесть заболевания. Выделенные фенотипы течения РАС связаны с влиянием пищевых антигенов, отражают особый вариант иммунологического воспалительного патогенеза, что позволяет адаптировать и персонифицировать элиминационные диеты, а значит и образ жизни, предложить мероприятия по коррекции.

## Заключение

Выделенные клинико-иммунологические фенотипы РАС подтверждают современное предположение о необходимости поисков персонифицированных подходов для коррекции основных проявлений аутистических расстройств, обнадеживают поиски биологической терапии и правила формирования профилактических программ для клинико-социальной адаптации таких детей.

## Список литературы / References

1. Розенштейн А.З., Розенштейн М.Ю., Кондаков С.Э., Черевко Н.А. Новый методологический подход к созданию персонифицированной элиминационной диеты при пищевой непереносимости, обусловленной иммунопатологическими реакциями III типа // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9, №. 18. С. 150-153. [Rosensteyn M.Yu., Rosensteyn A.Z., Kondakov S.E., Cherevko N.A. New methodological approach to the creation of a personalized elimination diet in food intolerance caused by type III immunopathological reactions. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9, no. 18, pp. 150-153. (In Russ.)]
2. Худякова М.И., Черевко Н.А., Новиков П.С., Березовская К.В. Особенности цитокинового профиля у детей с расстройством аутистического спектра // Бюллентень сибирской медицины, 2020. Т. 19, №. 4. С. 174-178. [Khudiakova M.I., Cherevko N.A., Novikov P.S., Berezovskaya K.V. Features of the cytokine profile in children with autism spectrum disorder. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2020, Vol. 19, no. 4, pp. 174-178. (In Russ.)]
3. Al-Ayadhi L.Y., Mostafa G.A. Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. *J. Neuroinflam.*, 2012, Vol. 9, no. 1, pp. 1-6.
4. Atladóttir H.O., Schendel D.E., Lauritsen M.B., Henriksen T.B., Parner E.T. Patterns of contact with hospital for children with an autism spectrum disorder: a Danish register-based study. *J. Autism Dev. Disord.*, 2012, Vol. 42, no. 8, pp. 1717-1728.
5. Baio J., Wiggins L., Christensen D.L., Maenner M.J., Daniels J., Warren Z., Kurzius-Spencer M., Zahorodny W., Rosenberg C.R., White T., Durkin M., Imm P., Nikolaou L., Yeargin-Allsopp M., Lee L., Harrington L., Lopez M., Fitzgerald R., Hewitt A., Pettygrove S., Constantino J., Vehorn A., Shenouda J., Hall-Lande J., Naarden B.K., Dowling N.F. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years – autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2014. *MMWR Surveill. Summ.*, 2018, Vol. 67, no. 6, pp. 1-23.
6. Binienda A., Twardowska A., Makaro A., Salaga M. Dietary carbohydrates and lipids in the pathogenesis of leaky gut syndrome: an overview. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 21, 8368. doi: 10.3390/ijms21218368.
7. Bolto P.F., Carcaci-Rathwell I., Hutton J., Goode S., Howlin P., Rutter M. Epilepsy in autism: features and correlates. *Br. J. Psychiatry*, 2011, Vol. 198, no. 4, pp. 289-294.
8. Buffington S.A., di Prisco G.V., Auchtung T.A., Ajami N.J., Petrosino J.F., Costa-Mattioli M. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. *Cell*, 2016, Vol. 165, no. 7, pp. 1762-1775.
9. Buie T., Campbell D.B., Fuchs III G.J., Furuta G.T., Levy J., VandeWater J., Whitaker A.H., Atkins D., Bauman M.L., Beaudet A.L., Carr E.G., Gershon M.D., Hyman S.L., Jirapinyo P., Jyonouchi H., Kooros K., Kushak R., Levitt P., Levy S.E., Lewis J.E., Murray K.F., Natowicz M.R., Sabra A., Wershil B.K., Weston S.C., Zeltzer L., Winter H. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics*, 2010, Vol. 125, Suppl. 1, pp. S1-S18.
10. Careaga M., Rogers S., Hansen R.L., Amaral D.G., van de Water J., Ashwood P. Immune endophenotypes in children with autism spectrum disorder. *Biol. Psychiatry*, 2017, Vol. 81, no. 5, pp. 434-441.
11. Chen M.H., Su T.P., Chen Y.S., Hsu J.W., Huang K.L., Chang W.H., Chen T., Pan T., Bai, Y.M. Is atopy in early childhood a risk factor for ADHD and ASD? A longitudinal study. *J. Psychosom. Res.*, 2014, Vol. 77, no. 4, pp. 316-321.
12. Chen X., Churchill M.J., Nagar K.K., Tailor Y.H., Chu T., Rush B.S., Jiang Z., Wang E.B., Renz B.W., Wang H., Fung M.C., Worthley D.L., Mukherjee S., Wang T.C. IL-17 producing mast cells promote the expansion of myeloid-derived suppressor cells in a mouse allergy model of colorectal cancer. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, pp. 32966-32979.
13. Chisholm K., Lin A., Abu-Akel A., Wood S.J. The association between autism and schizophrenia spectrum disorders: A review of eight alternate models of co-occurrence. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2015, Vol. 55, pp. 173-183.
14. Corouge M., Loridant S., Corouge M., Loridant S., Fradin C., Salleron J., Damiens S., Moragues M.D., Souplet V., Jouault T., Robert R., Dubucquois S., Sendid B., Colombel J.F., Poulain D. Humoral immunity links *Candida albicans* infection and celiac disease. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 3, e0121776. doi: 10.1371/journal.pone.0121776.
15. Derecki N.C., Cardani A.N., Yang C.H., Quinones K.M., Crihfield A., Lynch K.R., Kipnis J. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J. Exp. Med.*, 2010, Vol. 207, no. 5, pp. 1067-1080.
16. Doshi-Velez F., Ge Y., Kohane I. Comorbidity clusters in autism spectrum disorders: an electronic health record time-series analysis. *Pediatrics*, 2014, Vol. 133, no. 1, pp. e54-e63.

17. Fattorusso A., di Genova L., Dell'Isola G.B., Mencaroni E., Esposito S. Autism spectrum disorders and the gut microbiota. *Nutrients*, 2019, Vol. 11, no. 3, 521. doi: 10.3390/nu11030521.
18. Inscoe J.R., Bones C. Additional difficulties associated with aetiologies of deafness: outcomes from a parent questionnaire of 540 children using cochlear implants. *Cochlear Implants Int.*, 2016, Vol. 17, no. 1, pp. 21-30.
19. Isaksen J., Bryn V., Diseth T.H., Heiberg A., Schjølberg S., Skjeldal O.H. Children with autism spectrum disorders – the importance of medical investigations. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, 2013, Vol. 17, no. 1, pp. 68-76.
20. Jarmołowska B., Bukał M., Fiedorowicz E., Cieślińska A., Kordulewska N.K., Moszyńska M., Kostyra E. Role of milk-derived opioid peptides and proline dipeptidyl peptidase-4 in autism spectrum disorders. *Nutrients*, 2019, Vol. 11, no. 1, 87. doi: 10.3390/nu11010087.
21. Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M., Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.*, 2011, Vol. 91, no. 2, pp. 461-553.
22. Kohane I.S., McMurry A., Weber G., MacFadden D., Rappaport L., Kunkel L., Bickel J., Wattanasin N., Spence S., Murphy S., Churchill S. The co-morbidity burden of children and young adults with autism spectrum disorders. *PloS One*, 2012, Vol. 7, no. 4, e33224. doi: 10.1371/journal.pone.0033224.
23. Krakowiak P., Goines P.E., Tancredi D.J., Ashwood P., Hansen R.L., Hertz-Pannier I., van de Water J. Neonatal cytokine profiles associated with autism spectrum disorder. *Biol. Psychiatry*, 2017, Vol. 81, no. 5, pp. 442-451.
24. Kushak R.I., Buie T.M., Murray K.F., Newburg D.S., Chen C., Nestoridi E., Winter H.S. Evaluation of intestinal function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2016, Vol. 62, no. 5, pp. 687-691.
25. Kwilas A.J., Grace P.M., Serbedzija P., Maier S.F., Watkins L.R. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology*, 2015, Vol. 96, pp. 55-69.
26. Lee B.H., Smith T., Paciorkowski A.R. Autism spectrum disorder and epilepsy: disorders with a shared biology. *Epilepsy Behav.*, 2015, Vol. 47, pp. 191-201.
27. Lee C.Y., Chen M.H., Jeng M.J., Hsu J.W., Tsai S.J., Bai Y.M., Hung G., Yen H., Chen T., Su T.P. Longitudinal association between early atopic dermatitis and subsequent attention-deficit or autistic disorder: A population-based case-control study. *Medicine (Baltimore)*, 2016, Vol. 95, no. 39, e5005. doi: 10.1097/MD.00000000000005005.
28. Lintas C., Altieri L., Lombardi F., Sacco R., Persico A.M. Association of autism with polyomavirus infection in postmortem brains. *J. Neurovirol.*, 2010, Vol. 16, no. 2, pp. 141-149.
29. Lyte M. Microbial endocrinology and nutrition: a perspective on new mechanisms by which diet can influence gut-to-brain communication. *PharmaNutrition*, 2013, Vol. 1, no. 1, pp. 35-39.
30. Manzardo A.M., Henkhaus, R., Dhillon S., Butler M.G. Plasma cytokine levels in children with autistic disorder and unrelated siblings. *Int. J. Devl. Neurosci.*, 2012, Vol. 30, no. 2, pp. 121-127.
31. Masi A., Glazier N., Dale R., Guastella A.J. The immune system, cytokines, and biomarkers in autism spectrum disorder. *Neurosci. Bull.*, 2017, Vol. 33, no. 2, pp. 194-204.
32. Meltzer A., van de Water J. The role of the immune system in autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology*, 2017, Vol. 42, no. 1, pp. 284-298.
33. Ming X., Brimacombe M., Chaaban J., Zimmerman-Bier B., Wagner G.C. Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *J. Child Neurol.*, 2008, Vol. 23, no. 1, pp. 6-13.
34. Mishra A., Behura A., Mawatwal S., Kumar A., Naik L., Mohanty S.S., Manna D., Dokania P., Mishra A., Patra S., Dhiman R. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food Chem. Toxicol.*, 2019, Vol. 134, 110827. doi: 10.1016/j.fct.2019.110827.
35. Miyazaki C., Koyama M., Ota E., Swa T., Amiya R.M., Mlunde L.B., Tachibana Y., Yamamoto-Hanada K., Mori R. Allergies in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Rev. J. Autism Dev. Disord.*, 2015, Vol. 2, no. 4, pp. 374-401.
36. Mpaka D.M., Okitundu D.L.E.A., Ndjukendi A.O., N'situ A.M., Kinsala S.Y., Mukau J.E., Ngoma V.M., Kashala-Abotnes E., Ma-Miezi-Mampunza S., Vogels A., Steyaert J. Prevalence and comorbidities of autism among children referred to the outpatient clinics for neurodevelopmental disorders. *Pan Afr. Med. J.*, 2016, Vol. 25, 82. doi: 10.11604/pamj.2016.25.82.4151.
37. Nakae S., Suto H., Berry G.J., Galli S.J. Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OTII mice. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 9, pp. 3640-3648.
38. Omenetti S., Pizarro T.T. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 639. doi: 10.3389/fimmu.2015.00639.
39. Pal S., Woodford K., Kukuljan S., Ho S. Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients*, 2015, Vol. 7, no. 9, pp. 7285-7297.
40. Pan P.Y., Tammimies K., Bölte S. The association between somatic health, autism spectrum disorder, and autistic traits. *Behav. Genet.*, 2020, Vol. 50, no. 4, pp. 233-246.
41. Reichelt K.L., Tveiten Bioengineer D., Knivsberg A.M., Brønstad G. Peptides' role in autism with emphasis on exorphins. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2012, Vol. 23, no. 1, 18958. doi: 10.3402/mehd.v23i0.18958.
42. Robinson-Agramonte M.D.L.A., Noris García E., Fraga Guerra J., Vega Hurtado Y., Antonucci N., Semprún-Hernández N., Schultz S., Siniscalco D. Immune dysregulation in autism spectrum disorder: what do we know about it? *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 6, 3033. doi: 10.3390/ijms23063033.
43. Rose D.R., Yang H., Careaga M., Angkustsiri K., van de Water J., Ashwood P. T cell populations in children with autism spectrum disorder and co-morbid gastrointestinal symptoms. *Brain Behav. Immun. Health*, 2020, Vol. 2, 100042. doi: 10.1016/j.bbih.2020.100042.

44. Rudolph M.D., Graham A.M., Feczko E., Miranda-Dominguez O., Rasmussen J.M., Nardos R., Entringer S., Wadhwa P.D., Buss C., Fair D.A. Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. *Nat. Neurosci.*, 2018, Vol. 21, no. 5, pp. 765-772.
45. Sabourin K.R., Reynolds A., Schendel D., Rosenberg S., Croen L.A., Pinto-Martin J.A., Schieve L.A., Newschaffer C., Lee L., DiGuiseppi, C. Infections in children with autism spectrum disorder: Study to Explore Early Development (SEED). *Autism Res.*, 2019, Vol. 12, no. 1, pp. 136-146.
46. Sharp W.G., Jaquess D.L., Lukens C.T. Multi-method assessment of feeding problems among children with autism spectrum disorders. *Res. Autism Spectr. Disord.*, 2013, Vol. 7, no. 1, pp. 56-65.
47. van Eeghen A.M., Pulsifer M.B., Merker V.L., Neumeyer A.M., van Eeghen E.E., Thibert R.L., Cole A.J., Leigh F.A., Plotkin S.R., Thiele E.A. Understanding relationships between autism, intelligence, and epilepsy: a cross-disorder approach. *Dev. Med. Child Neurol.*, 2013, Vol. 55, no. 2, pp. 146-153.
48. Vezzani A., Lang B., Aronica E. Immunity and inflammation in epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2015, Vol. 6, no. 2, a022699. doi: 10.1101/csdperspect.a022699.
49. Viscidi E.W., Triche E.W., Pescosolido M.F., McLean R.L., Joseph R.M., Spence S.J., Morrow E.M. Clinical characteristics of children with autism spectrum disorder and co-occurring epilepsy. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 7, e67797. doi: 10.1371/journal.pone.0067797.
50. Viscidi E.W., Triche E.W., Pescosolido M.F., McLean R.L., Joseph R.M., Spence S.J., Morrow E.M. Clinical characteristics of children with autism spectrum disorder and co-occurring epilepsy. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 7, e67797. doi: 10.1371/journal.pone.0067797.
51. Ye C.J., Feng T., Kwon H.K., Raj T., Wilson M.T., Asinovski N., McCabe C., Lee M.H., Frohlich I., Paik H., Zaitlen N., Hacohen N., Stranger B., Jager D., Mathis D., Regev A., Benoist C. Intersection of population variation and autoimmunity genetics in human T cell activation. *Science*, 2014, Vol. 345, no. 6202, 1254665. doi: 10.1126/science.1254665.
52. Zhu J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*, 2015, Vol. 75, no. 1, pp. 14-24.

**Авторы:**

**Черевко Н.А.** – д.м.н., профессор кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Худякова М.И.** – соискатель кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Климов В.В.** – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Новиков П.С.** – соискатель кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующий клинико-диагностической лабораторией ООО «Центр семейной медицины», г. Томск, Россия

**Никитина А.А.** – семейный врач, заведующая дневным стационаром ООО «Центр семейной медицины», г. Томск, Россия

**Березовская К.В.** – врач общей врачебной практики, врач-педиатр ООО «Центр семейной медицины», г. Томск, Россия

**Кошкарова Н.С.** – к.м.н., доцент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Денисов А.А.** – д.м.н., профессор кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

**Authors:**

**Cherevko N.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Khudiakova M.I.**, External PhD Student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Klimov V.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Novikov P.S.**, PhD Applicant, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University; Head, Clinical Diagnostic Laboratory, Center for Family Medicine LLC, Tomsk, Russian Federation

**Nikitina A.A.**, Family Doctor, Head of the Day Hospital, Center for Family Medicine LLC, Tomsk, Russian Federation

**Berezovskaya K.V.**, General Practitioner, Pediatrician, Center for Family Medicine LLC, Tomsk, Russian Federation

**Koshkarova N.S.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Denisov A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Allergology and Immunology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 30.09.2022

Принята к печати 08.11.2022

Дата онлайн-публикации 14.11.2022

Received 30.09.2022

Accepted 08.11.2022

Date of publication online 14.11.2022

# КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ *MMP2, MMP3, MMP9* И ТКАНЕВЫХ ИНГИБИТОРОВ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ *TIMP1, TIMP2* У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ

Шевченко А.В.<sup>1</sup>, Прокофьев В.Ф.<sup>1</sup>, Коненков В.И.<sup>1</sup>, Черных В.В.<sup>2</sup>,  
Ермакова О.В.<sup>2</sup>, Трунов А.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский филиал ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Аномальная экспрессия матриксных металлопротеиназ (ММР) в водянистой влаге у пациентов с глаукомой может влиять на регуляцию внутриглазного давления (ВГД). Активность ММР регулируется тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMP). Нарушение баланса между тканевыми ингибиторами металлопротеиназ и матриксными металлопротеиназами могут способствовать развитию глаукомы. Генетические факторы, включая полиморфизм генов матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов, могут регулировать уровень их экспрессии, тем самым влияя на восприимчивость к заболеванию.

Цель исследования – комплексный анализ полиморфизма генов *MMP2* (rs243865), *MMP3* (rs3025058), *MMP9* (rs3918242) и генов ингибиторов *TIMP1* (rs4898), *TIMP2* (rs8179090) у пациентов с диагнозом II (развитой) стадии первичной открытоугольной глаукомы.

Обследованы 99 пациентов (52 мужчины и 47 женщин) с верифицированным диагнозом II стадии первичной открытоугольной глаукомы. Группу сравнения составили 100 человек (81 женщина и 19 мужчин) без офтальмопатологий соответствующего группе пациентов возраста. Однонуклеотидный полиморфизм промоторного региона генов *MMP2*, *TIMP1*, *TIMP2* анализировали методом TaqMan зондов, генов *MMP3*, *MMP9* – методом рестриктазного анализа продуктов амплификации. Статисти-

#### Адрес для переписки:

Шевченко Алла Владимировна  
Научно-исследовательский институт клинической  
и экспериментальной лимфологии  
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.  
Тел.: 8 (952) 901-36-80.  
E-mail: shalla64@mail.ru

#### Address for correspondence:

Alla V. Shevchenko  
Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology  
2 Timakov St  
Novosibirsk  
630060 Russian Federation  
Phone: +7 (952) 901-36-80.  
E-mail: shalla64@mail.ru

#### Образец цитирования:

А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев, В.И. Коненков,  
В.В. Черных, О.В. Ермакова, А.Н. Трунов  
«Комплексный анализ полиморфизма генов матриксных  
металлопротеиназ *MMP2, MMP3, MMP9* и тканевых  
ингибиторов металлопротеиназ *TIMP1, TIMP2* у  
пациентов с первичной открытоугольной глаукомой»  
// Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2.  
С. 331-338. doi: 10.15789/1563-0625-CSO-2571

© Шевченко А.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

#### For citation:

A.V. Shevchenko, V.F. Prokofiev, V.I. Konenkov,  
V.V. Chernykh, O.V. Ermakova, A.N. Trunov “Complex  
studies on gene polymorphisms of *MMP2, MMP3, MMP9*  
matrix metalloproteinases and *TIMP1, TIMP2* tissue inhibitors  
of metalloproteinases in the patients with primary open-angle  
glaucoma”, Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya  
Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 331-338.  
doi: 10.15789/1563-0625-CSO-2571

© Shevchenko A.V. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-CSO-2571

ческая обработка проводилась с помощью специализированного пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 23. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Выявлены различия в распределении *MMP2 rs243865* со снижением частоты *TT* генотипа у пациентов и, напротив, увеличение в этой группе гетерозиготности. Кроме того, частота *TIMP1 rs4898* гетерозиготного генотипа снижалась в данной группе относительно контроля. Четыре комплекса *MMP/TIMP* позитивно ассоциированы с развитием патологии. Из них два двухлокусные: *MMP2-1306TC:TIMP2-418GG* и *MMP3-11715A6A:TIMP1 372CC* и два трехлокусных: *MMP2-1306TC:MMP9-1562CC:TIMP2-418GG* и *MMP3-11715A6A:MMP9-1562CC:TIMP1 372CC*. Выявлено девять комплексов *MMP/TIMP*, частота которых у пациентов с глаукомой достоверно снижена относительно контрольной группы.

Полиморфизм регуляторных регионов генов *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* генов их ингибиторов *TIMP1*, *TIMP2* можно рассматривать как потенциальные факторы риска развития ПОУГ, связанные с дисбалансом *MMP/TIMP* активности.

*Ключевые слова:* первичная открытоугольная глаукома, полиморфизм, гены матриксных металлопротеиназ, гены ингибиторов матриксных металлопротеиназ

## COMPLEX STUDIES ON GENE POLYMORPHISMS OF *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* MATRIX METALLOPROTEINASES AND *TIMP1*, *TIMP2* TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES IN THE PATIENTS WITH PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

Shevchenko A.V.<sup>a</sup>, Prokofiev V.F.<sup>a</sup>, Konenkov V.I.<sup>a</sup>, Chernykh V.V.<sup>b</sup>,  
Ermakova O.V.<sup>b</sup>, Trunov A.N.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> S. Fyodorov National Medical Research Center of Eye Microsurgery, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Abnormal expression of matrix metalloproteinases (MMP) in watery moisture in patients with glaucoma may affect regulation of intraocular pressure (IOP). MMP activity is regulated by tissue metalloproteinase inhibitors (TIMP). The imbalance between tissue metalloproteinase inhibitors and matrix metalloproteinases may contribute to the development of glaucoma. Genetic factors, including polymorphism of matrix metalloproteinase genes and their inhibitors genes, can regulate the level of their expression, thereby affecting susceptibility to disease. Our aim was to perform comprehensive analysis of the *MMP2* (rs243865), *MMP3* (rs3025058), *MMP9* (rs3918242) polymorphisms, and *TIMP1* (rs4898), *TIMP2* (rs8179090) tissue inhibitor genes polymorphisms in the patients with stage II (advanced) primary open-angle glaucoma.

99 patients (52 men and 47 women) with a verified diagnosis of stage II primary open-angle glaucoma were examined. The comparison group consisted of 100 age-matched persons (81 women and 19 men) without ophthalmic disorders. The single-nucleotide polymorphisms in promoter regions of *MMP2*, *TIMP1*, *TIMP2* genes were analyzed by the TaqMan method, the *MMP3* and *MMP9* genes, by means of restriction fragment length polymorphism technique. Statistical evaluation was carried out using the specialized package of IBM SPSS Statistics 23 programs. The critical level of significance was assumed to be 0.05.

The differences in the distribution of *MMP2 rs243865* allelotypes with decreased frequency of *TT* genotype were found in the patient group and, *vice versa*, increased heterozygosity rates were revealed among them. In addition, the frequency of *TIMP1 rs4898* heterozygous genotype was decreased in this group as compared to control sample. Four *MMP/TIMP* complex genotypes are positively associated with the development of pathology. Two of them were of bilocus type, i.e., *MMP2-1306TC:TIMP2-418GG*, and *MMP3-11715A6A:TIMP1 372CC* whereas two three-locus constellations were revealed, i.e., *MMP2-1306TC:MMP9-1562CC:TIMP2-372CC*.

418GG, and *MMP3-1171A6A:MMP9-1562CC:TIMP1 372CC*. There are nine MMP/TIMP complexes, the frequency of which in patients with glaucoma was significantly reduced when compared with control group.

Polymorphism of regulatory regions of *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* genes and distinct gene variants of their inhibitors (*TIMP1*, *TIMP2* genes) can be considered potential markers of the POAG development associated with an imbalance of MMP/TIMP activities.

*Keywords:* glaucoma, primary open-angle, gene polymorphism, matrix metalloproteinases, matrix metalloproteinase inhibitors

## Введение

Согласно последнему отчету GlobalData количество общих случаев (диагностированных и не диагностированных) первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ), являющейся ведущей причиной необратимой слепоты в мире, будет увеличиваться с годовым темпом роста на 2% с примерно 7,3 млн случаев в 2020 г. до 8,84 млн в 2030 г. [4, 6]. В то время как основным фактором риска возникновения и прогрессирования заболевания является повышенное внутриглазное давление (ВГД), патогенез заболевания многофакторный и до сих пор недостаточно изученный [18]. При глаукоме происходят патологические изменения в трабекулярной сети и юкстаканаликулярной ткани угла камеры. Дренаж водянистой влаги находится под влиянием внутриклеточного матрикса (ВКМ), который модулирует отток из передней камеры через иридо-роговичный угол дренажа для регулирования ВГД. Показано, что аномальная экспрессия матриксных металлопротеиназ (ММР) в водянистой влаге у пациентов с глаукомой может влиять на регуляцию ВГД [19]. Активность ММР регулируется двумя основными типами эндогенных ингибиторов,  $\alpha$ 2-макроглобулином и тканевыми ингибиторами металлопротеиназы (TIMP). Идентифицированы четыре гомологичных TIMP (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 и TIMP-4); которые связывают ММР в стехиометрии 1:1 и приводят к обратимому ингибированию ММР. Каждый TIMP может ингибировать несколько ММР с разной специфичностью и аффинностью, а соотношение ММР:TIMP часто определяет степень оборота ВКМ [3, 5, 17]. Проведенные исследования показали, что нарушение баланса между тканевыми ингибиторами металлопротеиназ и матриксными металлопротеиназами могут способствовать развитию глаукомы [16, 17].

Геномные исследования последних лет выявили доказательства генетического вклада в патогенез глаукомы [9, 13, 20]. Работы в области клеточной биологии показали, что полиморфизм генов матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов может влиять на уровень их экспрессии, тем самым реализуя конституциональную предрасположенность к формированию данного заболевания [9, 19]. Однако исследования взаимосвязи между полиморфизмом генов как ма-

триксных металлопротеиназ, так и их ингибиторов с риском развития глаукомы, показывают неоднозначные результаты, что может быть связано с этническими и географическими различиями среди разных групп населения [20]. Кроме того, в проведенных исследованиях не учитывается одновременное носительство функционально связанных полиморфных генов ММР/TIMP у пациентов с ПОУГ, а представлены данные о характере распределения вариантов отдельных генетических локусов. Между тем, именно полигенные факторы являются наиболее значимыми в формировании генетической предрасположенности к развитию заболеваний.

Исходя из этого, нами была сформулирована **цель настоящего исследования** – проведение комплексного анализа полиморфизма генов *MMP2-1306* (*r 243865*), *MMP3-1171* (*rs3025058*), *MMP9-1562* (*rs3918242*) и генов ингибиторов *TIMP-1* (*rs4898*), *TIMP-2* (*rs8179090*) у пациентов с диагнозом II (развитой) стадии первичной открытоугольной глаукомы.

## Материалы и методы

### Пациенты

Обследованы 99 пациентов (52 мужчины и 47 женщин) с верифицированным на основании офтальмологического обследования диагнозом II (развитой) стадии первичной открытоугольной глаукомы [1]. Группу сравнения составили 100 человек (81 женщина и 19 мужчин) без офтальмопатологий соответствующего группе пациентов возраста. Критериями исключения для обеих групп являлись: острые и обострения хронических воспалительных заболеваний органа зрения, наличие диабетической ретинопатии, неоваскулярной глаукомы, увеита различной этиологии и локализации, гемофтальма, аутоиммунных и опухолевых процессов любой локализации, сахарного диабета без офтальмологических проявлений. Исследование было одобрено комитетами по биомедицинской этике Новосибирского филиала ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» и НИИКЭЛ – филиала ФГБНУ «ФИЦ ИЦИГ СО РАН». У всех пациентов было получено информированное согласие на забор крови и использование данных исследования в научных целях.

### Генотипирование

Однонуклеотидный полиморфизм промоторного региона генов *MMP2-1306 C/T*, *TIMP1 372C/T*, *TIMP2-418G/C* анализировали методом TaqMan зондов («Синтол», Россия) с помощью Real-Time ПЦР с использованием коммерческих тест-систем на амплификаторе «ДТ-96» (ДНК-Технология) согласно инструкции производителя. Определение полиморфизма промоторного региона генов *MMP3-1171 5A/6A*, *MMP9-1562C/T* осуществляли методом рестриктазного анализа продуктов амплификации [14]. Электрофорез проводили в 2,5% агарозном геле. Статистическая обработка. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Частоту встречаемости отдельных генотипов и комплексов определяли как процентное отношение индивидов, несущих генотип/комплекс генотипов, к общему числу обследованных в группе. Достоверность различий частот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по критерию  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность и двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц.

Статистическая обработка проводилась с помощью специализированного пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 23. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

### Результаты

Нами был проанализирован характер распределения генотипов генов матриксных металлопротеиназ *MMP2 rs243865*, *MMP3 rs3025058*, *MMP9 rs3918242* совместно с генами их ингибиторов *TIMP1 rs4898*, *TIMP2 rs8179090* в группе пациентов с открытоугольной формой глаукомы относительно контрольной группы. Частоты генотипов в анализируемой группе пациентов соответствовали равновесию Харди–Вайнберга. При сравнении между группами выявлены различия в распределении *MMP2 rs243865* со снижением частоты *TT* гомозиготного генотипа у пациентов с ПОУГ и, напротив, увеличение в этой группе гетерозиготности (OR = 0,24 p = 0,0140 и OR = 2,01 p = 0,0204 соответственно). Кроме того, частота *TIMP1 rs4898* гетерозиготного генотипа снижалась в данной группе относительно контроля (OR = 0,46 p = 0,0190) (табл. 1). Учи-

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *MMP* И *TIMP* СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ГЛАУКОМОЙ И БЕЗ

TABLE 1. FREQUENCY OF DISTRIBUTION OF *MMP* AND *TIMP* GENOTYPES AMONG PATIENTS WITH AND WITHOUT GLAUCOMA

Полиморфная позиция Polymorphic position	Генотип Genotype	Пациенты с ПОУГ Patients with POAG n = 99 (%)	Пациенты без ПОУГ Patients without POAG n = 100 (%)	OR	95%CI	p
<i>MMP2-1306</i>	<i>TT</i>	4 (4,04)	15 (15,00)	0,24	0,08-0,75	0,0140
<i>MMP2-1306</i>	<i>TC</i>	47 (47,47)	31 (31,00)	2,01	1,13-3,59	0,0204
<i>MMP2-1306</i>	<i>CC</i>	48 (48,48)	54 (54,00)	0,80	0,46-1,40	0,4795
<i>MMP3-1171</i>	<i>55</i>	22 (22,45)	20 (20,00)	1,16	0,59-2,29	0,7296
<i>MMP3-1171</i>	<i>56</i>	49 (50,00)	52 (52,00)	0,92	0,53-1,61	0,8870
<i>MMP3-1171</i>	<i>66</i>	27 (27,55)	28 (28,00)	0,98	0,52-1,82	1,0000
<i>MMP9-1562</i>	<i>CC</i>	72 (72,73)	65 (65,00)	1,44	0,79-2,63	0,2845
<i>MMP9-1562</i>	<i>CT</i>	25 (25,25)	31 (31,00)	0,75	0,40-1,40	0,4312
<i>MMP9-1562</i>	<i>TT</i>	2 (2,02)	4 (4,00)	0,49	0,09-2,77	0,6827
<i>TIMP1 372</i>	<i>CC</i>	35 (35,35)	27 (27,00)	1,48	0,81-2,70	0,2232
<i>TIMP1 372</i>	<i>CT</i>	21 (21,21)	37 (37,00)	0,46	0,24-0,86	0,0190
<i>TIMP1 372</i>	<i>TT</i>	43 (43,43)	36 (36,00)	1,37	0,77-2,41	0,3123
<i>TIMP2-418</i>	<i>GG</i>	93 (93,94)	95 (95,00)	0,82	0,24-2,77	0,7673
<i>TIMP2-418</i>	<i>GC</i>	6 (6,06)	5 (5,00)	1,55	0,42-5,66	0,5371
<i>TIMP2-418</i>	<i>CC</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0,50	0,04-5,60	1,0000

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ ГЕНОТИПОВ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ГЕНОВ МЕЖДУ ГРУППАМИ С ГЛАУКОМОЙ И БЕЗ

TABLE 2. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION OF COMPLEX GENOTYPES OF THE ANALYZED GENES BETWEEN GROUPS WITH AND WITHOUT GLAUCOMA

Полиморфная позиция Polymorphic position	Генотип Genotype	Пациенты с ПОУГ Patients with POAG n = 99 (%)	Пациенты без ПОУГ Patients without POAG n = 100 (%)	OR	OR_CI95	P_TMF2
<b>Негативно ассоциированные с глаукомой генотипы</b> Negatively associated with glaucoma genotypes						
<i>MMP2-1306:TIMP1 372</i>						
	TT-CT	1 (1,01)	8 (8,00)	0,12	0,01-0,96	0,0349
<i>MMP2-1306:TIMP2-418</i>	TT-GG	4 (4,04)	14 (14,00)	0,26	0,08-0,82	0,0238
<i>MMP3-1171:TIMP1 372</i>	5A6A-CT	9 (9,18)	24 (24,00)	0,32	0,14-0,73	0,0070
<i>MMP9-1562:TIMP1 372</i>	CC-CT	13 (13,13)	26 (26,00)	0,43	0,21-0,90	0,0313
<i>MMP2-1306:TIMP1 372:TIMP2-418</i>	TT-CT-GG	1 (1,01)	8 (8,00)	0,12	0,01-0,96	0,0349
<i>MMP3-1171:MMMP9-1562:TIMP1 372</i>	5A6A-CC-CT	4 (4,08)	17 (17,00)	0,21	0,07-0,64	0,0046
<i>MMP3-1171:TIMP1 372:TIMP2-418</i>	5A6A-CT-GG	9 (9,18)	23 (23,00)	0,34	0,15-0,78	0,0114
<i>MMP9-1562:TIMP1 372:TIMP2-418</i>	CC-CT-GG	12 (12,12)	25 (25,00)	0,41	0,19-0,88	0,0279
<i>MMP3-1171:MMMP9-1562:TIMP1 372:TIMP2-418</i>	5A6A-CC-CT-GG	4 (4,08)	16 (16,00)	0,22	0,07-0,69	0,0081
<b>Позитивно ассоциированные с глаукомой генотипы</b> Positively associated with glaucoma genotypes						
<i>MMP2-1306:TIMP2-418</i>	TC-GG	44 (44,44)	30 (30,00)	1,87	1,04-3,34	0,0405
<i>MMP3-1171:TIMP1 372</i>	5A6A-CC	22 (22,45)	11 (11,00)	2,34	1,07-5,14	0,0363
<i>MMP2-1306:MMMP9-1562:TIMP2-418</i>	TC-CC-GG	33 (33,33)	20 (20,00)	2,00	1,05-3,81	0,0378
<i>MMP3-1171:MMMP9-1562:TIMP1 372</i>	5A6A-CC-CC	16 (16,33)	7 (7,00)	2,59	1,02-6,61	0,0473

тывая, что регуляция активности *MMP* осуществляется тканевыми ингибиторами матриксных металлопротеиназ *TIMP*, а роль совместного носительства различных вариантов генов *MMP/TIMP* в развитии глаукомы остается неясной, мы провели анализ связанного присутствия комплекса полиморфных вариантов исследуемых локусов в геноме обследованных нами пациентов (табл. 2). Установлено, что только четыре комплекса *MMP/TIMP* позитивно ассоциированы с развитием данной патологии. Из них два двухлокусные: *MMP2-1306TC:TIMP2-418GG* и *MMP3-11715A6A:TIMP1 372CC* (OR = 1,87 p = 0,0405 OR = 2,34 p = 0,0363 соответственно) и два трехлокусных: *MMP2-1306TC:MMMP9-1562CC:TIMP2-418GG* и *MMP3-11715A6A:MMMP9-1562CC:TIMP1 372CC* (OR = 2,00 p = 0,0378 и OR = 2,59 p = 0,0473 соответственно). Выявлено девять комплексов *MMP/TIMP*, частота которых у пациентов с глаукомой достоверно снижена относительно контрольной группы. Наиболее высокий уровень достоверности различий установлен в комплексах *MMP3-11715A6A:TIMP1 372CT* (OR = 0,32

p = 0,0070), *MMP3-11715A6A:MMMP9-1562CC:TIMP1 372CT* (OR = 0,21 p = 0,0046) и *MMP3-11715A6A:MMMP9-1562CC:TIMP1 372CT:TIMP2-418GG* (OR = 0,22 p = 0,0081).

## Обсуждение

Не вызывает сомнения, что генетические факторы играют важную роль в развитии ПОУГ. Для исследования в нашей работе в качестве генов-кандидатов выбраны гены матриксных металлопротеиназ и гены-ингибиторы матриксных металлопротеиназ, поскольку взаиморегуляция протеомных продуктов данных генов может привести к динамическому дисбалансу между синтезом и деградацией внеклеточного матрикса и тем самым способствовать развитию заболевания [11]. На сегодняшний день, несмотря на доказанное вовлечение белковых продуктов *MMP* и *TIMP* в развитие патологии, исследований корреляции полиморфизма генов с ПОУГ недостаточно и данные не однозначны. В ряде исследований выявлено несколько однонуклеотидных полиморфизмов генов, кодирующих *MMP* и

TIMP ассоциированных с ПОУГ [9, 10]. Однако данных об отсутствии значимых связей полиморфизма генов металлопротеиназ и их основных ингибиторов не меньше [19]. Поэтому, как нам кажется, важно учитывать одновременное носительство в геноме пациента комплекса генетических полиморфных вариантов, продукты которых участвуют в процессах дегенерации матрикса при развитии ПОУГ. Это обусловлено тем, что для физиологического функционирования организма человека необходима строгая и многоуровневая регуляция MMP. Поэтому существует очень сложная протеазная сеть, которая может запускать протеолитическое расщепление всего ВКМ [15]. Она включает как взаимное регулирование активности другими MMP, так и активно регулируется посредством TIMP. При этом разные TIMP обладают различной силой влияния на металлопротеиназы. Так, TIMP1, являясь слабым регулятором, может взаимодействовать с MMP2, MMP3 и MMP9 [15]. При этом единичные точечные мутации на границе раздела связывания оказывают заметное влияние на их аффинность и селективность связывания с MMP, что может приводить к изменению активности и дисбалансу комплекса MMP/TIMP [7, 12]. Так, ранее показана статистическая значимость комплекса *MMP1-1607 1G2G/TIMP1 +372TC* для риска возникновения ПОУГ. Эти же авторы выявили, что комбинированный генотип *MMP12AG/IL-1 $\beta$  TT* показал более высокие значения отношения шансов развития ПОУГ (OR = 4,27), в сравнении с единичными генотипами *MMP12AG* и *IL-1 $\beta$  TT* (OR = 1,08 и OR = 2,60 соответственно). Об этом же свидетельствуют результаты о значительном преобладании информативности выявления комплексных генотипов *MMP12G2G/IL-1 $\beta$  CT* (OR = 3,16) и *MMP11G1G/IL-1 $\beta$  TT* (OR = 3,56) для оценки генетической предрасположенности к развитию ПОУГ по сравнению с индивидуальным эффектом каждого генотипа, оцениваемого отдельно (OR = 1,75 для *MMP1 2G2G* и

OR = 1,31 для *IL-1 $\beta$  CT*; OR = 0,69 для *MMP11G1G* и OR = 2,60 для *IL-1 $\beta$  T/T*). Эти результаты, по мнению авторов, могут свидетельствовать о том, что межгенное взаимодействие может играть важную роль в качестве энхансера риска ПОУГ, что требует дальнейшего изучения [11]. Со своей стороны, добавим, что эти результаты указывают и на значимость совместного наследования вариантов генов регуляции состояния соединительнотканного внеклеточного матрикса и генов провоспалительных цитокинов в развитии данного типа офтальмопатологии. В случае заболевания со сложным типом наследования, такого как ПОУГ, отдельные генетические варианты могут иметь ограниченную ценность при оценке риска развития заболевания. Учитывая эти ограничения, исследования последних лет сосредоточены на сообщениях о клинической прогностической значимости соответствующих «шкал полигенного риска» (PRS). Одновременный анализ нескольких генетических вариантов функционально значимых для заболевания генов лучше подходит для количественной оценки риска заболевания и его прогрессирования [2, 8]. Аналогичный подход использован и нами в данном исследовании, результаты которого указывают на возможность использования данных о полиморфизме регуляторных регионов генов *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* и полиморфизме генов их ингибиторов *TIMP1*, *TIMP2* в оценке потенциальных факторов риска развития ПОУГ, связанных с дисбалансом MMP/TIMP активности.

## Заключение

Полученные в данном исследовании новые данные подтверждают концепцию о значимости полигенного наследования в реализации генетической предрасположенности к развитию ПОУГ. Именно комплексные генотипы, включающие одновременно полиморфные позиции генов *MMP/TIMP* могут выявить более точные ассоциативные связи с заболеванием.

## Список литературы / References

1. Нестеров А.П., Егоров Е.А. Классификация глаукомы // РМЖ Клиническая офтальмология, 2001. № 2. С. 35-38. [Nesterov A.P., Egorov E.A. Glaucoma classification. RMZh Klinicheskaya oftalmologiya = RMJ Clinical Ophthalmology, 2001, no. 2, pp. 35-38. (In Russ.)]
2. Bailey J.N.C. Progress, not perfection: intraocular pressure genetic risk score stratifies clinically relevant primary open-angle glaucoma outcomes. *Ophthalmology*, 2020, Vol.127, no. 7, pp. 908-909.
3. Boguszewska-Czubara A., Budzynska B., Skalicka-Wozniak K., Kurzepa J. Perspectives and new aspects of metalloproteinases' inhibitors in therapy of CNS disorders: from chemistry to medicine. *Curr. Med. Chem.*, 2019, Vol. 26, no. 18, pp. 3208-3224.
4. Colijn J.M., Buitendijk G.H., Prokofyeva E., Alves D., Cachulo M.L., Khawaja A.P., Cougnard-Gregoire A., Merle B.M.J., Korb C., Erke M.G., Bron A., Anastasopoulos E., Meester-Smoor M.A., Segato T., Piermarocchi S., de Jong P.T.V.M., Vingerling J.R., Topouzis F., Creuzot-Garcher C., Bertelsen G., Pfeiffer N., Fletcher A.E., Foster P.J., Silva R., Korobelnik J.F., Delcourt C., Klaver C.C.W. Prevalence of age-related macular degeneration in europe: the past and the future. *Ophthalmology*, 2017, Vol.124, no. 12, pp. 1753-1763.

5. Cui N., Hu M., Khalil R.A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2017, Vol. 147, pp. 1-73.
6. Glaucoma: Epidemiology Forecast to 2030. Available at: [https://www.globaldata.com/store/report/glaucoma-epidemiology-analysis/?utm\\_source=email&utm\\_medium=pr&utm\\_campaign=231221a\\_gd\\_pr\\_ph\\_glaucoma\\_epidemiology\\_analysis&utm\\_nooverride=1](https://www.globaldata.com/store/report/glaucoma-epidemiology-analysis/?utm_source=email&utm_medium=pr&utm_campaign=231221a_gd_pr_ph_glaucoma_epidemiology_analysis&utm_nooverride=1)
7. Grossman M., Tworowski D., Dym O., Lee M., Levy Y., Murphy G., Sagi I. The intrinsic protein flexibility of endogenous protease inhibitor TIMP-1 controls its binding interface and affects its function. *Biochemistry*, 2010, Vol. 49, no. 29, pp. 6184-6192.
8. Igo R.P., Cooke Bailey J.N. Genetic risk scores in complex eye disorders. In *Genetics and Genomics of Eye Disease: Advancing to Precision Medicine*; Gao, X.R., Ed.; Elsevier: New York, NY, USA, 2020, pp. 259-275.
9. Ji M.-L., Jia J. Correlations of TIMP2 and TIMP3 gene polymorphisms with primary open-angle glaucoma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2019, Vol. 23, no. 13, pp. 5542-5547.
10. Markiewicz L., Majsterek I., Przybylowska K., Dziki L., Waszczyk M., Gacek M., Kaminska A., Szaflak J., Szaflak J.P. Gene polymorphisms of the MMP1, MMP9, MMP12, IL-1 $\beta$  and TIMP1 and the risk of primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol.*, 2013, Vol. 91, no. 7, pp. 516-523.
11. Markiewicz L., Pytel D., Mucha B., Szymanek K., Szaflak J., Szaflak J.P., Majsterek I. Altered expression levels of MMP1, MMP9, MMP12, TIMP1, and IL-1 $\beta$  as a risk factor for the elevated IOP and optic nerve head damage in the primary open-angle glaucoma patients. *Biomed Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, 812503. doi: 10.1155/2015/812503.
12. Mohan V., Talmi-Frank D., Arkadash V., Papo N., Sagi I. Matrix metalloproteinase protein inhibitors: highlighting a new beginning for metalloproteinases in medicine. *Metalloproteinases Med.*, 2016, Vol. 3, pp. 31-47.
13. O'Brien J.M., Salowe R.J., Fertig R., Salinas J., Pistilli M., Sankar P.S., Miller-Ellis E., Lehman A., Murphy W., Homsher M., Gordon K., Ying G.S. Family history in the primary open-angle African American glaucoma genetics study cohort. *Am. J. Ophthalmol.*, 2018, Vol. 192, pp. 239-247.
14. Okamoto K., Mimura K., Murawak Y., Yuasa I. Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase MMP-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. *J. Gastr. Hepatol.*, 2005, Vol. 20, no. 7, pp. 1102-1108.
15. Travascio F. The role of matrix metalloproteinase in human body pathologies [Internet]. London: IntechOpen, 2022. Available at: <https://www.intechopen.com/books/5986>.
16. Valimaki J., Uusitalo H. Matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-3 and MMP-9, and TIMP 1, TIMP-2 and TIMP-3) and markers for vascularization in functioning and non-functioning bleb capsules of glaucoma drainage implants. *Acta Ophthalmol.*, 2015, Vol. 93, no. 5, pp. 450-456.
17. Weinreb R.N., Robinson M.R., Dibas M., Stamer W.D. Matrix metalloproteinases and glaucoma treatment. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 2020, Vol. 36, no. 4, pp. 208-228.
18. Wiggs J.L., Pasquale L.R. Genetics of glaucoma. *Hum. Mol. Genet.*, 2017, Vol. 1, no. 26 (R1), pp. R21-R27.
19. Wu M.Y., Wu Y., Zhang Y., Liu C.Y., Deng C.Y., Peng L., Zhou L. Associations between matrix metalloproteinase gene polymorphisms and glaucoma susceptibility: a meta-analysis. *BMC Ophthalmol.*, 2017, Vol. 17, no. 1, 48. doi: 10.1186/s12886-017-0442-2.
20. Zukerman R., Harris A., Vercellin A.V., Siesky B., Pasquale L.R., Ciulla T.A. Molecular genetics of glaucoma: subtype and ethnicity considerations. *Genes (Basel)*, 2020, Vol. 12, no. 1, pp. 55-89.

#### Авторы:

**Шевченко А.В.** – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Новосибирск, Россия

**Прокофьев В.Ф.** – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Новосибирск, Россия

#### Authors:

**Shevchenko A.V.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Prokofiev V.F.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Коненков В.И.** – д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, г. Новосибирск, Россия

**Черных В.В.** – д.м.н., профессор, директор Новосибирского филиала ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Ермакова О.В.** – врач-офтальмолог Новосибирского филиала ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

**Трунов А.Н.** – д.м.н., профессор, руководитель научного отдела Новосибирского филиала ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Поступила 23.08.2022

Отправлена на доработку 06.09.2022

Принята к печати 08.11.2022

**Konenkov V.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Science, Head, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Chernykh V.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, director, Novosibirsk Branch, S. Fyodorov National Medical Research Center of Eye Microsurgery, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russian Federation

**Ermakova O.V.**, Ophthalmologist, Novosibirsk Branch, S. Fyodorov National Medical Research Center of Eye Microsurgery, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russian Federation

**Trunov A.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Science, Novosibirsk Branch, S. Fyodorov National Medical Research Center of Eye Microsurgery, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russian Federation

Received 23.08.2022

Revision received 06.09.2022

Accepted 08.11.2022

## УРОВЕНЬ АУТОАНТИТЕЛ В КРОВИ ИНФИЦИРОВАННЫХ *H. PYLORI* БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ

Мохонова Е.В., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., Новиков Д.В.,  
Неумоина Н.В., Перфилова К.М., Неумоина М.В., Трошина Т.А.,  
Шутова И.В., Новиков В.В.

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени  
академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Резюме.** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) повышает риск заболеваний, связанных с воспалением слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, в частности гастрита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Причина в его способности вызывать хронический иммунный ответ, провоцируя повреждение слизистой оболочки и развитие этих заболеваний. Кроме того, обсуждается роль *H. pylori* в инициации широкого спектра аутоиммунных заболеваний. Целью настоящего исследования явилась оценка в крови инфицированных *H. pylori* больных хроническим гастритом уровня аутоантител — маркеров различных аутоиммунных заболеваний. Были использованы образцы цельной периферической крови 267 первичных пациентов с хроническим гастритом в стадии обострения. Наличие *H. pylori* в желудочном соке пациентов определяли методом ПЦР в реальном времени. Иммуноферментным методом определяли уровень в крови аутоантител к двухцепочечной и одноцепочечной ДНК, аутоантител к тиреоглобулину, тиреопероксидазе, ревматоидному фактору, аутоантител класса IgG к циклическому цитруллинированному пептиду, аутоантител классов IgM и IgG к бета-2-гликопротеину. Средний уровень ревматоидного фактора в сыворотке крови был одинаковым у пациентов, инфицированных и не инфицированных *H. pylori*, и не превышал нормы. Уровень антител к циклическому цитруллинированному пептиду — одному из наиболее чувствительных маркеров ревматоидного артрита — был повышен у всех пациентов, но оказался статистически значимо ниже у пациентов, инфицированных *H. pylori*, по сравнению с неинфицированными. Классическими маркерами аутоиммунных заболеваний щитовидной железы являются аутоантитела к тиреоглобулину, тиропероксидазе. В крови больных, инфицированных *H. pylori*, обнаружено повышение концентрации аутоантител к тиреоглобулину, тиропероксидазе по сравнению с неинфицированными, но медианный уровень этих антител не выходил за пределы нормы. Не было обнаружено различий между норм-

### Адрес для переписки:

Мохонова Екатерина Валерьевна  
ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский  
институт эпидемиологии и микробиологии имени  
академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора  
603950, Россия, г. Нижний Новгород,  
ул. Малая Ямская, 71.  
Тел.: 8 (987) 740-99-18.  
E-mail: ekaterinamohonova@yandex.ru

### Address for correspondence:

Ekaterina V. Mokhonova  
I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute  
of Epidemiology and Microbiology  
71 Malaya Yamskaya St  
Nizhniy Novgorod  
603950 Russian Federation  
Phone: +7 (987) 740-99-18.  
E-mail: ekaterinamohonova@yandex.ru

### Образец цитирования:

Е.В. Мохонова, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев,  
Д.В. Новиков, Н.В. Неумоина, К.М. Перфилова,  
М.В. Неумоина, Т.А. Трошина, И.В. Шутова,  
В.В. Новиков «Уровень аутоантител в крови  
инфицированных *H. pylori* больных хроническим  
гастритом» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25,  
№ 2. С. 339-348. doi: 10.15789/1563-0625-ALI-2371

© Мохонова Е.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

E.V. Mokhonova, V.A. Lapin, D.A. Melentyev, D.V. Novikov,  
N.V. Neumoina, K.M. Perfilova, M.V. Neumoina,  
T.A. Troshina, I.V. Shutova, V.V. Novikov “Autoantibody  
levels in blood of *H. pylori*-infected patients with chronic  
gastritis”, Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya  
Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 339-348.  
doi: 10.15789/1563-0625-ALI-2371

© Mokhonova E.V. et al., 2023

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-ALI-2371

мой инфицированных и неинфицированных хеликобактером пациентов на уровне серологического маркера системной красной волчанки – аутоантител против двухцепочечной ДНК и аутоантител против одноцепочечной ДНК. Уровень маркера тромботического риска у пациентов с системной красной волчанкой – аутоантител классов IgG и IgM к  $\beta 2$ -гликопротеину – также находился в пределах нормы. Однако у больных, инфицированных хеликобактером, он даже оказался статистически значимо ниже, чем у неинфицированных. Таким образом, не было получено данных о повышении уровня маркеров аутоиммунной патологии, тестируемых в крови инфицированных *H. pylori* пациентов с хроническим гастритом в стадии обострения, что, однако, не позволяет сделать однозначный вывод об отсутствии влияния *H. pylori* на развитие иммунологических сдвигов, связанных с аутоиммунными заболеваниями.

*Ключевые слова:* *Helicobacter pylori*, хронический гастрит, аутоантитела, аутоиммунные заболевания, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, аутоиммунный тиреоидит

## AUTOANTIBODY LEVELS IN BLOOD OF *H. PYLORI*-INFECTED PATIENTS WITH CHRONIC GASTRITIS

**Mokhonova E.V., Lapin V.A., Melentyev D.A., Novikov D.V.,  
Neumoina N.V., Perfilova K.M., Neumoina M.V., Troshina T.A.,  
Shutova I.V., Novikov V.V.**

*I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation*

**Abstract.** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) increases the risk of diseases associated with mucous membrane inflammation of gastrointestinal tract, in particular, gastritis, stomach ulcers, and duodenal ulcers. It may also induce a chronic immune response, causing damage to the mucous membrane and development of these diseases. In addition, the role of *H. pylori* in the initiation of a wide range of autoimmune diseases is discussed. The aim of this study was to assess the level of autoantibodies – markers of various autoimmune diseases in the blood of *H. pylori*-infected patients with chronic gastritis. We used samples of whole peripheral blood from 267 primary patients with chronic gastritis in the acute stage. The presence of *H. pylori* in gastric juice from patients was determined using real-time PCR. The level of autoantibodies to double-stranded and single-stranded DNA, autoantibodies to thyroglobulin, thyroid peroxidase, concentration of rheumatoid factor, IgG autoantibodies to the cyclic citrullinated peptide, IgM and IgG autoantibodies to beta(2)-glycoprotein were determined by the enzyme immunoassay. The average level of rheumatoid factor in blood serum was similar for *H. pylori*-infected and non-infected patients, and did not exceed the normal values. The level of antibodies to cyclic citrullinated peptide, one of the sensitive markers of rheumatoid arthritis, was increased in all patients, being, however, significantly lower in *H. pylori*-infected patients compared with non-infected persons. Autoantibodies to thyroglobulin, thyroid peroxidase are considered classic markers of autoimmune diseases of the thyroid gland. In blood of *H. pylori*-infected patients we have found an increased concentration of autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase in comparison with non-infected ones, but the average level of these antibodies did not exceed the normal range. Any differences in the levels of systemic lupus erythematosus serological markers, i.e., autoantibodies to double-stranded and single-stranded DNA, were found between *H. pylori*-infected and non-infected patients. The levels of thrombosis risk marker in patients with systemic lupus erythematosus (IgG and IgM autoantibodies to beta(2)-glycoprotein) were also within the normal ranges. However, in *H. pylori*-infected patients, it even turned out to be statistically significantly lower than in non-infected ones. Thus, no data have been obtained on increased levels of the tested markers of autoimmune pathology in blood of *H. pylori*-infected patients with chronic gastritis at the acute stage. However, this does not allow us to make an unambiguous conclusion that the influence of *H. pylori* does not affect the development of immunological changes associated with autoimmune diseases.

*Keywords:* *Helicobacter pylori*, *chronic gastritis*, *autoantibodies*, *autoimmune diseases*, *rheumatoid arthritis*, *systemic lupus erythematosus*, *autoimmune thyroiditis*

## Введение

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) колонизирует слизистую оболочку, увеличивает риск заболеваний, связанных с воспалением слизистой желудочно-кишечного тракта, в частности гастрита, язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, рака желудка и лимфомы лимфоидной ткани слизистой оболочки. В развитии воспаления слизистой принимают участие Th1-, Th17-, Th22-популяции лимфоцитов [4, 12, 33]. В свою очередь, Т-регуляторы оказывают ингибирующее действие, вызывая толерогенные эффекты, приводящие к развитию хронического воспаления [10]. Активация Th17-клеток потенциально способна индуцировать также аутоиммунные сдвиги [32]. В слизистой оболочке обнаружена повышенная продукция таких цитокинов, как IL-17, IL-23, IL-33, потенцирующих аутоиммунные процессы [6, 23]. Существует достаточно большое количество работ по исследованию возможных связей между инфицированием *H. pylori* и аутоиммунными заболеваниями разной природы. Стартовой точкой в развитии аутоиммунной патологии считается мимикрия ряда структур *H. pylori*, приводящая к перекрестным реакциям иммунной системы, вызывающим повреждение слизистой оболочки и индукции аутоиммунных сдвигов [7]. Тем не менее представленные в настоящее время данные противоречивы и не дают однозначного ответа о роли *H. pylori* в развитии аутоиммунных сдвигов. Так, в отношении патогенеза хронического гастрита допускается, что вторичное аутоиммунное заболевание желудка может быть вызвано длительной персистенцией *H. pylori*, но «первичный» аутоиммунный гастрит также существует как отдельная форма заболевания [9, 25]. Роль хронического инфицирования *H. pylori* в развитии аутоиммунного гастрита была предположена на основе наличия положительной корреляции между аутоантителами против белков желудка и антителами, специфичными к антигенам *H. pylori*. Однако эта связь не была подтверждена другими авторами [14, 21]. В ряде работ указывается на возможность ассоциации хеликобактерной инфекции с аутоиммунной патологией, но при этом ставится акцент на необходимости проведения дальнейших исследований [7, 8, 9].

Таким образом, известно, что иммунологический ответ, вызванный *H. pylori*, является важным фактором, определяющим повреждение слизистой оболочки желудка и возможную инициацию аутоиммунных проявлений. Однако механизмы, приводящие к развитию аутоиммунных заболеваний других органов и тканей, далеко не изучены.

**Целью настоящего исследования** явилась оценка уровня аутоантител – маркеров различных аутоиммунных заболеваний – в крови больных хроническим гастритом в стадии обострения.

## Материалы и методы

В работе использовали образцы цельной периферической крови 267 первичных больных с хроническим гастритом в стадии обострения, проходивших лечение в клинике инфекционных болезней ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора.

Забор крови производили путем пункции локтевой вены в утренние часы натощак. Кровь забирали в вакуумные пробирки с динатриевой солью этилендиаминтетрацетата (ЭДТА) (Vacuette, Германия). Для получения плазмы кровь центрифугировали 15 минут при 3000 об/мин, после чего плазму отделяли от сгустка, разливали на аликовты в пластиковые микропробирки (эпендорфы, Италия) и хранили при -20 °C до момента проведения исследований.

Пациентам с гастритами провели эндоскопическое исследование верхних отделов желудочно-кишечного тракта с забором желудочного сока из антравального отдела желудка. Наличие или отсутствие *H. pylori* определяли в желудочном соке методом ПЦР в реальном времени с использованием набора «РеалБест ДНК *Helicobacter pylori*» производства АО «Вектор-Бест», Россия.

Пациенты были разделены на две группы. В первую группу вошли лица с *H. pylori*-ассоциированными гастритами (133 человека), а во вторую – с гастритами, не связанными с *H. pylori*-инфекцией (134 человека). Исследование проводили согласно биоэтическим и этическим принципам, установленным Хельсинкской декларацией (принятой в июне 1964 г. (г. Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2013 г. (г. Форталеза, Бразилия)). В соответствии со статьей 24 конституции РФ и Хельсинкской декларацией (1964) все пациенты дали информированное согласие на использование биологического материала в научном исследовании.

С помощью твердофазного ИФА определяли содержание аутоантител – маркеров различных аутоиммунных заболеваний – у пациентов с гастритами в стадии обострения. Для определения уровня аутоантител к ревматоидному фактору («ВектоРевматоидный фактор класса М»), одноцепочечной и двухцепочечной ДНК («Векто-ssДНК-IgG» и «Векто-dsДНК-IgG»), тиреоглобулину и тиреопероксидазе («Анти-ТГ-ИФА-БЕСТ» и «Анти-ТПО-ИФА-БЕСТ») использовали диагностические наборы фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) согласно инструкции производителя. Содержание аутоантител класса IgG к циклическому цитруллинированному пептиду (Anti-CCP high sensitive) и аутоантител IgG/M к бета-2-гликопротеину I (Anti-beta-2-Glycoprotein I IgG/IgM ELISA) определяли с помощью тест-систем фирмы ORGENTEC (Германия).

Учет результатов проводили спектрофотометрически при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере Infinite M200 Pro (TECAN, Австрия) с использованием программного обеспечения Magellan 7.2 (TECAN, Австрия). Анализ полученных данных проводили в программном обеспечении Microsoft Excel (Microsoft, США). Статистический расчет проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США).

## Результаты

Определение ревматоидного фактора в крови обследованных больных показало, что его уровень в среднем не превышал норму (20 Ед/мл) как у положительных по *H. pylori*, так и отрицательных по *H. pylori* пациентов. Статистически значимых различий между группами больных выявлено не было. Среди пациентов первой группы (90 пациентов с *H. pylori*) только у 4 больных уровень ревматоидного фактора был выше нормы. Из тестированных больных второй группы (90 пациентов без *H. pylori*) уровень ревматоидного фактора в крови был повышен у 5 человек. Положительные по *H. pylori* больные имели медиану уровня антител против ревматоидного фактора, равную 5,472 (4,500-7,354), отрицательные по *H. pylori* – медиану, соответствующую 5,003 (4,263-6,975) Ед/мл (рис. 1).

В крови пациентов с хроническим гастритом содержание антител к циклическому цитруллинированному пептиду было повышенено во всех случаях и в среднем увеличивалось более чем в четыре раза в сравнении с верхним пределом

нормы (20 Ед/мл). Однако у лиц, инфицированных *H. pylori*, уровень антител был статистически значимо ниже, чем у лиц, не инфицированных *H. pylori*. Положительные по *H. pylori* больные имели медиану содержания антител против циклического цитруллинированного пептида, равную 74,73 (68,23-86,47), отрицательные по *H. pylori* – медиану, соответствующую 89,50 (77,46-105,4) Ед/мл (рис. 2).

Уровень антител к тиреоглобулину в крови положительных по *H. pylori* больных статистически значимо превышал уровень данных антител у пациентов, отрицательных по *H. pylori*. Однако содержание данных антител в обеих группах было в пределах нормы (100 МЕ/мл). Лишь у нескольких пациентов наблюдалось повышение содержание аутоантител к тиреоглобулину (9 из 136 *H. pylori*-положительных и 8 из 131 *H. pylori*-отрицательных обследованных). Положительные по *H. pylori* больные имели медиану уровня антител против тиреоглобулина, равную 51,15 (42,41-64,12), отрицательные по *H. pylori* – медиану, соответствующую 38,80 (36,53-43,18) МЕ/мл (рис. 3).

Аналогичные данные были получены при определении уровня антител к тиреопероксидазе. При норме, находящейся в пределах 30 Ед/мл, отрицательная по *H. pylori* группа обследованных имела медиану, равную 16,50 (14,68-23,36) Ед/мл. Показатели выше нормы имели 21 из 130 больных. Группа положительных по *H. pylori* пациентов имела медиану, равную 18,41 (16,14-23,54) Ед/мл. Выше нормы уровень аутоантител к тиреопероксидазе был у 19 больных из 136. При этом различия между группами были статисти-

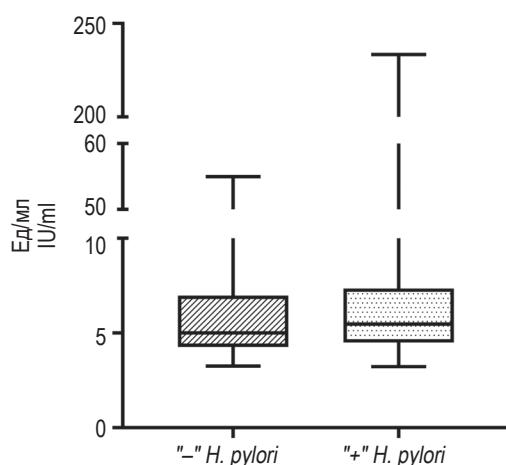


Рисунок 1. Уровень ревматоидного фактора класса IgM в крови больных хроническим гастритом в стадии обострения

Figure 1. Level of IgM rheumatoid factor in the blood of patients with chronic gastritis in the acute stage

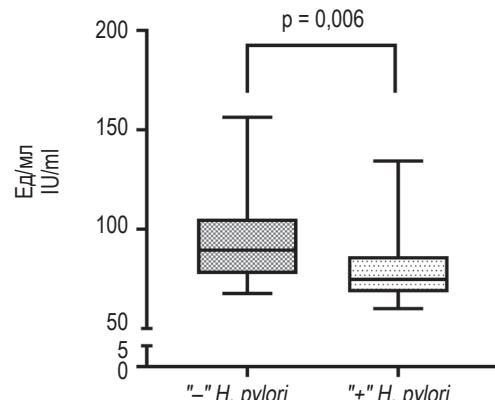


Рисунок 2. Уровень аутоантител циклическому цитруллиному пептиду класса IgG в крови больных хроническим гастритом в стадии обострения

Примечание.  $p = 0,006$  статистически значимые отличия при  $p \leq 0,05$ .

Figure 2. Level of IgG autoantibodies to cyclic citrulline peptide in the blood of patients with chronic gastritis in the acute stage

Note.  $p = 0.006$  significant differences at  $p \leq 0.05$ .

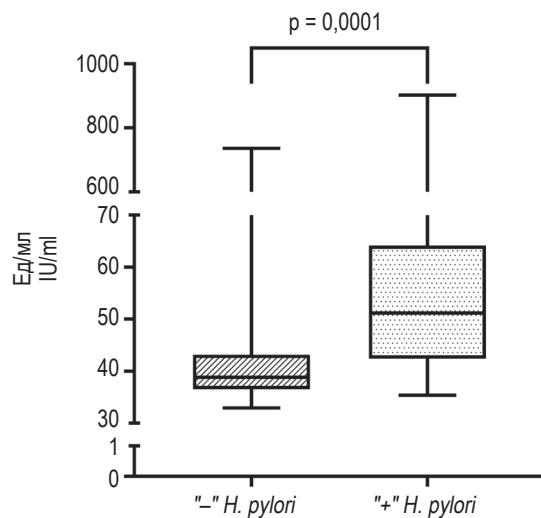


Рисунок 3. Уровень аутоантител к тиреоглобулину класса IgG в крови больных хроническим гастритом в стадии обострения

Примечание.  $p = 0,0001$  статистически значимые отличия при  $p \leq 0,05$ .

Figure 3. Level of IgG autoantibodies to thyroglobulin in the blood of patients with chronic gastritis in the acute stage  
Note.  $p = 0.0001$  significant differences at  $p \leq 0.05$ .

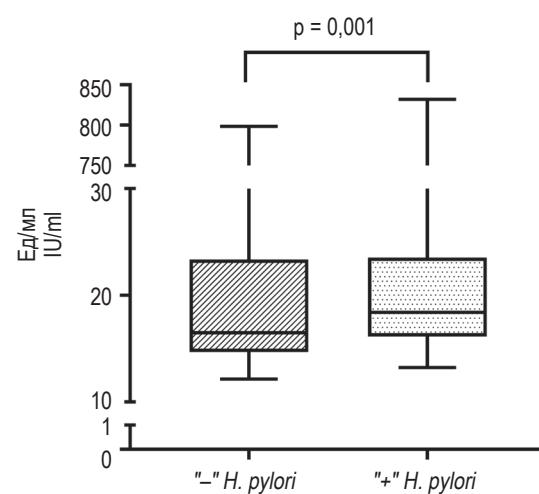


Рисунок 4. Уровень аутоантител к тиреопероксидазе класса IgG в крови больных хроническим гастритом в стадии обострения

Примечание.  $p = 0,001$  статистически значимые отличия при  $p \leq 0,05$ .

Figure 4. Level of IgG autoantibodies to thyroperoxidase in the blood of patients with chronic gastritis in the acute stage  
Note.  $p = 0.001$  significant differences at  $p \leq 0.05$ .

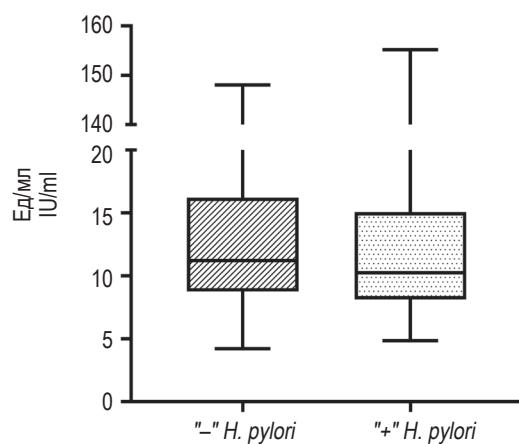


Рисунок 5. Уровень аутоантител к одноцепочечной ДНК класса IgG в крови больных хроническим гастритом в стадии обострения

Figure 5. Level of IgG autoantibodies to single-stranded DNA in the blood of patients with chronic gastritis in the acute stage

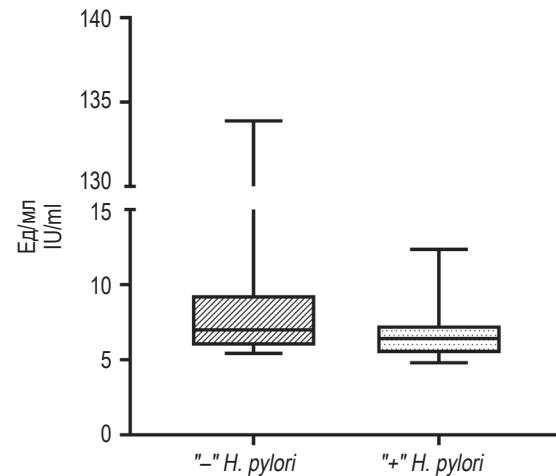


Рисунок 6. Уровень аутоантител к двухцепочечной ДНК класса IgG в крови больных хроническим гастритом в стадии обострения

Figure 6. Level of IgG autoantibodies to double-stranded DNA in the blood of patients with chronic gastritis in the acute stage

чески значимы и медиана содержания антител у положительных по *H. pylori* больных была выше, чем у отрицательных по *H. pylori* больных. Однако медианы уровня данных антител в обеих группах не выходили за пределы нормы, а частота обнаружения лиц с повышенным содержанием аутоантител практически не различалась (рис. 4).

Для аутоантител против одноцепочечной ДНК у пациентов, положительных и отрицательных по *H. pylori*, их содержание было в пределах нормы (до 20 Ед/мл). Статистически значимых различий не выявлено. Группа положительных по *H. pylori* пациентов имела медиану, равную 10,26 (8,13–15,07) Ед/мл. Показатели выше нормы были у 15

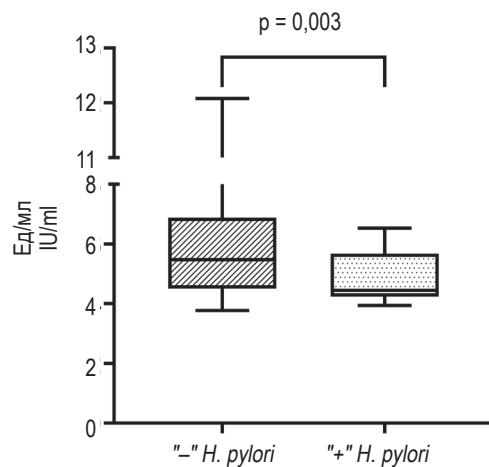


Рисунок 7. Уровень аутоантител к  $\beta_2$ -гликопротеину класса IgM в крови больных хроническим гастритом в стадии обострения

Примечание.  $p = 0,003$  статистически значимые отличия при  $p \leq 0,05$ .

Figure 7. Level of IgM autoantibodies to  $\beta_2$ -glycoprotein in the blood of patients with chronic gastritis in the acute stage  
Note.  $p = 0.003$  significant differences at  $p \leq 0.05$ .

из 88 человек. Группа отрицательных по *H. pylori* пациентов имела медиану, равную 11,22 (8,75-16,22) Ед/мл. Показатели выше нормы были у 16 из 90 тестированных больных (рис. 5).

Для аутоантител против двухцепочечной ДНК обнаруживалась аналогичная картина. Из 20 отрицательных по *H. pylori* больных повышенное содержание антител выявлено только у одного больного. В группе больных, положительных по *H. pylori*, не было выявлено лиц, с содержанием аутоантител против двухцепочечной ДНК выше нормы (20 Ед/мл). Группа положительных по *H. pylori* пациентов имела медиану, равную 6,41 (5,44-7,28) Ед/мл, а группа отрицательных по *H. pylori* пациентов имела медиану, равную 6,99 (5,94-9,29) Ед/мл (рис. 6).

При анализе содержания антител класса IgM к  $\beta_2$ -гликопротеину в крови больных с гастритами наблюдалось статистически значимое повышение уровня данных антител у *H. pylori*-отрицательных пациентов по сравнению с *H. pylori*-положительными пациентами. Группа отрицательных по *H. pylori* пациентов имела медиану, равную 5,47 (4,50-6,88) Ед/мл. Из 20 больных, у которых отсутствовала хеликобактерная инфекция, уровень антител был выше нормы (8 Ед/мл) у трех пациентов. Группа положительных по *H. pylori* пациентов имела медиану, равную 4,44 (4,23-5,67) Ед/мл. Ни у одного из 20 тестированных *H. pylori*-положительных больных не выявлено повышенного содержания данных аутоантител. Медиана уровня данных антител

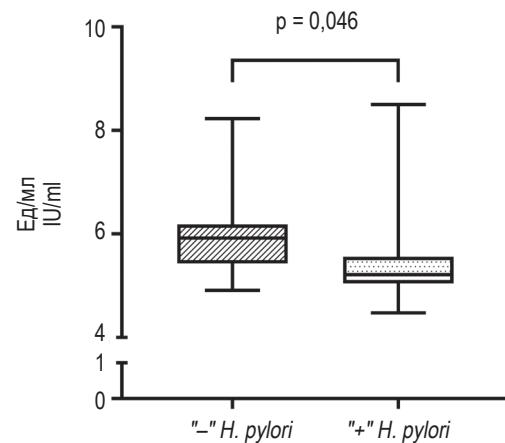


Рисунок 8. Уровень аутоантител к  $\beta_2$ -гликопротеину класса IgG в крови больных хроническим гастритом в стадии обострения

Примечание.  $p = 0,046$  статистически значимые отличия при  $p \leq 0,05$ .

Figure 8. Level of IgG autoantibodies to  $\beta_2$ -glycoprotein in the blood of patients with chronic gastritis in the acute stage  
Note.  $p = 0.046$  significant differences at  $p \leq 0.05$ .

в обеих группах не выходила за пределы нормы (рис. 7).

В крови больных с гастритами наблюдалось статистически значимое повышение уровня антител класса IgG к  $\beta_2$ -гликопротеину у *H. pylori*-отрицательных пациентов по сравнению с *H. pylori*-положительными пациентами. Группа отрицательных по *H. pylori* пациентов имела медиану, равную 5,91 (5,42-6,18) Ед/мл. Из 20 больных, у которых отсутствовала хеликобактерная инфекция, уровень антител был выше нормы (8 Ед/мл) у одного пациента. Группа положительных по *H. pylori* пациентов имела медиану, равную 5,21 (5,04-5,55) Ед/мл. Из 20 больных, инфицированных хеликобактером, уровень антител был выше нормы только у одного больного. Однако медиана уровня данных антител в обеих группах не выходила за пределы нормальных значений (рис. 8).

## Обсуждение

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) является одним из наиболее часто изучаемых инфекционных агентов, потенциально способным запускать аутоиммунный ответ. Это связано с уникальными свойствами *H. pylori*, такими как долгосрочная выживаемость в организме хозяина и его сложные взаимодействия с иммунной системой. Предположение о возможной роли *H. pylori* в развитии аутоиммунных заболеваний возникло при эпидемиологических исследованиях и в связи с его способностью вызывать хронический иммунный ответ. Для объяснения внекишечных ауто-

иммунных проявлений инфицирования *H. pylori* были предложены различные механизмы, такие как молекулярная мимикрия, перекрестная реактивность антител, повреждение эндотелиальных клеток, микрохимеризм и действие суперантител. В этих случаях результатом является потеря толерантности к ряду антигенов организма хозяина, продукция аутоантител и развитие аутоиммунных заболеваний, не ассоциированных напрямую с инфицированными *H. pylori* слизистыми поверхностями [7, 24].

Одним из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний является ревматоидный артрит (РА). Связь инфекции *H. pylori* с патогенезом РА является спорной. В исследованиях Yamanishi S. и соавт. было показано, что очищенная уреаза бактериальной клетки стимулирует В-лимфоциты *in vitro*, которые продуцируют аутоантитела в виде ревматоидного фактора класса IgM, и, как следствие, могут участвовать в запуске аутоиммунных реакций [24, 31]. Kobayashi F. и соавт. описали механизм активации клеточного иммунного ответа под влиянием фиксированной на поверхности *H. pylori* уреазы. TLR<sub>2</sub> иммунных клеток воспринимает уреазу как специфический лиганд. Их взаимодействие приводит к активации синтеза провоспалительных цитокинов и стимуляции В-лимфоцитов, продукции аутоантител и развитию аутоиммунных реакций [17]. Sakitani K. и соавт. на фоне *H. pylori*-ассоциированного гастрита выявили значительное повышение IL-32, который участвует в развитии иммунных реакций при РА [26]. Приведенные выше данные могут свидетельствовать о возможном влиянии *H. pylori* на развитие РА. Тем не менее не все клинические работы подтверждают это. Так Meron M.K. и соавт. показали, что уровень антител к *H. pylori* в плазме крови больных РА был аналогичным уровню, наблюдаемому у здоровых людей. Уровень антител к *H. pylori* в группе больных РА составил 80,4%, а в группе здоровых доноров 80,7% [19]. Shariaty Z. и соавт. оценили влияние инфицирования *H. pylori* на показатели активности РА. Бактерия была обнаружена у 39% обследованных. Сравнение больных, инфицированных и неинфицированных *H. pylori*, показало достоверное отличие по числу болезненных и воспаленных суставов, но не показало достоверных отличий по уровню ревматоидного фактора и антител к циклическому цитруллинированному пептиду [28]. Противоположные данные получили Ebrahimi A. и соавт., которые показали, что у инфицированных *H. pylori* больных с клинической картиной ревматоидного артрита было обнаружено повышенное содержание в крови ревматоидного фактора и антител к циклическому цитруллинированному пептиду в сравнении с *H. pylori* неинфицированными пациентами [13].

В нашей работе мы определяли уровень ревматоидного фактора и уровень антител к циклическому цитруллинированному пептиду в крови

инфицированных *H. pylori* больных хроническими гастритами в стадии обострения. Средний уровень ревматоидного фактора был одинаковым у больных, инфицированных и не инфицированных *H. pylori*, и не превышал норму. Уровень антител к циклическому цитруллинированному пептиду был выше нормы у всех больных, но оказался статистически значимо ниже у пациентов, инфицированных *H. pylori* в сравнении с неинфицированными лицами. Полученные результаты не позволяют сделать вывод о связи инфицирования *H. pylori* больных с хроническим гастритом с повышенным уровнем ревматоидного фактора и антител к циклическому цитруллинированному пептиду. Более того, инфицированность хеликобактером характеризуется менее выраженным повышением уровня данных антител у больных гастритами, что вероятно отражает различия в сложной картине иммунных реакций в ответ на инфицирование хеликобактером больных хроническим гастритом и ревматоидным артритом. В то же время увеличенный у всех больных уровень антител к циклическому цитруллинированному пептиду может свидетельствовать о цитруллинировании белков слизистой оболочки, приводящем к повышению содержания данных антител на системном уровне независимо от инфицирования *H. pylori*.

В литературе встречаются неоднозначные данные о роли *H. pylori* в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, которые представлены в основном тиреоидитом Хашимото, болезнью Грейвса и атрофическим тиреоидитом. Одни исследователи указывают на то, что связи между болезнью Хашимото и инфицированием *H. pylori* не было обнаружено [5, 16, 29]. Другие исследователи, наоборот, обнаруживают эту связь [15, 18, 22].

Так, Luis D.A. и соавт. оценивали распространность инфицирования *H. pylori* у пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы. В исследовании участвовали пациенты с аутоиммунным атрофическим тиреоидитом, тиреоидитом Хашимото и болезнью Грейвса. В качестве контроля служили пациенты с узловым нетоксичным зобом или болезнью Аддисона. Распространенность инфицирования *H. pylori* была увеличена почти вдвое у пациентов с аутоиммунным атрофическим тиреоидитом по сравнению с контрольной группой [18]. Astl J. и Sterzl I. также описали повышенную частоту встречаемости *H. pylori* у пациентов с аутоиммунными тиреоидитами [3].

Следует отметить, что аутоиммунные тиреоидиты часто обнаруживаются одновременно с другими аутоиммунными проявлениями и, что связь между патогеном и аутоиммунным тиреоидитом действительно может отражать потенциальный вклад *H. pylori* в одновременную индукцию множественных аутоиммунных заболеваний у восприимчивых людей. Точные механизмы, с по-

мощью которых воздействие микробы вызывает индукцию тиреоидного аутоиммунитета, четко не определены, хотя наиболее вероятной причиной считается молекулярная мимикрия [11].

Антитела к тиреоглобулину и тиреопероксидазе, являются основными маркерами тиреоидных аутоиммунных заболеваний, участвующих в реализации сложного механизма аутоиммунного поражения щитовидной железы. В настоящей работе мы оценили уровень данных антител у пациентов с хроническими гастритами в стадии обострения. Как для одних, так и для других антител обнаружено увеличение их уровня у больных с хеликобактерной инфекцией по сравнению с пациентами, не имеющими этой инфекции. Однако медиана уровня данных антител не выходила за пределы нормы как у *H. pylori*-положительных больных, так и *H. pylori*-отрицательных больных. Частота обнаружения лиц с повышенным содержанием аутоантител не различалась. Мы рассматриваем полученные результаты как возможное свидетельство инициации хеликобактер-ассоциированного антитиреоидного иммунного ответа, не выходящего за пределы нормы и не приводящего к повышению частоты встречаемости больных с повышенным уровнем аутоантител к тиреоглобулину и тиреопероксидазе.

Среди аутоиммунных заболеваний в группу лидеров по распространенности входит системная красная волчанка. Серологической характеристикой системной красной волчанки является наличие в крови аутоантител против двойной цепи ДНК (анти-dsDNA) и аутоантител против одноцепочечной ДНК (анти-ssDNA) [20, 30]. Мы определяли содержание данных аутоантител в крови больных хроническим гастритом. Показано, что уровень антител к dsDNA и ssDNA у инфицированных и неинфицированных *H. pylori* пациентов был в пределах нормы. Полученные результаты соответствуют данным других авторов. Так, в работе Решетняк Т.М. и соавт. показано, что частота колонизации *H. pylori* в слизистой оболочке желудка у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и антифосфолипидным синдромом соответствует частоте в общей популяции [1]. Более того, представлены данные о том, что больные системной красной волчанкой инфицируются *H. pylori* реже, чем здоровые лица. В связи с этим в литературе обсуждалось значе-

ние *H. pylori* в качестве защитного фактора от развития системной красной волчанки [27].

В диагностике антифосфолипидного синдрома и/или при оценке тромботического риска у пациентов с системной красной волчанкой обычно используется определение антител классов IgM и IgG к  $\beta_2$ -гликопротеину [2]. Согласно нашим исследованиям, у больных с хеликобактерной инфекцией уровень антител классов IgM и IgG к  $\beta_2$ -гликопротеину статистически значимо был ниже по отношению к больным гастритами, не ассоциированными с хеликобактерной инфекцией, что соответствует представленным выше данным о негативной ассоциации *H. pylori* с развитием системной красной волчанки. Однако уровень антител к данному маркеру был в пределах нормы в обеих группах пациентов.

## Заключение

Таким образом, с целью оценки возможности нарушения аутоиммунного гомеостаза у больных хроническим гастритом нами с помощью ИФА проведено определение уровня антител к различным аутоантigenам. Показано, что лица с хроническим гастритом в стадии обострения не отличаются по содержанию в крови ревматоидного фактора, однонитевой и двухнитевой ДНК. В то же время обнаружены различия в содержании аутоантител к тиреоглобулину и тиреопероксидазе у пациентов с хеликобактерной инфекцией по отношению к пациентам без этой инфекции. Однако медиана уровня данных антител в обеих группах находится в пределах нормы. Для аутоантител против  $\beta_2$ -гликопротеина показано, что у положительных по *H. pylori* больных их содержание статистически значимо ниже, чем у *H. pylori*-отрицательных. Повышенный уровень аутоантител у больных хроническим гастритом в стадии обострения был зарегистрирован только для аутоантител против циклического цитруллинированного пептида. Однако и в этом случае у положительных по *H. pylori* больных их содержание оказалось статистически значимо ниже, чем у *H. pylori*-отрицательных больных.

Суммируя, можно заключить, что результаты работы не позволяют сделать однозначного заключения о влиянии *H. pylori* на развитие иммунологических сдвигов, связанных с аутоиммунными заболеваниями, а сама проблема нуждается в дополнительном изучении.

## Список литературы / References

1. Решетняк Т.М., Дорошкевич И.А., Чельдиева Ф.А., Насонов Е.Л., Лила А.М., Маев И.В., Решетняк В.И. Повреждения слизистой оболочки желудка у пациентов с системной красной волчанкой и антифосфолипидным синдромом. Часть II: значение лекарственных препаратов и *Helicobacter pylori* // Эффективная фармакотерапия, 2020. Т. 16, № 15. С. 24-33. [Reshetnyak T.M., Doroshkevich I.A., Cheldiyeva F.A., Nasonov Ye.L., Lila A.M., Mayev I.V., Reshetnyak V.I. Damage to the gastric mucosa in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. Part II Importance of Drugs and *Helicobacter pylori*. Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy, 2020, Vol. 16, no. 15, pp. 24-33. (In Russ.)]
2. Arachchilage D.R.J., Laffan M. Pathogenesis and management of antiphospholipid syndrome. *J. Haematol.*, 2017, Vol. 178, no. 2, pp. 181-195.

3. Astl J., Sterzl I. Activation of *Helicobacter pylori* causes either autoimmune thyroid diseases or carcinogenesis in the digestive tract. *Physiol. Res.*, 2015, Vol. 64, pp. 291-301.
4. Bagheri N., Salimzadeh L., Shirzad H. The role of T helper 1-cell response in *Helicobacter pylori*-infection. *Microb. Pathog.*, 2018, Vol. 123, pp. 1-8.
5. Bassi V., Marino G., Iengo A., Fattoruso O., Santinelli C. Autoimmune thyroid diseases and *Helicobacter pylori*: the correlation is present only in Graves's disease. *World J. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 18, no. 10, pp. 1093-1097.
6. Caruso R., Pallone F., Monteleone G. Emerging role of IL-23/IL-17 axis in *H. pylori*-associated pathology. *World J. Gastroenterol.*, 2007, Vol. 13, no. 42, pp. 5547-5551.
7. Chmiela M., Gonciarz W. Molecular mimicry in *Helicobacter pylori* infections. *World J. Gastroenterol.*, 2017, Vol. 23, no. 22, pp. 3964-3977.
8. Choi Y.M., Kim T.Y., Kim E.Y., Jang E.K., Jeon M.J., Kim W.G., Shong Y.K., Kim W.B. Association between thyroid autoimmunity and *Helicobacter pylori* infection. *Korean J. Intern. Med.*, 2017, Vol. 32, no. 2, pp. 309-313.
9. Coati I., Fassan M., Farinati F., Graham D.Y., Genta R.M., Rugge M. Autoimmune gastritis: Pathologist's viewpoint. *World J. Gastroenterol.*, 2015, Vol. 21, no. 42, pp. 12179-12189.
10. Cook K.W., Letley D.P., Ingram R.J.M., Staples E., Skjoldmose H., Atherton J.C., Robinson K. CCL20/CCR6-mediated migration of regulatory T cells to the *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Gut*, 2014, Vol. 63, no. 10, pp. 1550-1559.
11. Cuan-Baltazar Y., Soto-Vega E. Microorganisms associated to thyroid autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 9, 102614. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102614.
12. Dixon B.R.E., Hossain R., Patel R.V., Algood H.M.S. Th17 Cells in *Helicobacter pylori* Infection: a Dichotomy of Help and Harm. *Infect. Immun.*, 2019, Vol. 87, no. 11, e00363-19. doi: 10.1128/IAI.00363-19.
13. Ebrahimi A., Soofizadeh B., Ebrahimi F., Moaadab S.Y., Bonyadi M., Gojazadeh M., Mahdavi A.M. Relationship between *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A protein with clinical outcomes in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.*, 2019, Vol. 211, pp. 49-52.
14. Faller G., Steininger H., Appelmelk B., Kirchner T. Evidence of novel pathogenic pathways for the formation of antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* gastritis. *J. Clin. Pathol.*, 1998, Vol. 51, no. 3, pp. 244-245.
15. Figura N., Cairano G.D., Lorè F., Guarino E., Gragnoli A., Cataldo D., Giannace R., Vaira D., Bianciardi L., Kristodhullu S., Lenzi C., Torricelli V., Orlandini G., Gennari C. The infection by *Helicobacter pylori* strains expressing CagA is highly prevalent in women with autoimmune thyroid disorders. *J. Physiol. Pharmacol.*, 1999, Vol. 50, no. 5, pp. 817-826.
16. Franceschi F., Satta M.A., Mentella M.C., Penland R., Candelli M., Grillo R.L., Leo D., Fini L., Nista E.C., Cazzato I.A., Lupascu A., Pola P., Pontecorvi A., Gasbarrini G., Genta R.M., Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* infection in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Helicobacter*, 2004, Vol. 9, no. 4, 369. doi: 10.1111/j.1083-4389.2004.00241.x.
17. Kobayashi F., Watanabe E., Nakagawa Y., Yamanishi S., Norose Y., Fukunaga Y., Takahashi H. Production of autoantibodies by murine B-1a cells stimulated with *Helicobacter pylori* urease through toll-like receptor 2 signaling. *Infect. Immun.*, 2011, Vol. 79, no. 12, pp. 4791-4801.
18. Luis D.A., Varela C., Calle H., de La., Cantón R., Argila C.M., Roman A.L.S., Boixeda D. *Helicobacter pylori* infection is markedly increased in patients with autoimmune atrophic thyroiditis. *J. Clin. Gastroenterol.*, 1998, Vol. 26, no. 4, pp. 259-263.
19. Meron M.K., Amital H., Shepshelovich D., Barzilai O., Ram M., Anaya J.M., Gerli R., Bizzaro N., Shoenfeld Y. Infectious aspects and the etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.*, 2010, Vol. 38, no. 2-3, pp. 287-291.
20. Obara T., Toyomaki K., Uegaki Y., Kikuchi Y., Arai J., Kuroda K., Suwabe A. Prozone-like phenomenon found in chemiluminescent enzyme immunoassay using magnetic particles for measurement of serum anti-single stranded DNA antibody titers: Definition and management. *Clin. Chim. Acta*, 2018, Vol. 485, pp. 88-94.
21. Oksanen A., Sipponen P., Karttunen R., Miettinen A., Veijola L., Sarna S., Rautelin H. Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in outpatients referred for gastroscopy. *Gut*, 2000, Vol. 46, no. 4, pp. 460-463.
22. Papamichael K.X., Papaioannou G., Karga H., Roussos A., Mantzaris G.J. *Helicobacter pylori* infection and endocrine disorders: is there a link? *World J. Gastroenterol.*, 2009, Vol. 15, no. 22, pp. 2701-2707.
23. Pei C., Barbour M., Fairlie-Clarke K.J., Allan D., Mu R., Jiang H.R. Emerging role of interleukin-33 in autoimmune diseases. *Immunology*, 2014, Vol. 141, no. 1, pp. 9-17.
24. Radić M. Role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune systemic rheumatic diseases *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 36, pp. 12839-12846.
25. Rugge M., Fassan M., Pizzi M., Zorzetto V., Maddalo G., Realdon S., Bernard M.D., Betterle C., Cappellessi R., Pennelli G., Boni M., Farinati F. Autoimmune gastritis: histology phenotype and OLGA staging. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 2012, Vol. 35, no. 12, pp. 1460-1466.
26. Sakitani K., Hirata Y., Hayakawa Y., Serizawa T., Nakata W., Takahashi R., Kinoshita H., Sakamoto K., Nakagawa H., Akanuma M., Yoshida H., Maeda S., Koike K. Role of interleukin-32 in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Infect. Immun.*, 2012, Vol. 80, no. 11, pp. 3795-3803.
27. Sawalha A.H., Schmid W.R., Binder S.R., Bacino D.K., Harley J.B. Association between systemic lupus erythematosus and *Helicobacter pylori* seronegativity. *J. Rheumatol.*, 2004, Vol. 31, no. 8, pp. 1546-1550.
28. Shariyat Z., Sheykhan M.R., Dolatshahi S. Evaluating the effects of *Helicobacter pylori* eradication on clinical course of rheumatoid arthritis. *Razavi Int. J. Med.*, 2015, Vol. 3, no. 3, pp. 8-12.
29. Tomasi P.A., Dore M.P., Fanciulli G., Sanciu F., Realdi G., Delitala G. Is there anything to the reported association between *Helicobacter pylori* infection and autoimmune thyroiditis? *Dig. Dis. Sci.*, 2005, Vol. 50, no. 2, pp. 385-388.
30. Wang X., Xia Y. Anti-double Stranded DNA antibodies: origin, pathogenicity, and targeted therapies. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1667. doi: 10.3389/fimmu.2019.01667.
31. Yamanishi S., Iizumi T., Watanabe E., Shimizu M., Kamiya S., Nagata K., Kumagai Y., Fukunaga Y., Takahashi H. Implications for induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori* urease. *Infect. Immun.*, 2006, Vol. 74, no. 1, pp. 248-256.

32. Yasuda K., Takeuchi Y., Hirota K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin. Immunopathol.*, 2019, Vol. 41, no.3, pp. 283-297.
33. Zhuang Y., Cheng P., Liu X., Peng L., Li B., Wang T., Chen N., Li W., Shi Y., Chen W., Pang K.C., Zeng M., Mao X., Yang S., Guo H., Guo G., Liu T., Zuo Q., Yang H., Yang L., Mao F., Lv Y. Quan-ming Zou Q. A pro-inflammatory role for Th22 cells in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Gut*, 2015, Vol. 64, no. 9, pp. 1368-1378.

**Авторы:**

**Мохонова Е.В.** – научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Лапин В.А.** – младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Мелентьев Д.А.** – младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Новиков Д.В.** – к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Неумоина Н.В.** – к.м.н., главный врач клиники инфекционных болезней ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Перфилова К.М.** – к.м.н., заместитель главного врача клиники инфекционных болезней ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Неумоина М.В.** – к.м.н., заведующая отделением клиники инфекционных болезней ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Трошина Т.А.** – заведующая отделением клиники инфекционных болезней ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Шутова И.В.** – к.м.н., заведующая отделением клиники инфекционных болезней ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Новиков В.В.** – д.б.н., профессор, заведующий лабораторией иммунохимии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

**Authors:**

**Mokhonova E.V.**, Research Associate, Immune Chemistry Laboratory, I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Lapin V.A.**, Junior Research Associate, Immune Chemistry Laboratory, I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Melentyev D.A.**, Junior Research Associate, Immune Chemistry Laboratory, I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Novikov D.V.**, PhD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Immune Chemistry Laboratory, I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Neumoina N.V.**, PhD (Medicine), Head Physician, Infectious Diseases Clinic, I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Perfilova K.M.**, PhD (Medicine), Deputy Head Physician, Infectious Diseases Clinic, I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Neumoina M.V.**, PhD (Medicine), Head of the Department, Infectious Diseases Clinic, I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Troshina T.A.**, Head of the Department, Infectious Diseases Clinic, I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Shutova I.V.**, PhD (Medicine), Head of the Department, Infectious Diseases Clinic, I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Novikov V.V.**, PhD (Biology), Professor, Head, Immune Chemistry Laboratory, I. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

# ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ЭЯКУЛЯТА У ПОДРОСТКОВ С ВАРИКОЦЕЛЕ

Пичугова С.В., Лагерева Ю.Г., Бейкин Я.Б.

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,  
г. Екатеринбург, Россия

ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург», г. Екатеринбург, Россия

**Резюме.** Варикоцеле – это сосудистое заболевание, характеризующееся аномальной извитостью и расширением вен лозовидного сплетения, дренирующего яичко. В результате затруднения оттока крови по измененным венам происходит нарушение внутритестикулярного кровотока, приводящее к патологическим изменениям ткани яичка, обусловленных гипертермией, ишемией, гипоксией и формированием воспалительной реакции. Семенная плазма содержит многочисленные белки, молекулы широкий спектр цитокинов, хемокинов, факторов роста, от свойств и уровня которых во многом зависят этапы посттестикулярного созревания сперматозоидов. В то же время цитокины являются неотъемлемой частью воспалительного эффекта и синтезируются различными иммунокомпетентными клетками, присутствующими в мужских половых путях. Повышение уровня цитокинов в эякуляте может выступать маркером локального воспалительного процесса и являться фактором развития мужского бесплодия. Цель исследования. Оценить цитокиновый профиль эякулята у подростков с варикоцеле.

Выполнено определение уровня цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, VEGF в эякуляте у подростков в возрасте 17 лет. Основную группу составили подростки с варикоцеле II-III степени в количестве 100 человек, в группу сравнения вошли 30 подростков без варикоцеле.

У подростков с варикоцеле наблюдается статистически более высокие уровни всех исследованных провоспалительных цитокинов, за исключением IL-8, а также IL-10, что может свидетельствовать об активности местного воспалительного процесса. Значимых различий в уровнях цитокинов между группами с II и III степенью варикоцеле не установлено, но при III степени варикоцеле в эякуляте выше уровни провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6. При сопоставлении результатов между обеими группами, в зависимости от давности варикоцелеэктомии и группой сравнения, установлены статистически более высокие уровни IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  у пациентов с более давней оперативной коррекцией и уровня IL-10 в обеих подгруппах при варикоцеле, что, учитывая прогрессирующее течение этого заболевания, может считаться неблагоприятным фактором, поскольку в более отдаленном по-слеоперационном периоде восстановился провоспалительный статус тестикулярной ткани.

У подростков с варикоцеле выявлен повышенный уровень провоспалительных цитокинов в эякуляте. Не установлено статистически значимых различий в уровне цитокинов в эякуляте при II и III

## Адрес для переписки:

Пичугова Светлана Владимировна  
ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург»  
620144, Россия, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 78в.  
Тел.: 8 (905) 802-15-39.  
Факс: 8 (343) 204-71-57.  
E-mail: ekb-lem@mail.ru

## Address for correspondence:

Svetlana V. Pichugova  
Yekaterinburg Regional Clinical and Diagnostic Center  
78v March 8 St  
Yekaterinburg  
620144 Russian Federation  
Phone: +7 (905) 802-15-39.  
Fax: +7 (343) 204-71-57.  
E-mail: ekb-lem@mail.ru

## Образец цитирования:

С.В. Пичугова, Ю.Г. Лагерева, Я.Б. Бейкин «Оценка цитокинового профиля эякулята у подростков с варикоцеле» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2. С. 349-356. doi: 10.15789/1563-0625-EOC-2564

© Пичугова С.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

S.V. Pichugova, Yu.G. Lagereva, Ya.B. Beikin “Evaluation of cytokine profile of ejaculate in adolescents with varicocele”, Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 349-356.

doi: 10.15789/1563-0625-EOC-2564

© Pichugova S.V. et al., 2023

The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EOC-2564

степени варикоцеле. В более отдаленном послеоперационном периоде выявлено увеличение уровня провоспалительных цитокинов в эякуляте.

*Ключевые слова:* варикоцеле, подростки, эякулят, цитокины, бесплодие

## EVALUATION OF CYTOKINE PROFILE OF EJACULATE IN ADOLESCENTS WITH VARICOCELE

**Pichugova S.V., Lagereva Yu.G., Beikin Ya.B.**

*Institute of immunology and Physiology Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation  
Yekaterinburg Regional Clinical and Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation*

**Abstract.** Varicocele is a vascular disease characterized by abnormal tortuosity and dilation of the veins in pampiniform plexus that drains the testis. Due to difficult outflow of blood via the altered veins, the intratesticular blood flow becomes impaired, leading to pathological changes in the testicular tissue caused by hyperthermia, ischemia, hypoxia and development of inflammatory reaction. Seminal plasma contains numerous proteins, molecules, a wide range of cytokines, chemokines, growth factors. Their properties and levels largely determine the stages of post-testicular maturation of spermatozoa. At the same time, cytokines are an integral part of the inflammatory effect and are synthesized by various immunocompetent cells present in the male reproductive tract. Increased cytokine levels in ejaculate may act as a marker of local inflammatory process, being a significant factor of male infertility. The purpose of our study was to assess cytokine profile of ejaculate in adolescents with varicocele.

The level of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, VEGF was determined in ejaculate of adolescents aged 17 years. The main group consisted of 100 adolescents with II-III degree varicocele; the comparison group included 30 adolescents without varicocele.

Adolescents with varicocele have statistically higher levels of all studied pro-inflammatory cytokines, except of IL-8 and IL-10, which may suggest presence of a local inflammatory process. We did not find significant differences in the levels of cytokines between groups with grade II and III varicocele. However, the levels of pro-inflammatory IL-1 $\beta$ , IL-6 cytokines in ejaculate proved to be increased in the patients with grade III varicocele. When comparing the results between both groups, depending on the period after varicocelectomy and in the comparison group, statistically higher levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  were detected in patients with more recent surgical correction and IL-10 levels in both subgroups with varicocele. This finding, given the progressive course of this disease, may be considered an unfavorable factor, since the pro-inflammatory status of testicular tissue returned, at later terms after surgery.

In adolescents with varicocele, increased levels of pro-inflammatory cytokines were revealed in the ejaculate. There were no statistically significant differences in the level of cytokines in ejaculate of the patients with II and III degrees of varicocele. At the longer postsurgical period, an increased level of pro-inflammatory cytokines was revealed in the ejaculate samples.

*Keywords:* varicocele, adolescents, ejaculate, cytokines, infertility

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (тема № 122020900136-4).

### Введение

По данным ряда авторов, во всем мире бесплодие затрагивает от 13% до 18% пар, и около половины случаев приходится исключительно на мужской фактор [6, 9, 15]. Причины мужского бесплодия разнообразны, но наиболее распространенной признается варикоцеле, формирующееся, преимущественно, в детском и подрост-

ковом возрасте [9, 13, 15, 17]. Варикоцеле – это сосудистое заболевание, характеризующееся аномальной извитостью и расширением вен ложевидного сплетения, дренирующего яичко [13, 17, 25]. В результате затруднения оттока крови по измененным венам происходит нарушение внутритестикулярного кровотока, приводящее к патологическим изменениям ткани яичка, обусловленных гипертермией, ишемией, гипоксией, накоплением активных форм кислорода и развитием окислительного стресса [2, 13, 14, 25]. В це-

лом предполагается, что все эти процессы приводят к формированию воспалительной реакции в тестикулярной ткани, которая сопровождается изменением уровня цитокинов в семенной жидкости, поскольку они являются маркерами воспалительного процесса, играющего важную роль в патогенезе варикоцеле [1, 8, 13, 16, 19, 26].

Семенная плазма содержит многочисленные белки, молекулы, в том числе и широкий спектр различных цитокинов, хемокинов, факторов роста, от свойств и уровня которых во многом зависят этапы посттестикулярного созревания сперматозоидов [4, 18]. Накоплены данные о том, что во всех компартментах половых путей мужчины, а также соматическими клетками Лейдига, клетками Сертоли, перитубулярными клетками производится огромное количество цитокинов, таких как IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, VEGF и многих других, участвующих в сперматогенезе, регулирующих функционирование яичка, пролиферацию зародышевых клеток и незрелых клеток Лейдига, модулирующих функции зрелых клеток Лейдига, способных влиять на все аспекты репродуктивной физиологии и, следовательно, являющихся нормальными компонентами семенной плазмы [10, 15, 20, 24]. Таким образом, цитокины являются частью аутоинной и паракринной сети, осуществляющей клеточную интеграцию в мужской репродуктивной системе и выполняющих регуляцию fertильности [10].

В то же время цитокины являются и неотъемлемой частью воспалительного эффекта и синтезируются различными иммунокомпетентными клетками, присутствующими в мужских половых путях [2, 15]. Как уже упоминалось, основными патологическими механизмами, действующими на тестикулярную ткань при варикоцеле, признаны гипертермия, ишемия и гипоксия. Гипоксия может выступать в качестве промотора хронического воспаления, поскольку гипоксическое воздействие способствует индукции транскрипции генов провоспалительных цитокинов, так как при гипоксии цитокины, хемокины и факторы роста действуют как мощные регуляторы стабилизации в ответе организма на воздействие острого и хронического стресса и, следовательно, влияют на формирование механизмов адаптации к гипоксии [1]. При повышении уровня цитокинов в семенной плазме отмечено нарушение дифференцировки сперматозоидов, негативное влияние на сперматогенез и показатели подвижности сперматозоидов, зафиксировано повреждение ДНК сперматозоидов и нарастание процессов апоптоза и некроза, выявлено ингибирующее действие на акросомальную реакцию, что может приводить к развитию мужского бесплодия [2, 5, 9, 15, 20, 21, 23, 26]. Увеличение

уровня провоспалительных цитокинов может быть причиной нарушения регуляции функций клеток Сертоли, приводя к повышенной проницаемости гематотестикулярного барьера [5]. Повышение содержания IL-1 $\beta$  в семенной плазме оказывает стимулирующее действие на нейтрофилы и макрофаги, способствует усилиению выработки IL-6, активирующего В-лимфоциты, и выработку антиспермальных антител [23]. Кроме того, на фоне венозного застоя удлиняется время контакта иммунокомпетентных клеток с антигенами сперматозоидов, приводит к развитию аутоагgressии и аутоиммунной формы бесплодия [2].

Можно предположить, что повышение уровня провоспалительных цитокинов в семенной плазме повлечет за собой и повышение уровня противовоспалительных цитокинов для их нейтрализации, поскольку противовоспалительные цитокины представляют собой растворимые иммуносупрессивные факторы, которые защищают тестикулы от аутоагgressии [9, 15, 26].

VEGF физиологически секreteируется в семенниках, семенных пузырьках, простате и участвует в регуляции репродуктивной функции мужчин [16]. Этот фактор является регулятором пула стволовых клеток сперматогониев в яичках, индуцирует пролиферацию половых клеток, способствует регенерации тестикулярной ткани за счет усиления васкуляризации и стероидогенеза клетками Лейдига [16]. Кроме того, VEGF участвует в обеспечении адаптации клеток к индуцируемой варикоцеле гипоксии [2, 7, 14].

Таким образом, повышенные уровни цитокинов в семенной жидкости могут выступать маркером воспалительного процесса, являясь фактором риска развития мужского бесплодия. Поскольку участие некоторых цитокинов в регуляции fertильности может зависеть от их концентрации, а цитокины действуют плейотропно и, нередко, синергично, часто результат их взаимодействия непредсказуем, что нельзя упускать из внимания [4, 10, 15, 16, 22].

В целом определение уровня цитокинов в семенной жидкости позволяет определить наличие и степень активности местного воспалительного процесса при варикоцеле.

**Цель исследования** — оценить цитокиновый профиль эякулята у подростков с варикоцеле.

## Материалы и методы

Выполнено определение уровня цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, VEGF в эякуляте у подростков в возрасте 17 лет. Основную группу составили подростки с варикоцеле II-III степени в количестве 100 человек, в группу сравнения вошли 30 подростков без варикоцеле. Критерии включения — отсутствие инфекцион-

но-воспалительных и других заболеваний органов мошонки, наличие опыта мастурбации. Все обследуемые и их законные представители дали информированное согласие на проведение исследования. Эякулят для исследования был получен методом мастурбации после 3-5 дневного воздержания при соблюдении всех условий сбора спермы у подростков [3].

Определение уровня цитокинов пациентам обеих групп проводили с помощью наборов «Вектор-Бест» (Россия), предназначенных для количественного определения уровня IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, VEGF методом ИФА на анализаторе Model 680 (BioRad, США).

Также оценка уровня цитокинов в эякуляте была выполнена в зависимости от степени варикоцеле. Пациенты были разделены по степени варикоцеле на две группы по 49 и 51 человек с II и III степенью соответственно. Определение уровня цитокинов было выполнено подросткам, которым варикоцелеэктомия была проведена в возрасте 14 лет (46 человек) и подросткам с более ранней оперативной коррекцией в возрасте 12-13 лет (54 человека).

Статистическую обработку полученных результатов исследования осуществляли с использованием компьютерных программ Microsoft Excel XP и Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Вы-

полнена предварительная оценка нормальности распределения с использованием критерия  $\chi^2$ . Количественные показатели ( $M \pm SD$ ) представлены в виде средних арифметических значений и стандартных отклонений. При оценке достоверности различий ( $p$ ) между признаками с нормальным распределением применялся коэффициент Стьюдента ( $t$ ). Различия результатов считали статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

## Результаты

При оценке уровня цитокинов в эякуляте у подростков основной группы и группы сравнения были получены следующие результаты (табл. 1).

При оценке полученных данных видно, что у подростков с варикоцеле наблюдается статистически более высокие уровни всех исследованных провоспалительных цитокинов, за исключением IL-8, а также IL-10.

Поскольку при III степени диагностируются более выраженные изменения вен лозовидного сплетения, определяемые визуально, следовательно, предполагается более выраженный воспалительный процесс и ожидается более высокий уровень цитокинов в эякуляте. Сопоставление показателей уровней цитокинов в эякуляте, в за-

ТАБЛИЦА 1. СОПОСТАВЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ В ЭЯКУЛЯТЕ У ПОДРОСТКОВ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ И ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ

TABLE 1. COMPARISON OF INDICATORS OF THE LEVEL OF CYTOKINES IN THE EJACULATE IN ADOLESCENTS OF THE MAIN GROUP AND THE COMPARISON GROUP

Показатель Indicator	Основная группа (варикоцеле) Main group (varicocele) n = 100	Группа сравнения Comparison group n = 30
IL-1 $\beta$ , пг/мл IL-1 $\beta$ , pg/mL	9,02 $\pm$ 28,12*	1,23 $\pm$ 1,29*
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	3,42 $\pm$ 4,77	2,63 $\pm$ 5,27
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	10,20 $\pm$ 28,65*	3,73 $\pm$ 8,45*
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	266,87 $\pm$ 116,56	248,69 $\pm$ 7,16
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	16,81 $\pm$ 25,21*	2,06 $\pm$ 2,43*
TNF $\alpha$ , пг/мл TNF $\alpha$ , pg/mL	15,64 $\pm$ 23,15*	2,64 $\pm$ 3,31*
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	1997,16 $\pm$ 11,29	1996,43 $\pm$ 13,74

Примечание. \* – статистически значимые различия показателей между основной группой и группой сравнения ( $p < 0,05$ ).

Note. \*, statistically significant differences in indicators between the main group and the comparison group ( $p < 0.05$ ).

**ТАБЛИЦА 2. СОПОСТАВЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В ЭЯКУЛЯТЕ В ГРУППАХ ЗАВИСИМОСТИ  
ОТ СТЕПЕНИ ВАРИКОЦЕЛЕ И ГРУППОЙ СРАВНЕНИЯ**

TABLE 2. COMPARISON OF INDICATORS OF CYTOKINE LEVELS IN THE EJACULATE IN GROUPS DEPENDING  
ON THE DEGREE OF VARICOCELE AND THE COMPARISON GROUP

Показатель Indicator	Основная группа (II степень варикоцеле) Main group (II degree of varicocele) n = 49	Основная группа (III степень варикоцеле) Main group (III degree of varicocele) n = 51
<b>IL-1<math>\beta</math>, пг/мл</b> IL-1 $\beta$ , pg/mL	4,91 $\pm$ 7,33	13,39 $\pm$ 39,15
<b>IL-4, пг/мл</b> IL-4, pg/mL	2,67 $\pm$ 2,92	3,94 $\pm$ 5,88
<b>IL-6, пг/мл</b> IL-6, pg/mL	6,78 $\pm$ 0,13	13,87 $\pm$ 39,47
<b>IL-8, пг/мл</b> IL-8, pg/mL	262,58 $\pm$ 86,63	271,00 $\pm$ 140,22
<b>IL-10, пг/мл</b> IL-10, pg/mL	17,84 $\pm$ 29,55	16,15 $\pm$ 20,32
<b>TNF<math>\alpha</math>, пг/мл</b> TNF $\alpha$ , pg/mL	14,72 $\pm$ 18,79	16,65 $\pm$ 26,81
<b>VEGF, мЕд/мл</b> VEGF, mU/mL	1996,07 $\pm$ 13,34	1998,00 $\pm$ 8,90

Примечание. Статистически значимые различия показателей между группами с II и III степенью варикоцеле не выявлены.

Note. Statistically significant differences in indicators between groups with grade II and III varicocele were not identified.

**ТАБЛИЦА 3. СОПОСТАВЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В ЭЯКУЛЯТЕ МЕЖДУ ГРУППАМИ  
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДАВНОСТИ ВАРИКОЦЕЛЕЭКТОМИИ И ГРУППОЙ СРАВНЕНИЯ**

TABLE 3. COMPARISON OF CYTOKINE LEVELS IN THE EJACULATE BETWEEN GROUPS DEPENDING ON THE DURATION  
OF VARICOCELECTOMY AND THE COMPARISON GROUP

Показатель Indicator	Основная группа (варикоцелеэктомия в 14 лет) Main group (varicocelectomy at the age of 14) n = 46	Основная группа (варикоцелеэктомия в 12-13 лет) Main group (varicocelectomy at 12-13 years old) n = 54	Группа сравнения Comparison group n = 30
<b>IL-1<math>\beta</math>, пг/мл</b> IL-1 $\beta$ , pg/mL	3,80 $\pm$ 3,35	13,46 $\pm$ 37,73*	2,80 $\pm$ 5,24*
<b>IL-4, пг/мл</b> IL-4, pg/mL	3,02 $\pm$ 4,47	3,76 $\pm$ 5,02	2,63 $\pm$ 5,27
<b>IL-6, пг/мл</b> IL-6, pg/mL	4,75 $\pm$ 3,05	14,85 $\pm$ 38,43*	3,73 $\pm$ 8,45*
<b>IL-8, пг/мл</b> IL-8, pg/mL	243,65 $\pm$ 28,70	282,31 $\pm$ 158,60	248,69 $\pm$ 7,16
<b>IL-10, пг/мл</b> IL-10, pg/mL	14,92 $\pm$ 15,50*	18,41 $\pm$ 31,26*	2,06 $\pm$ 2,43*
<b>TNF<math>\alpha</math>, пг/мл</b> TNF $\alpha$ , pg/mL	12,46 $\pm$ 10,29	18,35 $\pm$ 29,92*	2,64 $\pm$ 3,31*
<b>VEGF, мЕд/мл</b> VEGF, mU/mL	1999,02 $\pm$ 6,63	1995,00 $\pm$ 13,97	1996,43 $\pm$ 13,74

Примечание. Статистически значимые различия показателей между группами в зависимости от давности варикоцелеэктомии не выявлены. \* – статистически значимые различия показателей между группами в зависимости от давности варикоцелеэктомии и группой сравнения ( $p < 0,05$ ).

Note. No statistically significant differences between the groups depending on the duration of varicocelectomy were found. \*, statistically significant differences in indicators between groups depending on the duration of varicocelectomy and the comparison group ( $p < 0,05$ ).

висимости от степени варикоцеле, представлены в таблице 2.

Полученные результаты демонстрируют, что статистически значимых различий в уровнях цитокинов между группами с II и III степенью варикоцеле не установлено.

Результаты сопоставления уровней цитокинов между группами в зависимости от давности варикоцелеэктомии и группой сравнения представлены в таблице 3.

Статистически значимых различий в уровнях цитокинов между группами в зависимости от давности варикоцелеэктомии не обнаружено. Но при сопоставлении результатов между обеими группами в зависимости от давности варикоцелеэктомии и группой сравнения установлены статистически более высокие уровни IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  у пациентов с более давней оперативной коррекцией и уровнем IL-10 в обеих подгруппах при варикоцеле.

## Обсуждение

Полученные в ходе исследования результаты не противоречат данным литературы о том, что при варикоцеле обнаруживается изменение цитокинового профиля семенной плазмы [4, 12, 13, 15, 19, 20, 23, 26].

При сопоставлении уровней цитокинов в эякуляте у подростков основной группы и группы сравнения видно, что статистически значимо повышенены уровни провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , а из противовоспалительных цитокинов – IL-10.

В семенниках IL-1 $\beta$  в физиологических условиях регулирует сперматогенез посредством паракринной и аутокринной экспрессии, способствует созреванию сперматозоидов, пролиферации герминативного эпителия, клеток Сертоли, клеток Лейдига [9, 14]. Но повышение уровня IL-1 $\beta$  в эякуляте является лабораторным показателем статуса воспаления, поскольку он продуцируется моноцитами и макрофагами и вовлекается в воспалительный процесс, стимулируя выработку IL-6, считается маркером аутовоспаления и значительно повышается у пациентов с варикоцеле и бесплодием [2, 9, 11, 14].

Цитокин IL-6 рассматривается в качестве одного из наиболее важных факторов регуляции защитных реакций организма, включая воспалительный процесс. Он стимулирует развитие и функционирование Т- и В-лимфоцитов, индуцируя синтез иммуноглобулинов секреторного и циркуляторного типов, включая аутоантитела [2]. IL-6 характеризуется быстрой и кратковременной выработкой в ответ на повреждение тканей, но длительное нарушение регуляции его синтеза играет патологическую роль при хроническом

воспалительном процессе, характерном для варикоцеле и аутоиммунных реакциях [2, 9].

В отличие от остальных цитокинов TNF $\alpha$  способен действовать на андрогенный receptor, регулирующий активность синтеза тестостерона, способствует выживанию клеток во время сперматогенеза, оказывает непосредственное влияние на подвижность сперматозоидов [3]. TNF $\alpha$  поддерживает репаративный статус в урогенитальном тракте здоровых мужчин, выживание герминативных клеток в семенной жидкости, регулирует проницаемость гематотестикулярного барьера [2]. Вместе с тем высокая концентрация TNF $\alpha$  в эякуляте отражает наличие воспалительного процесса, изменяет функцию митохондрий, увеличивая продукцию активных форм кислорода и приводя к снижению подвижности сперматозоидов, ингибирует акросомальную реакцию, усиливает апоптоз сперматозоидов [2, 9, 19].

Из исследуемых противовоспалительных цитокинов в эякуляте статистически значимо повышен только уровень IL-10 у подростков с варикоцеле. Широко известна роль IL-10 в качестве цитокина, подавляющего продукцию провоспалительных цитокинов и прекращающего воспалительную реакцию [11]. Цитокин IL-10 угнетает клеточный тип иммунного ответа, ингибирует продукцию активных форм кислорода, поддерживает жизнеспособность сперматозоидов, обеспечивая иммуносупрессивный статус семенной жидкости [2].

Оценивая уровни цитокинов в эякуляте при II и III степени варикоцеле, статистически значимых различий не было установлено, хотя тенденция к повышению уровня ряда провоспалительных цитокинов при III степени варикоцеле может косвенно указывать на более выраженную активность воспалительного процесса по сравнению с II степенью варикоцеле.

У подростков, которым была выполнена более ранняя оперативная коррекция варикоцеле, установлены статистически значимо более высокие уровни провоспалительных цитокинов, что, учитывая прогрессирующее течение этого заболевания, может считаться неблагоприятным фактором, поскольку в более отдаленном послеоперационном периоде восстанавливается провоспалительный статус тестикулярной ткани.

Таким образом, анализ полученных данных позволил определить, что отличительным признаком локального цитокинового профиля в эякуляте у подростков с варикоцеле является усиленная продукция провоспалительных медиаторов IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , а также IL-10, реализующего противовоспалительный ответ. Проведенное исследование показало активную вовлеченность иммунной системы в воспали-

тельный процесс при варикоцеле, причем высок риск развития именно аутоиммунных реакций, маркерами которых являются IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ . Активация иммунной системы на локальном уровне может служить пусковым механизмом повреждения микроокружения в яичке, приводить к нарушению сперматогенеза, поскольку провоспалительные цитокины являются не только регуляторами физиологических процессов в тестикулярной ткани, но и наиболее агрессивными медиаторами воспалительной реакции по отношению к иммунопривелигированным клеткам репродуктивной системы.

Поскольку варикоцеле является неуклонно прогрессирующим заболеванием, в целях профи-

лактики развития бесплодия, важным моментом остается оценка цитокинового профиля на локальном уровне в прогнозировании fertильного потенциала подростков.

## Выводы

1. У подростков с варикоцеле выявлен повышенный уровень провоспалительных цитокинов в эякуляте.
2. Не установлено статистически значимых различий в уровне цитокинов в эякуляте при II и III степени варикоцеле.
3. В более отдаленном послеоперационном периоде выявлено увеличение уровня провоспалительных цитокинов в эякуляте.

## Список литературы / References

1. Лукоянова Л.Ф., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Сигнальные механизмы адаптации к гипоксии и их роль в системной регуляции // Биологические мембранны, 2012. Т. 29, № 4. С. 338-252. [Lukoyanova L.F., Kirova Yu.I., Sukoyan G.V. Signal mechanisms of adaptation to hypoxia and their role in systemic regulation. *Biologicheskie membrany = Biological Membranes*, 2012, Vol. 29, no. 4, pp. 338-252. (In Russ.)]
2. Наконечный И.А., Гаврилюк А.М., Наконечный А.И., Чопяк В.В., Куприш М.М. Иммунопатогенетические прогностические факторы fertильного потенциала у мужчин с левосторонним варикоцеле // Новости хирургии, 2019. Т. 27, № 6. С. 662-673. [Nakonechny I.A., Gavrilyuk A.M., Nakonechny A.I., Chopyak V.V., Kuprish M.M. Immunopathogenetic prognostic factors of fertility potential in men with left-sided varicocele. *Novosti khirurgii = News of Surgery*, 2019, Vol. 27, no. 6, pp. 662-673. (In Russ.)]
3. Охрана репродуктивного здоровья мальчиков и юношей-подростков // Информационное письмо МЗ РФ. М., 1999. 49 с. [Protecting the reproductive health of boys and adolescent boys: Information letter of the Ministry of Health of the Russian Federation]. Moscow, 1999. 49 p.
4. Устинов Д.В., Айзикович Б.И., Антонов А.Р., Черепкова Е.В. Нарушения содержания цитокинов в спермальной плазме у мужчин с бесплодием // Современные научноемкие технологии, 2014. № 12-1. С. 102. [Ustinov D.V., Aizikovich B.I., Antonov A.R., Cherepkova E.V. Disturbances in the content of cytokines in sperm plasma in men with infertility. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii = Modern High Technologies*, 2014, no. 12-1, p. 102. (In Russ.)]
5. Хайрутдинов К.Н., Ситдикова М.Э., Зубков А.Ю. Мужское бесплодие – проблема XXI века // Практическая медицина, 2018. Т. 16, № 6. С. 185-189. [Khairutdinov K.N., Sitedikova M.E., Zubkov A.Yu. Male infertility – a problem of the XXI century. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2018, Vol. 16, no. 6, pp. 185-189. (In Russ.)]
6. Agarwal A., Leisegang K., Majzoub A., Henkel R., Finelli R., Selvam M.K.P., Tadros N., Parekh N., Ko E.Y., Cho C.L., Arafa M., Alves M.G., Oliveira P.F., Alvarez J.G., Shah R. Utility of antioxidants in the treatment of male infertility: clinical guidelines based on a systematic review and analysis of evidence. *World J. Mens Health*, 2021, Vol. 39, no. 2, pp. 233-290.
7. Babaei A., Moradi S., Hoseinkhani Z., Rezazadeh D., Dokanehifard S., Asadpour R., Sharma G., Mansouri K. Expression of hypoxia-inducible factor1- $\alpha$  in varicocele disease: a comprehensive systematic review. *Reprod. Sci.*, 2021. doi: 10.1007/s43032-021-00696-y.
8. Esteves S.C. Novel concepts in male factor infertility: clinical and laboratory perspectives. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2016, Vol. 33, no. 10, pp. 1319-1335.
9. Fang Y., Su Y., Xu J., Hu Z., Zhao K., Liu C. Varicocele-mediated male infertility: from the perspective of testicular immunity and inflammation. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 729539. doi: 10.3389/fimmu.2021.729539.
10. Fraczek M., Kurpisz M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J. Reprod. Immunol.*, 2015, Vol. 108, pp. 98-104.
11. Gust J., Ponce R., Liles W.C., Garden G.A., Turtle C.J. Cytokines in CAR T Cell-Associated neurotoxicity. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 577027. doi: 10.3389/fimmu.2020.577027.
12. Habibi B., Seifi B., Mougahi S. M.-H.N., Ojaghi M., Sadeghipour H.R. Increases in interleukin-6 and interferon-gamma levels is progressive in immature rats with varicocele. *Ir. J. Med. Sci.*, 2015, Vol. 184, no. 2, pp. 531-537.
13. Hajipour E., Mashayekhi F.J., Mosayebi G., Baazm M., Zendedel A. Resveratrol decreases apoptosis and NLRP3 complex expressions in experimental varicocele rat model. *Iran J. Basic Med. Sci.*, 2018, Vol. 21, no. 2, pp. 225-229.

14. Hassanin A.M., Ahmed H.H., Kaddah A.N. A global view of the pathophysiology of varicocele. *Andrology*, 2018, Vol. 6, no. 5, pp. 654-661.
15. Havrylyuk A., Chopyak V., Boyko Y., Kril I., Kurpisz M. Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Cent. Eur. J. Immunol.*, 2015, Vol. 40, no. 3, pp. 337-344.
16. Hou D., Zhou X., Zhong X., Settles M.L., Herring J., Wang L., Abdo Z., Forney L.J., Xu C. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil. Steril.*, 2013, Vol. 100, no. 5, pp. 1261-1269.
17. Karna K.K., Choi B.R., Kim M., Kim H.K., Park J.K. The effect of schisandra chinensis baillon on cross-talk between oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial signaling pathway in testes of varicocele-induced SD rat. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 22, 5785. doi: 10.3390/ijms20225785.
18. Majzoub A., Esteves S.C., Gosálvez J., Agarwal A. Specialized sperm function tests in varicocele and the future of andrology laboratory. *Asian J. Androl.*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 205-212.
19. Micheli L., Collodel G., Cerretani D., Menchiari A., Noto D., Signorini C., Moretti E. Relationships between Ghrelin and Obestatin with MDA, Proinflammatory Cytokines, GSH/GSSG Ratio, Catalase Activity, and Semen Parameters in Infertile Patients with Leukocytospermia and Varicocele. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2019, Vol. 2019, 7261842. doi: 10.1155/2019/7261842.
20. Moretti E., Collodel G., Mazzi L., Campagna M.S., Iacoponi F., Figura N. Resistin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and human semen parameters in the presence of leukocytospermia, smoking habit, and varicocele. *Fertil. Steril.*, 2014, Vol. 102, no. 2, pp. 354-360.
21. Oh Y.S., Jo N.H., Park J.K., Gye M.C. Changes in inflammatory cytokines accompany deregulation of Claudin-11, resulting in inter-sertoli tight junctions in varicocele rat testes. *J. Urol.*, 2016, Vol. 196, no. 4, pp. 1303-1312.
22. Saxena P., Soni R., Randhawa V.S., Singh N. Can seminal IL-8 level be used as a marker of leukocytospermia and does it have any correlation with semen parameters in infertile couples? *J. Obstet. Gynaecol. India*, 2019, Vol. 69, no. 5, pp. 451-456.
23. Solomon M., Henkel R. Semen culture and the assessment of genitourinary tract infections. *Indian J. Urol.*, 2017, Vol. 33, no. 3, pp. 188-193.
24. Shiraishi K., Matsuyama H., Takiara H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. *Int. J. Urol.*, 2012, Vol. 19, no. 6, pp. 538-550.
25. Tatem A.J., Brannigan R.E. The role of microsurgical varicocelectomy in treating male infertility. *Transl. Androl. Urol.*, 2017, Vol. 6, no. 4, pp. 722-729.
26. Zeinali M., Amree A.H., Khorramdelazad H., Karami H., Abedinzadeh M. Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the stminal plasma of infertile men suffering from varicocele. *Andrologia*, 2017, Vol. 49, no. 6, e12685. doi: 10.1111/and. 12685.

#### Авторы:

**Пичугова С.В.** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; заведующая лабораторией электронной микроскопии ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург», г. Екатеринбург, Россия

**Лагерева Ю.Г.** – д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; заведующая лабораторией клинической иммунологии ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург», г. Екатеринбург, Россия

**Бейкин Я.Б.** – д.м.н., заведующий лабораторией иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; главный врач ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург», г. Екатеринбург, Россия

Поступила 11.08.2022  
Отправлена на доработку 16.08.2022  
Принята к печати 08.11.2022

#### Authors:

**Pichugova S.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of immunology and Physiology Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Laboratory of Electron Microscopy, Yekaterinburg Regional Clinical and Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation

**Lagereva Yu.G.**, PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of immunology and Physiology Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Laboratory of Clinical Immunology, Yekaterinburg Regional Clinical and Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation

**Beikin Ya.B.**, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of immunology and Physiology Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Chief Physician, Yekaterinburg Regional Clinical and Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation

Received 11.08.2022  
Revision received 16.08.2022  
Accepted 08.11.2022

# БИОМАРКЕРЫ КРОВИ И МАРКЕР ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Студеникина А.А.<sup>1, 2</sup>, Михайлова Е.С.<sup>1, 2</sup>, Архипов С.А.<sup>1, 2</sup>,  
Вараксин Н.А.<sup>3</sup>, Проскура А.В.<sup>2</sup>, Аутеншлюс А.И.<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Метастазирование является ведущей причиной смерти у пациентов с раком молочной железы (РМЖ). Известно, что поражение опухолевыми клетками регионарных лимфатических узлов чаще встречается в опухолях с более высокой пролиферативной активностью, кроме того имеются литературные данные о том, что цитокины и протеины также могут оказывать влияние на миграционный потенциал опухоли. Цель работы – изучение сопряженности между концентрацией цитокинов, протеинов и экспрессией маркера пролиферации Ki-67 при РМЖ по гистологической форме инвазивная карцинома неспецифического типа. По данным патологоанатомов, у 16 пациентов отмечалось наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах (I группа), а у 18 пациентов метастазы отсутствовали (II группа).

С помощью твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрацию 14 цитокинов в супернатантах иммунокомпетентных клеток крови: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-1ra, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1, а концентрации 6 протеинов определяли в сыроворотке крови: рецепторов эстрогена и прогестерона, кадгерина-Е (CDH1), активатора плазминогена типа 1 (PAI-1), муцина 1 (MUC1), белка теплового шока 90 $\alpha$ A1 (HSP90 $\alpha$ A1). Иммуно-гистохимическое исследование экспрессии Ki-67 проводили на парафиновых срезах опухолей с использованием моноклональных антител.

Исследование показало, что экспрессия Ki-67 в опухоли и концентрации в крови IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  были выше у пациентов I группы, а концентрации в крови CDH1 и PAI-1, наоборот, были выше у пациентов II группы. Было обнаружено что, Ki-67 имеет как обратные корреляционные связи с CDH1 и PAI1, так и прямые с IL-8 и TNF $\alpha$ . CDH1 имеет прямую корреляционную связь с PAI1, и обратные с IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ . Цитокины имеют прямые корреляционные связи между собой. Анализ ROC-кривых показал хорошее качество и оптимальные значения точек отсечения экспрессии Ki-67,

#### Адрес для переписки:

Студеникина Анастасия Александровна  
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный  
медицинский университет»  
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.  
Тел.: 8 (383) 226-35-60.  
E-mail: lpciiip@211.ru

#### Address for correspondence:

Anastasia A. Studenikina  
Novosibirsk State Medical University  
52 Krasny Ave  
Novosibirsk  
630091 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 226-35-60.  
E-mail: lpciiip@211.ru

#### Образец цитирования:

А.А. Студеникина, Е.С. Михайлова, С.А. Архипов,  
Н.А. Вараксин, А.В. Проскура, А.И. Аутеншлюс  
«Биомаркеры крови и маркер пролиферации Ki-67 при  
раке молочной железы» // Медицинская иммунология,  
2023. Т. 25, № 2. С. 357-366.  
doi: 10.15789/1563-0625-BBA-2570

© Студеникина А.А. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

#### For citation:

A.A. Studenikina, E.S. Mikhaylova, S.A. Arkhipov,  
N.A. Varaksin, A.V. Proskura, A.I. Autenshlyus “Blood  
biomarkers and Ki-67 proliferation marker in breast cancer”,  
Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya,  
2023, Vol. 25, no. 2, pp. 357-366.

doi: 10.15789/1563-0625-BBA-2570

© Studenikina A.A. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-BBA-2570

концентраций цитокинов и протеинов, которые могли бы наилучшим образом предсказать наличие лимфогенного метастазирования. На основании полученных результатов, был предложен коэффициент, представляющий собой отношение концентрации CDH1 к сумме показателей концентраций IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  в крови, который может содействовать выявлению пациентов с РМЖ находящихся в группе риска по лимфогенному метастазированию.

*Ключевые слова:* цитокины, протеины, Ki-67, пролиферация, метастазирование, рак молочной железы

## BLOOD BIOMARKERS AND Ki-67 PROLIFERATION MARKER IN BREAST CANCER

Studenikina A.A.<sup>a, b</sup>, Mikhaylova E.S.<sup>a, b</sup>, Arkhipov S.A.<sup>a, b</sup>,  
Varaksin N.A.<sup>c</sup>, Proskura A.V.<sup>b</sup>, Autenshlyus A.I.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>c</sup> JSC "Vector-Best", Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Metastasis is the leading cause of death in patients with breast cancer (BC). It is known that the lesion of regional lymph nodes by tumor cells is more common in tumors with higher proliferative activity. Moreover, there is literature evidence on effects of cytokines and proteins upon the migration potential of the tumor. The aim of our work was to study the correlation between the concentrations of cytokines, proteins, and expression of Ki-67 proliferation marker in breast cancer with histology of non-specific invasive carcinoma.

On the basis of pathological findings, 16 patients had metastases in regional lymph nodes (group I), and 18 patients had no detectable metastases (group II). Solid-phase enzyme immunoassay was used to determine concentrations of 14 cytokines in the supernatants of immunocompetent blood cells, i.e., IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-1ra, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, VEGF and MCP-1, and concentrations of 6 proteins were determined in blood serum: estrogen and progesterone receptors, cadherin-E (CDH1), plasminogen activator type 1 (PAI-1), mucin 1 (MUC1), heat shock protein 90 $\alpha$ A1 (HSP90 $\alpha$ A1). Immunohistochemical study of Ki-67 expression was performed in paraffin sections of tumors using monoclonal antibodies.

The study showed that Ki-67 expression in tumor tissues and blood concentrations of IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  were higher in group I patients. On the contrary, blood concentrations of CDH1 and PAI-1 were higher in group II patients. It was found that Ki-67 showed both inverse correlations with CDH1 and PAI1, and direct correlations with IL-8 and TNF $\alpha$ . CDH1 had a direct correlation with PAI1, and inverse correlations with IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ . The studied cytokines showed direct correlations with each other. The analysis of ROC curves showed good quality and optimal values of the cut-off points for Ki-67 expression, cytokine and protein concentrations, thus allowing best prediction for detectable lymphatic metastasis.

On the basis of these results, a quotient was proposed, which represents a ratio of CDH1 contents to the sum of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  concentrations in blood samples, which can help identification of the patients with breast cancer at risk for lymphatic metastasis.

*Keywords:* cytokines, proteins, Ki-67, proliferation, metastasis, breast cancer

### Введение

Метастазирование является ведущей причиной смерти у пациентов с раком молочной железы (РМЖ). Известно, что у 30% больных неметастатическим РМЖ на фоне адьювантной терапии в дальнейшем развиваются метастазы [12, 24]. Лимфоваскулярная инвазия чаще встречается в опухолях с более высокой пролиферативной активностью, которую оценивают с помощью иммуно-гистохимического маркера Ki-67 [4]. Известно, что высокая экспрессия Ki-67 связа-

на с более высоким риском рецидива и худшей выживаемостью у больных РМЖ [9]. Множество исследований подчеркивают клиническую обоснованность использования Ki-67 в качестве prognostического биомаркера эффективности лечения в условиях неoadьювантной терапии. Тем не менее основная проблема применения этого маркера заключается в его слабой воспроизводимости [11]. Использование дополнительных маркеров с помощью стандартных наборов и воспроизводимых методик может помочь в более объективной интерпретации данных экспрессии

маркера пролиферации Ki-67. В качестве таких маркеров могут выступать показатели способности клеток крови к секреции цитокинов и концентрации протеинов сыворотки крови. Наиболее подходящим для этих целей, по нашему мнению, является изучение спонтанной продукции цитокинов *ex vivo* – в цельной крови это дает представление о том, насколько активированы иммунокомпетентные клетки *in vivo*. Концентрации цитокинов и протеинов подвергаются динамическим изменениям на разных этапах опухолевого роста [17], поэтому использование этих показателей пациентов с РМЖ может улучшить диагностические возможности Ki-67. Несмотря на множество статей, посвященных различным прогностическим факторам у пациентов с раком молочной железы, ранее не описывалась сопряженность между экспрессией Ki-67 и профилем цитокинов и протеинов и то, как они в совокупности связаны с наличием лимфогенного метастазирования.

**Целью работы** явилось изучение сопряженности между профилем цитокинов, протеинов и экспрессией Ki-67 при раке молочной железы.

## Материалы и методы

Материалом служили: кровь и образцы опухолей 34 пациентов с диагнозом РМЖ, с гистологическим типом – инвазивная карцинома неспецифического типа в возрасте 23-70 лет (средний возраст  $53,0 \pm 2,1$ ), со степенью злокачественности опухоли G1 и G2. Больные были разделены на группы: I группа – 16 пациентов с метастазами в регионарных лимфатических узлах в возрасте 23-70 лет (средний возраст  $50,4 \pm 2,7$ ) и II группа – 18 пациентов без метастатического поражения лимфатических узлов в возрасте 35-70 лет (средний возраст  $54,0 \pm 1,6$ ). Диагноз устанавливался врачом-онкологом и врачом-патологом. Забор крови у всех исследуемых пациентов осуществляли до оперативного вмешательства. Пациентам была проведена мастэктомия молочной железы на базе онкологического отделения ГКБ № 1 г. Новосибирска. Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации 2016 года. От каждого пациента получено информированное согласие на проведение исследования и получения образцов опухолей, подписанное самим пациентом и заверенное врачом. Исследование одобрено комитетом по этике Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики подразделения Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 2016-3). На основании литератур-

ных данных и собственных исследований были изучены представленные ниже цитокины и протеины [1, 2, 7, 13, 20, 21]. Концентраций цитокинов и протеинов крови определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Для изучения спонтанной секреции цитокинов 1 мл крови в стерильных условиях вносили во флякон, содержащий 4 мл стерильной поддерживающей среды (DMEM), гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и L-глютамин (0,6 мг/мл), инкубировали при 37 °С в течение суток, после окончания инкубации клетки крови осаждали центрифугированием при 900 г в течение 15 мин. В полученных супернатантах лейкоцитов определяли концентрации: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1β, IL-1ra, TNFα, IFNγ, G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1 с использованием наборов реагентов АО «Вектор-Бест» (Россия). Концентрации следующих протеинов определяли в сыворотке крови: рецепторов эстрогена и прогестерона, кадгерина-Е (CDH1), активатора плазминогена типа 1 (PAI-1), муцина-1 (MUC1), белка теплового шока 90αA1 (HSP90αA1) с помощью наборов Cloud-CloneCorp. (США). Иммуно-гистохимическое исследование экспрессии Ki-67 проводили на парафиновых срезах опухолей с использованием моноклональных антител (Leica Biosystems Inc.) и системы визуализации VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories, США). Для статистической обработки результатов использовали программный пакет SPSS v. 22.0 for Windows. При определении характера распределения данных применяли уравнение Колмогорова-Смирнова с определением поправки Лиллифорса. Поскольку распределение отличалось от нормального, проводили анализ с использованием непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни. С целью обнаружения взаимосвязи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха – Me ( $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ ). Оптимальное значение точки отсечения экспрессии Ki-67 было проведено с помощью анализа receiver operating characteristic (ROC). Использовали оборудование центра коллективного пользования Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики – структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

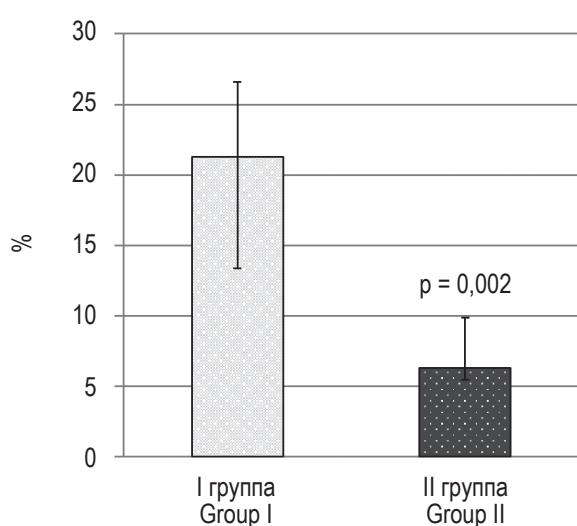


Рисунок 1. Экспрессия Ki-67 на парафиновых срезах опухолей пациентов с РМЖ (%)

Примечание. I группа – пациенты с РМЖ с лимфогенным метастазированием, II группа – пациенты с РМЖ без лимфогенного метастазирования.

Figure 1. Ki-67 expression on paraffin sections of tumors of patients with breast cancer (%)

Note. Group I, patients with breast cancer with lymphatic metastasis; group II, patients with breast cancer without lymphatic metastasis.

## Результаты

Был проведен анализ экспрессии Ki-67 на опухолях пациентов с РМЖ, при этом у пациентов I группы (с лимфогенным метастазированием) экспрессия Ki-67 была статистически значимо выше, чем у пациентов II группы (рис. 1), что соответствует известным фактам, поскольку более высокая пролиферативная активность способствует гетерогенности опухолевого очага и возникновению более агрессивного, инвазивного типа клеток [3, 4, 9].

При сравнении концентрации протеинов в крови пациентов с РМЖ концентрации CDH1 и PAI1 были статистически значимо ниже у пациентов I группы по сравнению с пациентами II группы (табл. 1). По результатам исследования цитокинов в крови пациентов с РМЖ было выявлено, что статистически значимо между I и II группами различались концентрации провоспалительных цитокинов, а именно IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  (табл. 1).

С целью выявления взаимосвязей между показателями биомаркеров, различающихся у пациентов с РМЖ с лимфогенным метастазированием и без него, был проведен корреляционный анализ по методу Спирмена (табл. 2).

Анализ взаимосвязи между экспрессией Ki-67 в опухолевой ткани и концентрациями биомар-

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ И ПРОТЕИНОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РМЖ (пг/мл),  
Ме (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

TABLE 1. VALUES OF CYTOKINE AND PROTEIN CONCENTRATIONS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH BREAST CANCER  
(pg/mL), Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Биомаркеры Biomarkers	I группа Group I	II группа Group II	p
CDH1	58335,0 (43425,0-64141,8)	75222,5 (64347,3-91088,0)	0,003
PAI1	974,7 (933,1-1077,1)	1033,7 (996,8-1675,8)	0,010
IL-6	116,4 (60,0-298,9)	21,2 (13,2-108,4)	0,030
IL-8	368,3 (237,2-603,4)	327,2 (216,0-381,3)	0,046
IL-1 $\beta$	40,3 (22,1-100,3)	8,4 (1,3-19,7)	0,001
TNF $\alpha$	3,9 (1,0-46,3)	1,0 (1,0-1,5)	0,002

Примечание. Значения концентраций цитокинов и протеинов указаны только при  $p < 0,05$ ; I группа – пациенты с РМЖ с лимфогенным метастазированием, II группа – пациенты с РМЖ без лимфогенного метастазирования.

Note. The concentration values of cytokines and proteins are indicated only at  $p < 0.05$ ; Group I, patients with breast cancer with lymphatic metastasis, group II, patients with breast cancer without lymphatic metastasis.

**ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ЭКСПРЕССИЕЙ МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67 В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ И КОНЦЕНТРАЦИЯМИ БИОМАРКЕРОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РМЖ**

TABLE 2. CORRELATIONS BETWEEN THE EXPRESSION OF THE Ki-67 PROLIFERATION MARKER IN TUMOR TISSUE AND THE CONCENTRATION OF BIOMARKERS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH BREAST CANCER

Биомаркеры Biomarkers		CDH1	PAI1	IL-6	IL-8	IL-1 $\beta$	TNF $\alpha$
Ki-67	R	-0,400	-0,401	0,296	0,400	0,339	0,565
	p	0,028*	0,027*	0,089	0,040*	0,051	0,0005*
CDH1	R	–	0,576	-0,389	0,039	-0,451	-0,401
	p	–	0,0005*	0,023	0,828	0,007*	0,022*
PAI1	R	0,576	–	-0,466	-0,420	-0,400	-0,580
	p	0,0005	–	0,006*	0,015*	0,021*	0,0004*
IL-6	R	-0,401	-0,466	–	0,673	0,759	0,734
	p	0,023	0,006	–	0,00001*	0,00002*	0,00001*
IL-8	R	0,039	-0,420	0,673	–	0,402	0,536
	p	0,828	0,015	0,00001	–	0,026*	0,001*
IL-1 $\beta$	R	-0,451	-0,400	0,759	0,402	–	0,604
	p	0,007	0,021	0,00002	0,026	–	0,0002*

Примечание. \* – значения при  $p < 0,05$ .

Note. \*, values at  $p < 0.05$ .

керов в сыворотке крови пациентов с РМЖ, показал, что Ki-67 имеет как обратные корреляционные связи с CDH1 и PAI1, так и прямые с IL-8 и TNF $\alpha$ . CDH1 имеет прямую корреляционную связь с PAI1 и обратные – с IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ . Цитокины имеют прямые корреляционные связи между собой (табл. 2).

Был проведен анализ кривой ROC для определения оптимального значения точки отсечения экспрессии Ki-67, которое могло бы наилучшим образом свидетельствовать о наличии лимфогенного метастазирования. На основе подсчитанных данных. Оптимальная точка отсечения экспрессии Ki-67 в нашем исследовании на основании данных ROC-анализа составила 12%. Значение маркера пролиферации Ki-67 равное 12% и выше свидетельствовало о наличии метастазов, а значения менее 12% – об их отсутствии.

Качество полученных результатов изучения концентраций цитокинов и протеинов в крови пациентов с РМЖ при наличии или отсутствии лимфогенного метастазирования, определенное с помощью ROC-анализа, что помимо оценки качества полученных данных позволило установ-

ить пороговые значения концентраций цитокинов и протеинов показатели которых, соответствовали наличию метастазов или их отсутствия у пациентов с РМЖ (табл. 3). При анализе ROC-кривых CDH1 и PAI1 наблюдалась следующая картина, а именно: превышение установленных пороговых концентраций соответствовало отсутствию лимфогенного метастазирования, а концентрации ниже пороговых значений – наличию метастазов в регионарных лимфатических узлах. На основании проведенных расчетов был предложен коэффициент – показатель лимфогенного метастазирования и сочетающий значения концентраций цитокинов и протеинов. Этот коэффициент, по нашему мнению, дает возможность определить отсутствие или наличие лимфогенного метастазирования у исследованных пациентов РМЖ. Этот коэффициент представляет собой отношение концентрации CDH1 к сумме показателей концентраций IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , он обладает более высокими показателями качества модели (0,872 – очень хорошее качество модели), чувствительности и специфичности по сравнению

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ROC-АНАЛИЗА МОДЕЛИ ЛИМФОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ И ПРОТЕИНОВ В КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РМЖ

TABLE 3. RESULTS OF THE ROC-ANALYSIS OF A MODEL OF LYMPHATIC METASTASIS BASED ON THE ASSESSMENT OF THE CONCENTRATION OF CYTOKINES AND PROTEINS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH BREAST CANCER

Биомаркер Biomarker	Площадь под кривой Area under curve	Пороговые значения, пг/мл Threshold values, pg/mL	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %
IL-6	0,719	51,1	80,3	61,0
IL-8	0,673	326,6	70,4	62,0
IL-1 $\beta$	0,826	20,4	81,3	77,8
TNF $\alpha$	0,806	1,2	75,0	77,8
CDH1	0,795	65500,0	77,8	81,2
PAI1	0,718	985,9	70,0	76,9

Примечание. Значения площади под кривой 0,9-1 – отличное качество модели; 0,8-0,9 – очень хорошее качество модели; 0,7-0,8 – хорошее качество модели; 0,6-0,7 – среднее качество модели; 0,5-0,6 – неудовлетворительное качество модели.

Note. Values area under curve 0.9-1, perfect model; 0.8-0.9, very good model; 0.7-0.8, good model; 0.6-0.7, adequate model; 0.5-0.6, unsatisfactory model.

ТАБЛИЦА 4. ЗНАЧЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ЛИМФОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РМЖ  
(у. е.)

TABLE 4. VALUES OF THE COEFFICIENT OF LYMPHATIC METASTASIS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH BREAST CANCER  
(c. u.)

Коэффициент Ratio	Ме (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	p	Площадь под кривой Area under curve	Встречаемость, % Occurrence, %	p
I группа Group I	1171,0 (443,1-2021,4)	0,0002	0,872	81,2	0,000001
II группа Group II	5094,4 (2493,7-18180,8)			88,9	

Примечание. I группа – пациенты с РМЖ с лимфогенным метастазированием, II группа – пациенты с РМЖ без лимфогенного метастазирования; p – значения непараметрического критерий Уилкоксона–Манна–Уитни; p – значения углового критерия Фишера. Значения площади под кривой: 0,9-1 – отличное качество модели; 0,8-0,9 – очень хорошее качество модели; 0,7-0,8 – хорошее качество модели; 0,6-0,7 – среднее качество модели; 0,5-0,6 – неудовлетворительное качество модели.

Note. Group I, patients with breast cancer with lymphatic metastasis; group II, patients with breast cancer without lymphatic metastasis; p, values of the nonparametric Wilcoxon–Mann–Whitney criterion; p, values of the Fisher angular criterion. Values area under curve: 0.9-1, perfect model; 0.8-0.9, very good model; 0.7-0.8, good model; 0.6-0.7, adequate model; 0.5-0.6, unsatisfactory model.

с показателями концентраций цитокинов и протеинов измеренных по отдельности. Значение коэффициента лимфогенного метастазирования равное 2069 условных единиц (у. е.) и меньше в 81% случаев соответствовало наличию метастазов, а значение, равное 2070 у. е. и больше в 89% случаев, – отсутствию метастазов (табл. 4).

## Обсуждение

Наше исследование не первое, которое отмечает более высокую экспрессию маркера пролиферации Ki-67 у пациентов с РМЖ с лимфогенным метастазированием, так в ряде исследований более высокая пролиферативная активность опу-

холи напрямую связана не только с наличием метастазов в лимфатических узлах, но и с инвазией, высокой степенью злокачественности и клинической стадией опухоли [3, 4, 9, 16].

Снижение концентрации CDH1 в крови пациентов с РМЖ с лимфогенным метастазированием (табл. 1) согласуется с литературными данными, согласно которым репрессия транскрипции молекулы адгезии CDH1 является признаком эпителиально-мезенхимального перехода, происходящего при повышенной пролиферации клеток и при метастазировании [19, 21]. Существуют противоречия относительно влияния PAI-1 на прогрессирование опухоли. Известно, что PAI-1 ингибирует uPA, что, в свою очередь, должно замедлять прогрессирование рака [22]. Кроме того, данный протеин, взаимодействуя с компонентами базальной мембраны и внеклеточного матрикса, опосредованно, способен препятствовать инвазии и миграции опухолевых клеток [7]. Но существуют и противоположные данные, согласно которым PAI-1 может способствовать опухолевой прогрессии. С этим связывают увеличение этого протеина в опухолевых клетках и в крови при более крупных опухолях, более высоких степенях злокачественности и инвазивных гистологических типах РМЖ [8].

Повышенные концентрации провоспалительных цитокинов в крови пациентов с лимфогенным метастазированием при РМЖ (табл. 1), вероятно, связано со способностью цитокинов активировать сигнальные пути, усиливающие миграционные свойства опухолевых клеток. Например, проопухолевые функции IL-6 связаны с сигнальными путями JAK-STAT3 и Notch, активирующими гены, ответственные за выживание опухолевых клеток, пролиферацию, ангиогенез, метастазирование [5]. Известно, что IL-8 также активирует онкогенные сигнальные пути PI3K, RAS/MAPK и JAK/STAT в опухолевых клетках, тем самым способствуя инвазии, миграции и пролиферации злокачественных клеток [10]. Кроме того, IL-8 опосредованно стимулирует секрецию матрикных металопротеиназ, разрушающих внеклеточный матрикс, что обеспечивает необходимые условия для метастазирования опухолевых клеток [18]. Проопухолевая роль IL-6 и IL-8 отмечена в статье Narita D. и соавторов, согласно которой концентрации этих цитокинов в крови пациентов с РМЖ были выше по сравнению со здоровыми донорами и положительно коррелировали со стадией заболевания и смертностью [15]. TNF $\alpha$  может воздействовать непосредственно на опухолевые клетки, вызывая в них метаболические нарушения, усиливая их инвазивные свойства [6]. Помимо этого, извест-

но, что TNF $\alpha$  необходим для миграции опухолевых клеток, что связано с усилением регуляции транскрипционного репрессора TWIST1 посредством активации IKK $\beta$  и NF- $\kappa$ B и индукцией эпителиально-мезенхимального перехода [14]. TNF $\alpha$  совместно с IL-1 $\beta$  повышают экспрессию IL-8, MCP-1 и CCL5 что способствует ангиогенезу и миграции опухолевых клеток [23]. Таким образом, провоспалительные цитокины, активируя онкогенные сигнальные пути и регулируя взаимодействия опухолевых и стромальных клеток, повышают агрессивность неоплазмы.

Обратные корреляционные связи, возникающие между маркером пролиферации Ki-67 в опухолевых клетках и протеинами в крови пациентов с РМЖ, а именно CDH1 и PAI-1 (табл. 2), ожидаются и согласуются с полученными ранее результатами. В литературе нет информации относительно взаимосвязей между концентрациями CDH1 и PAI-1 в крови и Ki-67 в опухоли, но имеются данные о корреляциях Ki-67 и маркеров эпителиально-мезенхимального перехода [3, 7, 19, 21]. Например, подробно описана взаимосвязь Ki-67 и одним из основных маркеров эпителиально-мезенхимального перехода — виментином, что связано с ослаблением межклеточных контактов и сопровождается усилением экспрессии виментина, при этом «свободные» опухолевые клетки проявляют повышенную пролиферативную активность, что в свою очередь сопровождается повышением экспрессии Ki-67 [3]. Полученные в результате исследования прямые корреляционные связи между маркером пролиферации Ki-67 в опухолевых клетках и цитокинами в крови пациентов с РМЖ (табл. 2), соотносятся с литературными данными. Например, известно, что в опухолевой ткани TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  увеличивают пролиферацию опухолевых клеток в модели подавленной метастазированием клеточной линии тройного негативного РМЖ и в комбинации с IL-6 и IL-8 также клеток люминального А подтипа [5]. Следовательно, взаимосвязи, возникающие между цитокинами, протеинами и маркером пролиферации Ki-67 могут отражать эпителиально-мезенхимальный переход, происходящий в опухолевых клетках и наделяющий их повышенным миграционным потенциалом. При этом отсутствие взаимосвязи между Ki-67 и IL-6, IL-1 $\beta$  могут быть обусловлены тем, что цитокины крови являются динамичными молекулами, и их уровень слишком быстро изменяется.

Результаты ROC-анализа модели лимфогенного метастазирования на основе оценки концентрации биомаркеров в крови у пациентов с РМЖ обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью, особенно пока-

затели концентрации IL-1 $\beta$ , демонстрирующие очень хорошее качество модели (табл. 3). Кроме того, предложенный в ходе исследования коэффициент лимфогенного метастазирования, представляющий собой отношения концентрации CDH1 к сумме показателей концентраций IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , обладает лучшим качеством модели, нежели определение концентраций только IL-1 $\beta$ . Не исключено, что использование этого коэффициента позволит сформировать группы риска пациентов с РМЖ, склонных к лимфогенному метастазированию. Не соответствовали точке отсечения предложенного коэффициента лимфогенного метастазирования только 5 пациентов, у двух из них – пациентов без лимфогенного метастазирования, но с низкими значениями коэффициента отмечалась гистологическая степень злокачественности G2, размер опухоли T2 и люминальный А молекулярный подтип, возраст обеих составил 69 лет. У одной из них отмечалась сниженная концентрация CDH1 при высоких концентрациях IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  (что соответствует показателям концентраций при лимфогенном метастазировании), у второй была повышена только концентрация IL-1 $\beta$ . Три пациента с лимфогенным метастазированием, но с высокими значениями коэффициента характеризовались: гистологической степенью злокачественности G2, размером опухоли T2, у двоих был люминальный В отрицательный, а у одной HER2/neu положительный молекулярный подтип. У пациентов с люминальным В отрицательным молекулярным подтипом была снижена концентрация IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  (что соответствует показателям концентраций без лимфогенного метастазирования), у третьей пациентки с HER2/neu положительным

молекулярным подтипом отмечалась повышенная концентрация CDH1 в сочетании с низкими концентрациями IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  (что соответствует показателям концентраций без лимфогенного метастазирования).

## Заключение

Использование Ki-67 в клинической практике рекомендуется ВОЗ и проводится практически в каждой клинике, но из-за различных методических подходов, результаты определения экспрессии этого маркера сильно варьируются. Поэтому у пациентов с РМЖ использование Ki-67 в комплексе с определением биомаркеров крови, таких как TNF $\alpha$  и CDH1, с помощью наборов с хорошо воспроизводимыми результатами даст возможность объективно оценить пролиферативную активность опухолевых клеток и использовать эти данные для составления персонализированного плана лечения пациентов. Определение отношения концентрации CDH1 к сумме показателей концентраций IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  может содействовать выявлению пациентов находящихся в группе риска по лимфогенному метастазированию. Соответственно в силу малой инвазивности, простоты и рутинности метода показатель предложенного коэффициента может способствовать предоперационному прогнозу относительно наличия или отсутствия лимфогенного метастазирования у пациентов с РМЖ.

## Финансирование

Финансирование исследования осуществлялось за счет государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (№ AAAA-A18-118030790008-7).

## Список литературы / References

1. Аутеншлюс А.И., Бернадо А.В., Давлетова К.И., Архипов С.А., Жураковский И.П., Михайлова Е.С., Прокура А.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Ляхович В.В. Белковые и иммуногистохимические маркеры заболеваний молочной железы // Биомедицинская химия, 2020. Т. 66, № 2. С. 163-173. [Autenschlyus A.I., Bernado A.V., Davletova K.I., Arkhipov S.A., Zhurakovskiy I.P., Mikhailova E.S., Proskura A.V., Bogachuk A.P., Lipkin V.M., Lyakhovich V.V. Proteins and immunohistochemical markers of breast diseases. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2020, Vol. 66, no. 2, pp. 167-173. (In Russ.)]
2. Давлетова К.И., Михайлова Е.С., Вараксин Н.А., Жураковский И.П., Прокура А.В., Сидоров С.В., Аутеншлюс А.И. Продукция цитокинов иммунокомпетентными клетками крови у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа в различных возрастных группах при лимфогенном метастазировании // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1115-1126. [Davletova K.I., Mikhaylova E.S., Varaksin N.A., Zhurakovskiy I.P., Proskura A.V., Sidorov S.V., Autenshlyus A.I. Cytokines production by blood immune cells in patients of different age groups with invasive ductal carcinoma of no special type and lymphatic metastases. *Meditinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1115-1126. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1115-1126.

3. Arafah M.A., Ouban A., Ameer O.Z., Quek K.J. KI-67 LI Expression in Triple-Negative Breast Cancer Patients and Its Significance. *Breast Cancer (Auckl.)*, 2021, Vol. 30, no. 15, 11782234211016977. doi: 10.1177/11782234211016977.
4. Asaoka M., Patnaik S.K., Zhang F., Ishikawa T., Takabe K. Lymphovascular invasion in breast cancer is associated with gene expression signatures of cell proliferation but not lymphangiogenesis or immune response. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2020, Vol. 181, no. 2, pp. 309-322.
5. Baram T., Rubinstein-Achiasaf L., Ben-Yaakov H., Ben-Baruch A. Inflammation-driven breast tumor cell plasticity: Stemness/EMT, therapy resistance and dormancy. *Front. Oncol.*, 2021, Vol. 10, 614468. doi: 10.3389/fonc.2020.614468.
6. Ben-Baruch A. Tumor necrosis factor  $\alpha$ : Taking a personalized road in cancer therapy. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 903679. doi: 10.3389/fimmu.2022.903679.
7. Humphries B.A., Buschhaus J.M., Chen Y.C., Haley H.R., Qyli T., Chiang B., Shen N., Rajendran S., Cutter A., Cheng Y.-H., Chen Y.-T., Cong J., Spinosa P.C., Yoon E., Luker K.E., Luker G.D. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1) promotes actin cytoskeleton reorganization and glycolytic metabolism in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Res.*, 2019, Vol. 17, no. 5, pp. 1142-1154.
8. Lampelj M., Arko D., Cas-Sikosek N., Kavalari R., Ravnik M., Jezersek-Novakovic B., Dobnik S., Dovnik N.F., Takac I. Urokinase plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in breast cancer – correlation with traditional prognostic factors. *Radiol. Oncol.*, 2015, Vol. 49, no. 4, pp. 357-364.
9. Liang Q., Ma D., Gao R.F., Yu K.D. Effect of Ki-67 Expression levels and histological grade on breast cancer early relapse in patients with different immunohistochemical-based subtypes. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 7648. doi: 10.1038/s41598-020-64523-1.
10. Łukaszewicz-Zajac M., Pączek S., Mroczko B. The significance of chemokine CXCL-8 in esophageal carcinoma. *Arch. Med. Sci.*, 2020, Vol. 16, no. 2, pp. 475-480.
11. Maranta A.F., Broder S., Fritzsche C., Knauer M., Thürlmann B., Jochum W., Ruhstaller T. Do YOU know the Ki-67 index of your breast cancer patients? Knowledge of your institution's Ki-67 index distribution and its robustness is essential for decision-making in early breast cancer. *Breast*, 2020, Vol. 51, pp. 120-126.
12. Mariotto A.B., Etzioni R., Hurlbert M., Penberthy L., Mayer M. Estimation of the number of women living with metastatic breast cancer in the United States. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 2017, Vol. 26, pp. 809-815.
13. Matutino A., Joy A.A., Brezden-Masley C., Chia S., Verma S. Hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer: redrawing the lines. *Curr. Oncol.*, 2018, Vol. 25, pp. 131-141.
14. Mercogliano M.F., Bruni S., Elizalde P.V., Schillaci R. Tumor necrosis factor  $\alpha$  blockade: an opportunity to tackle breast cancer. *Front. Oncol.*, 2020, Vol. 10, 584. doi: 10.3389/fonc.2020.00584.
15. Narita D., Seclaman E., Anghel A., Ilina R., Cireap N., Negru S., Sirbu I.O., Ursoniu S., Marian C. Altered levels of plasma chemokines in breast cancer and their association with clinical and pathological characteristics. *Neoplasma*, 2016, Vol. 63, no. 1, pp. 141-149.
16. Petrelli F., Viale G., Cabiddu M., Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of KI 67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2015, Vol. 153, pp. 477-491.
17. Posso M., Corominas J.M., Serrano L., Román M., Torá-Rocamora I., Domingo L., Romero A., Quintana M.J., Vernet-Tomas M., Baré M., Vidal C., Sánchez M., Saladié F., Natal C., Ferrer J., Servitja S., Sala M., Castells X.; BELE Study Group. Biomarkers expression in benign breast diseases and risk of subsequent breast cancer: a case-control study. *Cancer Med.*, 2017, Vol. 6, no. 6, pp. 1482-1489.
18. Sarode P., Schaefer M.B., Grimminger F., Seeger W., Savai R. Macrophage and tumor cell cross-talk is fundamental for lung tumor progression: we need to talk. *Front. Oncol.*, 2020, Vol. 10, 324. doi: 10.3389/fonc.2020.00324.
19. Savci-Heijink C.D., Halfwerk H., Hooijer G.K.J., Koster J., Horlings H.M., Meijer S.L., van de Vijver M.J. Epithelial-to-mesenchymal transition status of primary breast carcinomas and its correlation with metastatic behavior. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2019, Vol. 174, pp. 649-659.
20. Siersbæk R., Scabia V., Nagarajan S., Chernukhin I., Papachristou E.K., Broome R., Johnston S.J., Joosten S.E.P., Green A.R., Kumar S., Jones J., Omarjee S., Alvarez-Fernandez R., Glont S., Aitken S.J., Kishore K., Cheeseman D., Rakha E.A., D'Santos C., Zwart W., Russell A., Briskin C., Carroll J.S. IL6/STAT3 signaling hijacks estrogen receptor  $\alpha$  enhancers to drive breast cancer metastasis. *Cancer Cell*, 2020, Vol. 38, no. 3, pp. 412-423.
21. Sommariva M., Gagliano N. E-Cadherin in pancreatic ductal adenocarcinoma: a multifaceted actor during EMT. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 4, 1040. doi: 10.3390/cells9041040.
22. Völker H.U., Weigel M., Strehl A., Frey L. Levels of uPA and PAI-1 in breast cancer and its correlation to Ki67-index and results of a 21-multigene-array. *Diagn. Pathol.*, 2018, Vol. 13, no. 1, 67. doi: 10.1186/s13000-018-0737-5.

23. Yu P.F., Huang Y., Han Y.Y., Lin L.Y., Sun W.H., Rabson A.B., Wang Y., Shi Y.F. TNF alpha-activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2 (+) neutrophils. *Oncogene*, 2017, Vol. 36, pp. 482-490.

24. Zhang S., Zhang D., Yi S., Gong M., Lu C., Cai Y., Tang X., Zou L. The relationship of lymphatic vessel density, lymphovascular invasion, and lymph node metastasis in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 2, pp. 2863-2873.

**Авторы:**

**Студеникина А.А.** – к.м.н., научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; научный сотрудник «Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Михайлова Е.С.** – научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; старший научный сотрудник «Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Архипов С.А.** – д.б.н., заведующий лабораторией иммуногистохимии, биохимии и фармакологии, центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; старший научный сотрудник «Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Вараксин Н.А.** – заведующий лабораторией АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

**Проксура А.В.** – к.м.н., научный сотрудник «Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Аутеншилюс А.И.** – д.б.н., профессор, заведующий Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; главный научный сотрудник «Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Поступила 23.08.2022  
Отправлена на доработку 29.08.2022  
Принята к печати 08.11.2022

**Authors:**

**Studenikina A.A.**, PhD (Medicine), Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Mikhaylova E.S.**, Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Arkhipov S.A.**, PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Immunohistochemistry, Biochemistry and Pharmacology, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Varaksin N.A.**, Head of Laboratory, JSC “Vector-Best”, Novosibirsk, Russian Federation

**Proskura A.V.**, PhD (Medicine), Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Autenshlyus A.I.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Main Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

# ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИСХОДА ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ КОРИ У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ

Ерешенко А.А., Гусякова О.А., Мигачева Н.Б.,  
Гильмиярова Ф.Н., Лямин А.В.

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Самара, Россия

**Резюме.** Проведение своевременной вакцинации является единственным гарантом элиминации коревой инфекции. По данным литературы риск заражения корью у медицинских работников в 13-19 раз выше, чем у населения в целом. Доля лиц, не сформировавших иммунный ответ на вакцинацию, может достигать 10%. Накопление серонегативных лиц в популяции может привести к вспышке коревой инфекции. Целью данной работы является поиск биохимических и иммунологических сывороточных маркеров-предикторов выработки постvakцинальных противокоревых IgG у медицинских работников. В исследовании приняли участие 76 медицинских работников в возрасте от 19 до 51 года с лабораторно подтвержденным отсутствием антител против вируса кори. Данные лица были дважды вакцинированы живой коревой вакциной (НПО «Микроген», Россия) с интервалом в 3 месяца. Определение IgG к вирусу кори, суммарных IgG, IgM, IgA, IFN $\gamma$ , IL-6, С-реактивного белка, общего белка, АЛТ, АСТ, общего билирубина, мочевины, креатинина, белковых фракций проводили до вакцинации, через 1 месяц после вакцинации, через 1 месяц после ревакцинации, а также через 1 год после ревакцинации. Для оценки диагностической эффективности применения данных количественных показателей сыворотки крови при прогнозировании результата вакцинации использовался метод ROC-анализа. Разработка прогностической модели вероятности исхода вакцинации проводилась с использованием логистической регрессии. Потенциальными лабораторными предикторами вакцинальных неудач при вакцинации против кори у медицинских работников могут выступать IFN $\gamma$ , суммарные IgG, IgM, общий билирубин, АЛТ на различных стадиях иммунизации. При этом наиболее информативным является определение содержания показателей IFN $\gamma$  до вакцинации и IgG к вирусу кори после первой вакцинации. На основании данных показателей удалось создать регрессионные модели, предсказывающие риск как первичных, так и вторичных вакцинальных неудач. Полученные модели легли в основу разработки алгоритма прогнозирования вакцинальных неудач у медицинских работников при вакцинации против вируса кори, который может быть использован для выявления лиц из групп риска по несформированному специальному гуморальному иммунитету. Таким образом, данный алгоритм в первую очередь ориентирован на поиск лиц, не ответивших на противокоревую вакцинацию, среди которых также можно обнаружить лиц с иммунодефицитами. Мы не

**Адрес для переписки:**

Ерешенко Алена Анатольевна  
ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.  
Тел.: 8 (963) 116-31-51.  
E-mail: pystnica131902@gmail.com

**Address for correspondence:**

Alena A. Ereshchenko  
Samara State Medical University  
89 Chapaevskaya St  
Samara  
443099 Russian Federation  
Phone: +7 (963) 116-31-51.  
E-mail: pystnica131902@gmail.com

**Образец цитирования:**

А.А. Ерешенко, О.А. Гусякова, Н.Б. Мигачева, Ф.Н. Гильмиярова, А.В. Лямин «Прогнозирование исхода вакцинации против кори у медицинских работников» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2. С. 367-376. doi: 10.15789/1563-0625-OPO-2546

© Ерешенко А.А. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

A.A. Ereshchenko, O.A. Gusyakova, N.B. Migacheva, F.N. Gilmiyarova, A.V. Lyamin “Outcome prediction of the measles vaccination in healthcare employees”, Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 367-376.  
doi: 10.15789/1563-0625-OPO-2546

© Ereshchenko A.A. et al., 2023

The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-OPO-2546

исключаем, что на основании выявленных потенциальных предикторов эффективности противокоревой вакцинации возможно построение прогностических моделей и для других вакциноуправляемых инфекций.

*Ключевые слова:* вакцинация, корь, медицинские работники, предикторы, антитела, вакцинальная неудача

## OUTCOME PREDICTION OF THE MEASLES VACCINATION IN HEALTHCARE EMPLOYEES

**Ereshchenko A.A., Gusyakova O.A., Migacheva N.B., Gilmiyarova F.N.,  
Lyamin A.V.**

*Samara State Medical University, Samara, Russian Federation*

**Abstract.** Vaccination is the only guarantee for elimination of measles infection. Healthcare workers have a 13- to 19-fold higher risk for contracting measles than the general population. The number of individuals in the population who did not respond to vaccination is up to 10%, and their accumulation may lead to an outbreak of the infection. The aim of our research was to find potential predictors of arising post-vaccination measles antibodies in the panel of biochemical and immunological serum markers in healthcare workers. The group of healthcare workers (n = 76) aged from 19 to 51 years, with proven absence of pre-existing anti-measles antibodies were twice vaccinated 3 months apart with live measles culture vaccine (SPA "Microgen", Russia). Measles-specific IgG, total IgG, IgM, IgA, IFN $\gamma$ , IL-6, CRP, total protein, ALT, AST, total bilirubin, urea, creatinine, protein fractions were determined before vaccination, 1 month after vaccination, 1 month following revaccination, 1 year after revaccination. ROC analysis was used to gain access to the diagnostic performance of quantitative variables in predicting a categorical outcome. Development of a predictive probability model for the binary outcome was carried out using logistic regression. IFN $\gamma$ , total IgG, IgM, total bilirubin, ALT activity at various post-immunization stages may be considered potential laboratory predictors of measles vaccination failures in healthcare workers. Meanwhile, the contents of pre-vaccination IFN $\gamma$ , and IgG to measles virus after first vaccination proved to be most informative indexes, which formed the basis for the development of regression models predicting the risk of both primary and secondary vaccination failures. These models allowed to develop algorithm for predicting failures of the measles vaccination in healthcare workers that can be used for detection of persons at risk for non-forming specific humoral immunity. This algorithm is primarily focused on search for the persons who have not responded to measles vaccination, including subjects with probable immunodeficiency conditions. We do not exclude that, on the basis of revealed predictors following measles vaccination, it would be possible to build prognostic models of vaccination efficiency for other vaccine-managed infections.

*Keywords:* vaccination, measles, healthcare staff, predictors, antibodies, vaccination failure

### Introduction

According to the World Health Organization in 2019, there was a sharp increase in measles rates worldwide, reaching the highest level in 23 years, and measles deaths worldwide increased by almost 50%. In the WHO European Region in 2019, in Ukraine, Georgia, North Macedonia, Kazakhstan, measles incidence rates exceeded 700 cases per 1 million population [17]. Several regions have lost the status of "free of endemic measles", others have failed to achieve the required measles vaccination coverage (90%) [19, 21].

Despite the fact that in 2020 the number of recorded cases of measles infection decreased, the redistribution

of medical forces and funds to combat the pandemic of the new coronavirus infection led to failures in the implementation of planned vaccination — the only guarantor of the elimination of measles infection. As of November 2020, more than 94 million were not vaccinated on time due to shortage of vaccine because of the suspension of measles campaigns in 26 countries. Only isolated countries were able to resume vaccination campaigns after initial delays [20].

Within the framework of the WHO measles and rubella initiative, seven strategic priorities have been developed in the strategic framework for measles and rubella control for 2021-2030. The solution of which is inextricably linked to the activities of laboratory

services. One of them is to conduct research that contributes to achieving a high level of population immunity to measles [18]. One of the ways to solve this problem is to study post-vaccination measles humoral immunity in various professional, age, ethnic groups, as well as to identify the links of the vaccination response with the genetic, biochemical, immunological features of the body, and to search for predictors of the formation of immunity.

**The aim:** finding predictors of production of post-vaccination measles antibodies among biochemical and immunological serum markers in healthcare workers.

## Materials and methods

### Participants and design

This study approved by the Committee on Bioethics in Samara state medical university. The group of healthcare workers ( $n = 76$ ), conditionally healthy between the ages of 19 and 51. Inclusion criteria were practically healthy persons with serologically confirmed absence of anti-measles antibodies. The exclusion criteria were acute chronic diseases, the presence of socially significant infections, oncological, autoimmune, allergic, rheumatological diseases, immunodeficiency, pregnancy, contraindications to measles vaccination, contact with a measles patient during the last month. These persons were twice vaccinated 3 months apart with live measles culture vaccine (SPA "Microgen", Russia). Determinations of measles IgG, total IgG, IgM, IgA, IFN $\gamma$ , IL-6, CRP, total protein, ALT, AST, total bilirubin, urea, creatinine, protein fractions were carried out before vaccination (before V), 1 month after vaccination (after V1), 1 month after revaccination (after V2), 1 year after revaccination. At each study control point, all vaccinated individuals were divided into the seropositive and seronegative groups depending on the results of measles IgG determination.

### Laboratory research

Biochemical and immunological parameters were determined in serum samples taken on an empty stomach. Determination of measles IgG, IFN $\gamma$ , IL-6 was performed by ELISA (Vector-Best, Russia). Measurement of total IgG, IgM, IgA, CRP, total protein, ALT, AST, total bilirubin, urea, creatinine was performed by automatic biochemical analyzer Cobas Integra 400 plus (Roche-Diagnostics, Switzerland). Protein fractions were determined using capillary electrophoresis (Sebia, France).

### Statistics

Statistical analysis was performed using StatTech v. 2.8.5 (Developer – StatTech LLC, Russia). Quantitative variables were assessed for normality using the Shapiro-Wilk test (when the number of subjects was less than 50) or the Kolmogorov-Smirnov test (when the number of subjects was more

than 50). Quantitative variables following non normal distribution were described using median (Me) and lower and upper quartiles ( $Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$ ). Mann–Whitney U test was used to compare two groups on a quantitative variable whose distribution differed from the normal distribution. Statistical significance was assumed at  $p < 0.05$ . ROC analysis was used to assess the diagnostic performance of quantitative variables in predicting a categorical outcome. The presence or absence of measles IgG is selected as a dependent binary variable. The optimal cut-off value of the quantitative variable was estimated using the Youden's J statistic. The development of a prognostic model for the probability of a binary outcome was carried out using logistic regression. Nagelkerke R was used as a measure of the model performance.

## Results

### Prediction of primary vaccination failures

The analyzed substances representing statistically significant differences between the seropositive and seronegative groups in early (1 month after revaccination) and late (1 year) post-vaccination period, were considered as potential predictors of the absence of measles post-vaccination humoral immunity. At 1 month after vaccination, statistical differences for the groups of responders and non-responders were identified by the following analytes: IFN $\gamma$ , total IgG, IgM, measles IgG, total bilirubin, ALT at various stages of immunization (Table 1).

The diagnostic performance of the tests was evaluated by ROC analysis and is presented in Table 2.

Thus, these markers can be considered as additional predictors of primary vaccination failures in measles vaccination in healthcare workers.

To analyze the relationship of these analyzed substances with the absence of immune response formation, a logistic regression method with logit transformation of the obtained model was used. Regression equations was compiled, including combination of these analytical data from which a model characterized by a higher quality predictive test was selected:

$$P = 1/(1+e^{-z}) 100\%$$

$$z = 5.773 - 1.5X_{\text{IFN}\gamma \text{ before V}} + 3.173X_{\text{Measles IgG after V1}},$$

where  $P$  – probability of immune response to vaccination,  $e$  – exponent ( $e = 2.7182$  – constant),  $z$  – dependent binary variable (response and non-response to vaccination),  $X_{\text{IFN}\gamma \text{ before V}}$  – serum concentration IFN $\gamma$  before V,  $X_{\text{Measles IgG after V1}}$  – serum concentration Measles IgG after V1.

The resulting regression model is statistically significant ( $p < 0.001$ ). Based on the value of Nagelkerke R, the model explains 59.6% of the observed response in early post-vaccination period variance. 1 pg/ml increase of IFN $\gamma$  before V is associated with 3.8 times decrease in availability of

TABLE 1. STATISTICAL DIFFERENCES IN SERUM BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS DEPENDING ON THE RESPONSE TO VACCINATION IN EARLY POST-VACCINATION PERIOD (ONLY STATISTICALLY RELEVANT DATA ARE PRESENTED)

Analytes	Categories non-responders (n = 6) responders (n = 70)	Me	Q <sub>0.25</sub> -Q <sub>0.75</sub>	p
IFN $\gamma$ before V, pg/mL	non-responders	4.81	3.82-5.80	0.002*
	responders	3.77	3.54-3.99	
Total IgG before V, g/L	non-responders	6.38	5.93-7.80	0.032*
	responders	8.13	6.80-9.52	
Measles IgG after V1, IU/mL	non-responders	0.39	0.24-0.58	< 0.001*
	responders	1.71	0.92-1.96	
ALT after V1, U/L	non-responders	21.9	10.9-32.9	0.026*
	responders	11.2	5.5-17.0	
Total bilirubin after V1, $\mu$ mol/L	non-responders	8.8	4.8-12.7	0.005*
	responders	4.1	2.8-5.5	

Note. \*, differences are statistically significant (p < 0.05).

TABLE 2. DIAGNOSTIC ABILITY OF LABORATORY PARAMETERS AS MARKERS OF VACCINATION FAILURES IN THE EARLY POST-VACCINATION PERIOD

Analytes	AUC (p)	Se, %	Sp, %	Cut-off
IFN $\gamma$ before V, pg/mL	0.744 (p = 0.01*)	68.8	81.8	> 4.29
Total IgG before V, g/L	0.703 (p = 0.032*)	65.1	72.2	< 7.5
Measles IgG after V1, IU/mL	0.893 (p < 0.001*)	87.5	90.9	< 0.702
ALT after V1, U/L	0.917 (p = 0.033*)	83.3	50.0	> 14.4
Total bilirubin after V1, $\mu$ mol/L	0.958 (p = 0.019*)	83.3	75.0	> 6.3

Note. \*, model is statistically significant (p < 0.05).

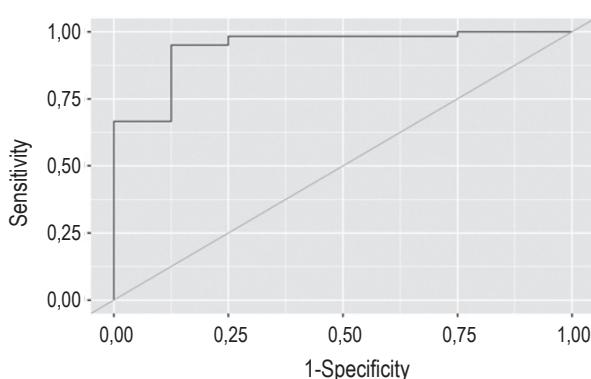


Figure 1. ROC-curve characterizing the dependence of the probability response to vaccination in early post-vaccination period on value of logistic function P

a response to vaccination in early post-vaccination period odds. 1 IU/ml increase of measles IgG after V1 is associated with 33.876 times increase in response on vaccination in early post-vaccination period odds.

When evaluating the dependence of the probability of response on vaccination in early post-vaccination period on the value of logistic function P using the ROC analysis, the following curve was obtained (Figure 1).

The area under the ROC curve comprised  $0.944 \pm 0.029$  with 95% CI: 0.887-1.000. The resulting model was statistically significant (p < 0.001). The cut-off value of logistic function P which corresponds to the highest Youden's J statistic is 0.64. If logistic function P was greater than or equal to this value availability of a response to vaccination in early post-

vaccination period was predicted. The sensitivity and specificity of the method were 95.0% and 87.5%, respectively.

#### Prediction of secondary vaccination failures

1 year after vaccination, statistical differences for the groups of responders and non-responders were identified by the following analytes: IFN $\gamma$ , total IgM, measles IgG at various stages of immunization (Table 3).

To predict secondary vaccination failures, in addition to specific IgG, indicators of total IgM in the pre-vaccination period and after the first vaccination, as well as IFN $\gamma$  before vaccination can be used (Table 4).

The compounded regression model again was based IFN $\gamma$  before V and measles IgG after V1:

$$P = 1/(1+e^{-z}) 100\%$$

$$z = 1.384 - 0.822X_{\text{IFN}\gamma \text{ before V}} + 2.494X_{\text{Measles IgG after V1}}$$

where P – probability of immune response to vaccination, e – exponent (e = 2.7182 – constant), z – dependent binary variable (response and non-response to vaccination),  $X_{\text{IFN}\gamma \text{ before V}}$  – serum concentration IFN $\gamma$  before V,  $X_{\text{Measles IgG after V1}}$  – serum concentration Measles IgG after V1.

The resulting regression model is statistically significant ( $p=0.001$ ). Based on the value of Nagelkerke R, the model explains 53.9% of the observed response in early post-vaccination period variance. Based

TABLE 3. STATISTICAL DIFFERENCES IN SERUM BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS DEPENDING ON THE RESPONSE TO VACCINATION IN EARLY POST-VACCINATION PERIOD (ONLY STATISTICALLY RELEVANT DATA ARE PRESENTED)

Analytes	Categories non-responders (n = 6) responders (n = 65)	Me	Q <sub>0.25</sub> -Q <sub>0.75</sub>	p
Total IgM before V, g/L	non-responders	1.18	0.98-2.12	0.045*
	responders	0.99	0.71-1.22	
Total IgM after V1, g/L	non-responders	1.46	1.09-2.77	0.025*
	responders	1.04	0.76-1.38	
Measles IgG after V1, IU/mL	non-responders	0.531	0.368-1.539	0.035*
	responders	1.690	0.827-1.915	
Measles IgG after V2, IU/mL	non-responders	0.649	0.450-0.848	< 0.001*
	responders	1.467	1.193-1.742	
IFN $\gamma$ before V, pg/mL	non-responders	4.39	3.14-5.63	0.045*
	responders	3.41	3.21-4.00	

Note. \*, differences are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

TABLE 4. DIAGNOSTIC CAPACITY OF LABORATORY INDICATORS AS MARKERS OF SECONDARY VACCINATION FAILURES IN MEASLES VACCINATION

Analytes	AUC (p)	Se, %	Sp, %	Cut-off
Total IgM before V, g/L	0.722 (p = 0.045*)	63.2	54.5	> 1.18
Total IgM after V1, g/L	0.758 (p = 0.025*)	89.5	50.0	> 1.76
Measles IgG after V1, IU/mL	0.737 (p = 0.035*)	94.4	54.4	< 0.549
Measles IgG after V2, IU/mL	0.960 (p < 0.001*)	100.0	90.0	< 0.829
IFN $\gamma$ before V, pg/mL	0.765 (p < 0.023*)	71.1	74.7	> 3.88

Note. \*, model is statistically significant ( $p < 0.05$ ).

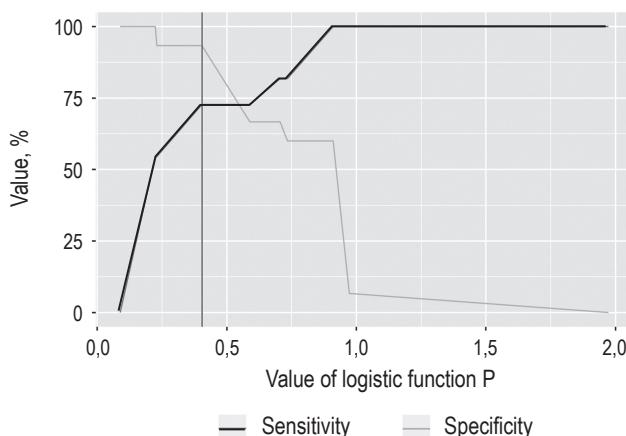


Figure 2. Analysis of the sensitivity and specificity of regression model depending on value of logistic function P

on the values of the regression coefficients, a direct relationship was established between IgG measles after V1, and the inverse association IFN $\gamma$  before V with the probability of response to vaccine in 1 year after vaccination (Table 5).

When evaluating the dependence of the probability of response on vaccination in 1-year post-vaccination period on the value of logistic function P using the ROC analysis, the following results were obtained (Figure 2).

The area under the ROC curve comprised  $0.885 \pm 0.066$  with 95% CI: 0.755-1.000. The resulting model was statistically significant ( $p < 0.001$ ). The cut-off value of logistic function P which corresponds to the highest Youden's J statistic is 0.4. The sensitivity

TABLE 5. CHARACTERISTICS OF THE ASSOCIATION OF PREDICTORS WITH THE PROBABILITY OF RESPONSE TO MEASLES VACCINE IN 1 YEAR AFTER VACCINATION

Predictors	Unadjusted		Adjusted	
	COR; 95% CI	p	AOR; 95% CI	p
IFN $\gamma$ before V	0.561; 0.264-1.192	0.133	0.440; 0.196-0.988	0.047*
Measles IgG after V1	7.306; 1.493-35.766	0.014*	12.107; 1.709-85.798	0.013*

Note. \*, association of the outcome value with the predictor value is statistically significant ( $p < 0.05$ ).

and specificity of the method were 93.3% and 72.7%, respectively.

## Discussion

Based on the data obtained, "Algorithm for predicting vaccination failures in healthcare professionals during vaccination to measles virus" was developed (Figure 3), designed for use by a therapist and immunologist during planned and emergency preventive measures.

The algorithm is implemented as follows:

1) Prior to measles vaccination, laboratory determination of IFN $\gamma$  should be carried out as well as measurement of measles IgG 1 month after the first vaccination.

2) Prediction of risk of primary vaccination failures. Apply the model to predict the risk of primary vaccination failures. If an appropriate risk is detected, decide on the need to use additional immunocorrection agents during revaccination. It is also necessary to control measles IgG 1 month after revaccination. In the absence of antibodies, repeat the control after 1 year. If antibodies are also not detected after a year, the case is classified as an initial vaccination failure. Consultation of immunologist is recommended. If measles IgG 1 month after revaccination are detected, assess the risk of secondary vaccination failure.

3) Prediction of risk of secondary vaccination failures. In a favorable prediction or unconfirmed risk of primary vaccination failures, apply a model to predict the risk of secondary vaccination failures. If an appropriate risk is detected, control measles IgG after 1 year. If antibodies are not detected, the case is classified as a secondary vaccination failure. Consultation of immunologist is also recommended.

4) In the absence of a predicted risk of primary and secondary vaccination failures, it is recommended to carry out planned revaccination.

This algorithm allows reduce the workload on the laboratory during serocontrol and to detect persons from risk groups due to the lack of immunity formation and take them under control.

Thus, IFN $\gamma$  before V and measles IgG after V1 rates demonstrated high diagnostic value in the early prediction of both primary (1 month after revaccination) and secondary (1 year after revaccination) vaccination failures. Based on resulting regression model, it is possible to identify a risk group for the formation of primary vaccination failure after the first vaccination. Which makes it possible, if it is necessary, to use additional methods and means of immunocorrection. Such as administering a booster dose, thereby increasing the likelihood of the final formation of post-vaccination humoral immunity.

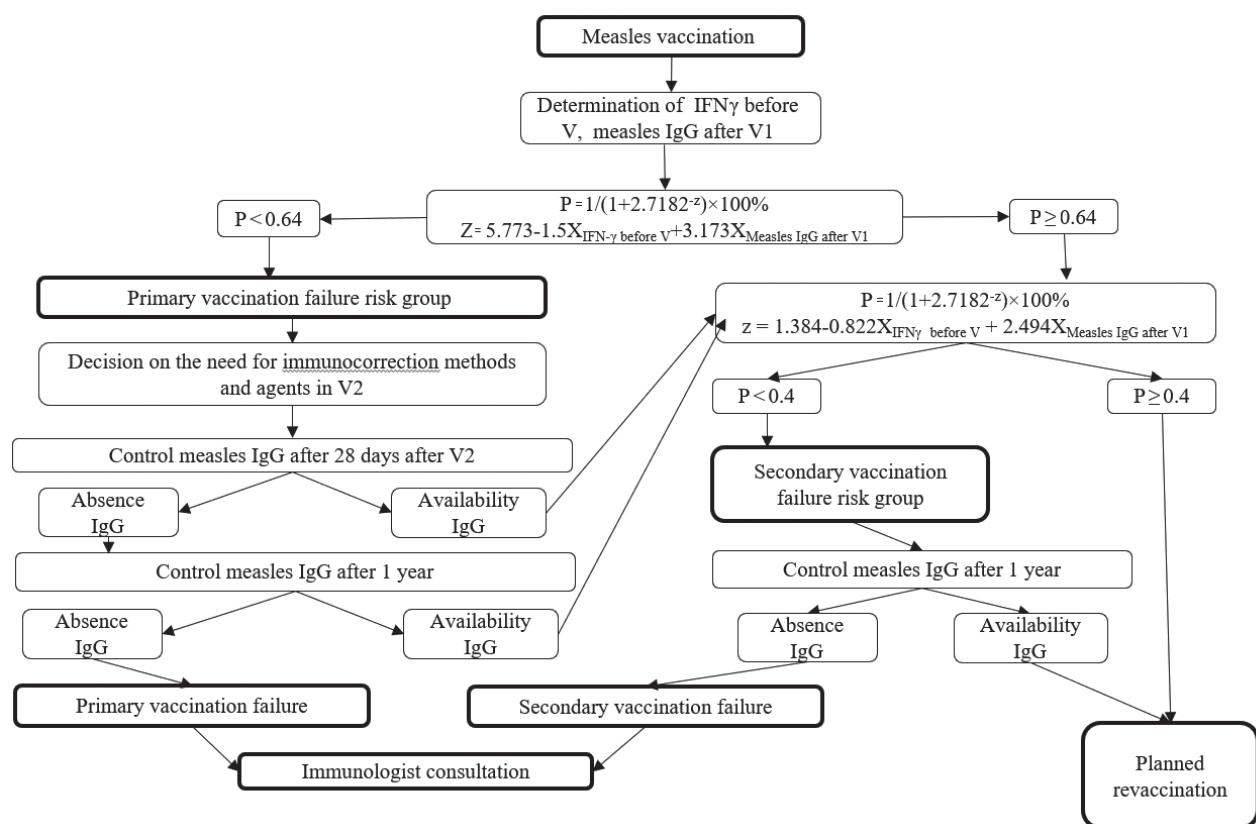


Figure 3. Algorithm for predicting vaccination failures in healthcare workers during vaccination to measles virus

Regarding studies on the effectiveness of measles vaccination, there are works on the prediction of a specific humoral immune response based on the initial parameters of the immune status of children vaccinated against measles, rubella and mumps by mathematical modeling. It is interesting to note that in these researches the IFN $\gamma$  also became one of the predictors for the successful response on vaccination 1 month after vaccination for rubella viruses and mumps. For the measles virus, this parameter turned out to be less informative. However, the study, as well as our work, established negative correlation associations of pre-vaccination IFN $\gamma$  blood content with specific IgG counts at 1 month and 1 year after measles vaccination [14, 15].

The number of individuals in the population who did not respond to vaccination can be 2-12% [4], their accumulation can lead to an outbreak of infection, especially one as highly contagious as measles [11]. According to literature, healthcare workers have a 13-19 times higher risk of contracting measles than the general population [1, 12]. The lack of post-vaccination immunity is a risk factor for healthcare workers (infection can occur through infected patients, including in the prodromal period). On the other

hand, susceptible healthcare workers can become a source of infection and put their colleagues/patients at risk. [6]. According to regulatory documents, in case of refusal to vaccinate, a worker can be removed from his professional duties [3]. In a number of countries adapt a mandatory vaccination policy with dismissal for offers [2]. At the same time, the actions of the employer when identifying a person who did not respond to vaccination are not regulated in any way. One of the options for solving this problem may be a more thorough testing of such persons, including with laboratory determination of specific IgA or cellular post-vaccination measles immunity markers.

In our other studies, it was found that after immunization, the number of seropositive to the measles virus persons decreases by 7% over a three-year period (data are not presented in this article). At the moment, laboratory monitoring of measles IgG in healthcare professionals is not carried out either as part of annual medical examinations or as part of delayed sero-monitoring of vaccination effectiveness (after 1 year or more). If monitoring of the production of measles antibodies is carried out, then as a rule, once, on average, 1-2 months after the vaccination course. Immunized individuals are not examined

until the next planned revaccination, which is carried out only after 10 years. Such tactics potentially lead to the skipping of secondary vaccination failures and the accumulation in the population of persons who do not have humoral immunity to the measles virus. The prognostic models we obtained demonstrated high quality diagnostic test according to the expert scale Hosmer N.T. Based on only two laboratory parameters, after the first vaccination, it is possible to detect persons from risk groups both for primary and secondary vaccination failures. Thus, it is possible to significantly reduce economic costs when controlling delayed vaccination results.

Current research focuses mainly on finding genetic predictors of vaccine reactivity and efficacy. Genetic determinants of the neutralizing antibody response induced by the measles vaccine (e.g., genetic variants of CD46 and IFI44L (Interferon induced protein 44 like), other genetic markers) are under research [5, 9]. It can prospectively identify potential non-responders and susceptible individuals who will ultimately require additional measles vaccination or the use of an improved vaccine. But unfortunately, at the moment, it is impossible to conduct widespread genetic research due to their labor intensity and high cost. However, not only genetic, but also immunological, biochemical, hematological markers or their combination in a mathematical model can act as predictors of vaccination effectiveness [7, 10, 13, 16]. Their determination in the blood seems less laborious and costly, which means that it makes the prognosis of the outcome with their help more accessible.

Since healthy medical professionals were subject to examination, almost all values of the studied indicators fit into the reference intervals. Nevertheless, cases of primary and secondary vaccination failures were identified among the examined persons. These failures may have been both specific for measles vaccination (genetic features) and immunodeficiency conditions. The proposed algorithm allows to detect persons from both of these groups. Thus, this algorithm is primarily focused on finding persons who have not responded to

measles vaccination, among whom immunodeficiency persons can also be found. We do not exclude that based on the identified potential predictors of the effectiveness of measles vaccination, it is possible to build prognostic models for other vaccine-managed infections. This area is a prospect of our research.

It is known that medical professionals are characterized by certain features of immune status [8]. Our prediction model is constructed in the study of post-vaccination immunity of healthcare workers; however, it cannot be ruled out that it may be applicable to the population as a whole. The study of the predictive ability of the obtained models for representatives of other professions and for the adult population as a whole is also one of the prospects for this work.

## Conclusions

Potential laboratory predictors of vaccination failures in measles vaccination in healthcare workers may be considered IFN $\gamma$ , total IgG, IgM, total bilirubin, activity ALT at various stages of immunization. At the same time, the most informative is the determination of the content of pre-vaccination IFN $\gamma$  and IgG to measles virus after first vaccination, which formed the basis for the development of regression models predicting the risk of both primary and secondary vaccination failures. These models formed the basis of the algorithm for predicting vaccination failures in healthcare workers during vaccination to measles virus that can be used for detection of persons from risk groups for non-formed specific humoral immunity.

## Acknowledgments

Authors would like to thank Vladimir Alexandrovich Antipov, assistant of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics of SamSMU, for his help in preparing English version of the article.

## References

1. Botelho-Nevers E., Cassir N., Minodier P., Laporte R., Gautret P., Badiaga S., Thiberville D.J., Ninove L., Charrel R., Brouqui P. Measles among healthcare workers: a potential for nosocomial outbreaks. *Euro Surveill.*, 2011, Vol. 16, no. 2, 19764. doi: 10.2807/ese.16.02.19764-en.
2. Galanakis E., Jansen A., Lopalco P.L., Giesecke J. Ethics of mandatory vaccination for healthcare workers. *Euro Surveill.*, 2013, Vol. 18, no. 45, 20627. doi: 10.2807/1560-7917.ES2013.18.45.20627.
3. Government Decree of July 15, 1999 N 825 "On approval of the list of work fulfillment of which is associated with a high risk of infectious disease, and requires mandatory vaccinations" (In Russ.) Available at: <https://base.garant.ru/12116330/>.
4. Haralambieva I.H., Kennedy R.B., Ovsyannikova I.G., Schaid D.J., Poland G.A. Current perspectives in assessing humoral immunity after measles vaccination. *Expert Rev. Vaccines*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 75-87.
5. Haralambieva I.H., Ovsyannikova I.G., Kennedy R.B., Larrabee B.R., Zimmermann M.T., Grill D.E., Schaid D.J., Poland G.A. Genome-Wide Associations of CD46 and IFI44L Genetic Variants with Neutralizing Antibody Response to Measles Vaccine. *Hum. Genet.*, 2017, Vol. 136, no. 4, pp. 421-435.

6. Haviari S., Bénet T., Saadatian-Elahi M., André P., Loulergue P., Vanhems P. Vaccination of healthcare workers: A review. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2015, Vol. 11, no. 11, pp. 2522-2537.
7. Iyer A.S., Khaskhely N.M., Leggat D.J., Ohtola J.A., Saul-McBeth J.L., Khuder S.A., Westerink M.A. Inflammatory markers and immune response to pneumococcal vaccination in HIV-positive and -negative adults. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 3, e0150261. doi: 10.1371/journal.pone.0150261.
8. Khrapunova I.A., Chuvakova I.M., Utkina G.S., Pronina O.A., Zubova Yu.E., Samsonov A.V., Suchkov S.V. The specificity of the immune status of medical personnel involved in active production. *Immunologiya*, 2004, Vol. 25, no. 4, p. 233. (In Russ.).
9. Marchini J., Donnelly P., Cardon L.R. Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nat. Genet.*, 2005, Vol. 37, no. 4, pp. 413-417.
10. Moore S.E., Richards A.A., Goldblatt D., Ashton L., Szu S.C., Prentice A.M. Early-life and contemporaneous nutritional and environmental predictors of antibody response to vaccination in young Gambian adults. *Vaccine*, 2012, Vol. 30, pp. 4842-4848.
11. Mossong J., Muller C.P. Estimation of the basic reproduction number of measles during an outbreak in a partially vaccinated population. *Epidemiol. Infect.*, 2000, Vol. 124, pp. 273-278.
12. Muscat M. Who gets measles in Europe? *J. Infect. Dis.*, 2011, Vol. 204, no. 1, pp. 353-365.
13. Rosa A., Pye V.E., Graham C., Muir L., Seow J., Ng K.W., Cook N.J., Rees-Spear C., Parker E., Dos Santos M.S., Rosadas C., Susana A., Rhys H., Nans A., Masino L., Roustan C., Christodoulou E., Ulferts R., Wrobel A.G., Short C.E., Fertleman M., Sanders R.W., Heaney J., Spyer M., Kjær S., Riddell A., Malim M.H., Beale R., MacRae J.I., Taylor G.P., Nastouli E., van Gils M.J., Rosenthal P.B., Pizzato M., McClure M.O., Tedder R.S., Kassiotis G., McCoy L.E., Doores K.J., Cherepanov P. SARS-CoV-2 recruits a haem metabolite to evade antibody immunity. *Sci. Adv.*, 2021, Vol. 7, no. 22, eabg7607. doi: 10.1126/sciadv.abg7607.
14. Toptygina A.P., Aziattseva V.V., Kislytsyn A.A., Bocharov G.A. Method for prediction of primary and secondary vaccinal failures at vaccination against viruses of rubella, rubella and epidemic hepatitis in children using Priorix vaccine and method of individual approach to correction of vaccinal failures. Patent for the invention RU 2599506 C1, 10.10.2016. Application № 2015123447/15, 18.06.2015. (In Russ.)
15. Toptygina A.P., Aziattseva V.V., Savkin I.A., Kislytsyn A.A., Semikina E.L., Grebennikov D.S., Alyoshkin V.A., Sulimov A.V., Sulimov V.B., Bocharov G.A. The prediction of specific humoral immune responses using the baseline immune status parameters in children, vaccinated with measles-mumps-rubella vaccine. *Immunologiya*, 2015, Vol. 36, no. 1, pp. 22-30. (In Russ.)
16. Verschoor C.P., Lelic A., Parsons R., Evelegh C., Bramson J.L., Johnstone J., Loeb M.B., Bowdish D.M.E. Serum C-reactive protein and congestive heart failure as significant predictors of Herpes Zoster vaccine response in elderly nursing home residents. *J. Infect. Dis.*, 2017, Vol. 216, no. 2, pp. 191-197.
17. WHO. A report on the epidemiology of selected vaccine-preventable diseases in the European Region: №1/2019. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/346924>.
18. WHO. Measles and rubella strategic framework 2021-2030. Available at: <https://www.who.int/publications/item/measles-and-rubella-strategic-framework-2021-2030>.
19. WHO. Seventh meeting of the European regional verification commission for measles and rubella elimination (RVC) (Paris, France 13-15 June 2018). Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345704>.
20. WHO. Worldwide measles deaths climb 50% from 2016 to 2019 claiming over 207 500 lives in 2019: News release. Available at: <https://www.who.int/news-room/detail/12-11-2020-worldwide-measles-deaths-climb-50-from-2016-to-2019-claiming-over-207-500-lives-in-2019>.
21. WHO. 2018 Assessment report of the Global Vaccine Action Plan. Strategic Advisory Group of Experts on Immunization. Geneva, 2018. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/276967>.

**Авторы:**

**Ерешченко А.А.** – ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

**Гусякова О.А.** – д.м.н., доцент, заведующая кафедрой фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

**Authors:**

**Ereshchenko A.A.**, Assistant Professor, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

**Gusyakova O.A.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

**Мигачева Н.Б.** – д.м.н., доцент, заведующая кафедрой педиатрии ИПО ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

**Гильмиярова Ф.Н.** – д.м.н., заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

**Лямин А.В.** – д.м.н., доцент, профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Поступила 09.07.2022

Отправлена на доработку 20.08.2022

Принята к печати 10.09.2022

**Migacheva N.B., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pediatrics, Institution of Professional Education,, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation**

**Gilmiyarova F.N., PhD, MD (Medicine), Honored Worker of Science, Professor, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation**

**Lyamin A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation**

Received 09.07.2022

Revision received 20.08.2022

Accepted 10.09.2022

# ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ПЕРЕУТОМЛЕНИЯ В СПОРТЕ

Мягкова М.А.<sup>1</sup>, Петроценко С.Н.<sup>1</sup>, Боброва З.В.<sup>1</sup>, Орлова Е.А.<sup>1</sup>,  
Крылов А.С.<sup>1</sup>, Мосейкин И.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

<sup>2</sup> Российская медицинская академия последипломного образования, Москва, Россия

**Резюме.** Исследование реальных возможностей роста мастерства и результатов у квалифицированных спортсменов в немалой степени определяется эффективностью адаптационных свойств организма к возрастающим физическим нагрузкам. Интенсивные нагрузки и недостаточное восстановление зачастую приводят к развитию утомления и снижению работоспособности у профессиональных спортсменов. Изучение вопросов механизма возникновения и развития физического утомления, методов его прогнозирования, диагностики и коррекции является актуальным. При экстремальных физических и психоэмоциональных нагрузках происходит регуляция адаптационных процессов основными биохимическими системами организма. Особая роль принадлежит факторам гуморального иммунитета – естественным антителам, которые являются компонентом врожденного иммунитета, циркулируют в крови здорового человека в отсутствие явной антигенной стимуляции. Разработаны аналитические методы измерения уровня естественных антител, отражающих состояние системы эндогенных биорегуляторов, участвующих в молекулярных механизмах процесса адаптации. Важное место среди них занимают регуляторы опиоидной системы  $\beta$ -эндорфин и орфанин.

Проведено определение биохимических и иммунологических показателей 10 спортсменов-фигуристов квалификации КМС, МС, средний возраст, которых составлял  $16 \pm 0,4$  лет, а спортивный стаж  $9 \pm 1$  лет. Длительность исследования распределялась на 5 этапов и составляла 62 дня. В процессе динамических наблюдений на фоне больших тренировочных нагрузок не выявлены отчетливые сдвиги биохимических показателей в сторону напряжения адаптации и ухудшения восстановления. Методом ИФА в сыворотке крови спортсменов измеряли уровень естественных антител к орфанину,  $\beta$ -эндорфину. Установлено, что каждый спортсмен характеризуется индивидуальным иммуно-

## Адрес для переписки:

Петроценко Светлана Николаевна  
ФГБУН «Институт физиологически активных веществ»  
Российской академии наук  
111024, Россия, Москва, ул. Авиамоторная, 51а,  
ООО «ДИАНАРК».  
Тел.: 8 (495) 673-39-42  
E-mail: dianark777@mail.ru

## Address for correspondence:

Svetlana N. Petrochenko  
Institute of Physiologically Active Substances, Russian  
Academy of Sciences  
LLC “DIANARK”  
51a Aviamotornaya St  
Moscow  
111024 Russian Federation  
Phone: +7 (495) 673-39-42  
E-mail: dianark777@mail.ru

## Образец цитирования:

М.А. Мягкова, С.Н. Петроценко, З.В. Боброва,  
Е.А. Орлова, А.С. Крылов, И.А. Мосейкин  
«Исследование показателей гуморального иммунитета  
для оценки состояния переутомления в спорте»  
// Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2.  
С. 377-386. doi: 10.15789/1563-0625-SOH-2338  
© Мягкова М.А. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

M.A. Myagkova, S.N. Petrochenko, Z.V. Bobrova,  
E.A. Orlova, A.S. Krylov, I.A. Moseikin “Study of humoral  
immunity indices for assessing physical exhaustion in sports”,  
Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya,  
2023, Vol. 25, no. 2, pp. 377-386.  
doi: 10.15789/1563-0625-SOH-2338  
© Myagkova M.A. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-SOH-2338

профилем. На начальном этапе обследования уровень антител к  $\beta$ -эндорфину находился в границах нормы, кроме его снижения у одного спортсмена. Уровень антител к орфанину у большинства был выше нормы, что может быть связано с ингибиторным контролем болевого сигнала. При дальнейшем исследовании в динамике установлено, что иммунологические показатели, естественные антитела к опиоидным пептидам, изменяются в соответствии с ресурсным состоянием адаптации спортсмена. Эти показатели отражают с момента начала тренировок и на протяжении всего периода психоэмоциональный потенциал и порог переносимости боли для спортсменов. Поэтому с прогностической точки зрения в процессе тренировки важно проводить контроль содержания естественных антител к  $\beta$ -эндорфину и орфанину у спортсменов. Такой мониторинг индивидуального профиля иммунологических показателей спортсмена позволяет подбирать более эффективную, персональную тренировочную программу.

*Ключевые слова:* естественные антитела,  $\beta$ -эндорфин, орфанин, иммуноферментный анализ, адаптационный ресурс, переутомление в спорте

## STUDY OF HUMORAL IMMUNITY INDICES FOR ASSESSING PHYSICAL EXHAUSTION IN SPORTS

**Myagkova M.A.<sup>a</sup>, Petrochenko S.N.<sup>a</sup>, Bobrova Z.V.<sup>a</sup>, Orlova E.A.<sup>a</sup>,  
Krylov A.S.<sup>a</sup>, Moseikin I.A.<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

<sup>b</sup> Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Studies of real opportunities for physical skills of athletes sufficiently depend on their adaptive potential for increasing physical loads. Extreme physical and psychoemotional loads may lead to overwork and decreased physical ability in professional sportsmen. These adaptation processes are regulated by the main biochemical systems of the body. A special role belongs to the factors of humoral immunity, i.e., natural antibodies, which are a component of innate immunity. They circulate in blood of healthy persons in absence of obvious antigenic stimulation. Analytical techniques for measuring the level of natural antibodies that reflect the state of the system of endogenous bioregulators involved into the molecular mechanisms of adaptation process have been developed. An important role among them is played by the regulators of the opioid system  $\beta$ -endorphin and orpharin. The biochemical and immunological parameters were determined in 10 athletes active in figure skating (Master of Sports), whose average age was  $16 \pm 0.4$  years, and sport experience of  $9 \pm 1$  years. The duration of the study was divided into 5 stages and was 62 days. During the dynamic observations in the course of intensive training, no clear shifts in biochemical parameters were revealed towards adaptation stress and delayed recovery. The level of natural antibodies to orpharin and beta-endorphin was measured in the athletes blood serum by ELISA technique. It is found that each athlete is characterized by individual immune profile. At the initial stage of the examination, the level of antibodies to beta-endorphin was within normal ranges, except for its decrease in one athlete. The level of antibodies to orpharin in majority of cases was higher than normal, probably, due to inhibitory control of the pain signal. Further study in time dynamics revealed that the immunological parameters, natural antibodies to opioid peptides, change in accordance with the state of adaptation resources in the athletes. These indexes reflect psycho-emotional potential and pain tolerance threshold for athletes from the start of training and throughout the entire period. Therefore, from a prognostic point of view, it is important to monitor the content of natural antibodies to beta-endorphin and orpharin in athletes in the course of training. Such individual monitoring of the athlete's immunological indices allows us to select a more effective, personal training program.

*Keywords:* natural antibodies, beta-endorphin, orpharin, enzyme immunoassay, adaptive resource, fatigue, sports

Работа выполнена в соответствии с исследованием, согласно госрегистрации № 01200952666.

## Введение

Исследование реальных возможностей роста мастерства и результатов у квалифицированных спортсменов в немалой степени определяется эффективностью адаптационных свойств организма к возрастающим физическим нагрузкам [2, 15]. Интенсивные нагрузки и недостаточное восстановление зачастую приводят к развитию утомления и снижению работоспособности у профессиональных спортсменов [4]. На сегодняшний день, несмотря на многочисленные научные исследования, посвященные изучению вопроса физического утомления, своевременное распознавание этого состояния остается затруднительным. Предложено множество формулировок, пытающихся с достаточной точностью отразить понятие физического утомления, однако исследователи не пришли к единому мнению. Существующие средства диагностики этого состояния не являются исчерпывающими и вариабельны в зависимости от вида, направленности тренировочной деятельности индивидуальных и других факторов [1, 20]. Все это затрудняет разработку и применение средств коррекции и восстановительных мероприятий при утомлении. В связи с этим детальное изучение вопросов механизма возникновения и развития физического утомления, методов его прогнозирования, диагностики и коррекции является актуальным [2]. При экстремальных физических и психоэмоциональных нагрузках происходит регуляция адаптационных процессов основными биохимическими системами организма. К ним, в первую очередь, относятся сердечно-сосудистая, дыхательная, ноцицептивная, иммунная и нервная системы [19]. Особая роль принадлежит факторам гуморального иммунитета – естественным антителам (e-Ат). Антитела являются компонентом врожденного иммунитета, циркулируют в крови здорового человека в отсутствие явной антигенной стимуляции, а их продукцию осуществляет особая популяция CD5<sup>+</sup> В-клеток [5]. Известно, что e-АТ способны принимать участие в широком спектре физиологических реакций организма: от иммунного регулирования, обеспечения внутреннего гомеостаза, неспецифической барьерной роли против чужеродных патогенных антигенов, до транспортной функции и модуляции действия биологически активных веществ. В настоящее время разработаны аналитические методы измерения уровня естественных антител (e-Ат), отражающих состояние системы эндоген-

ных биорегуляторов, участвующих в молекулярных механизмах процесса адаптации [9]. Важное место в поддержании гомеостатического равновесия занимают ЭБ опиоидной системы [22].

Цель данной работы заключалась в определении иммунологических показателей, уровня антител к эндогенным регуляторам адаптации бета-эндорфину и орфанину у спортсменов фигуристов в динамике тренировочного цикла для выявления прогностических маркеров адаптационных ресурсов.

## Материалы и методы

В экспериментальном исследовании участвовали 10 спортсменов-фигуристов квалификации КМС, МС, средний возраст, которых составлял  $16 \pm 0,4$  лет, а спортивный стаж  $9 \pm 1$  лет. В контрольную группу ( $n = 10$ ) включены регулярно тренирующиеся спортсмены, одинакового возраста с обследуемыми фигуристами. Все образцы предоставлены спортивной школой олимпийского резерва «Воробьевы Горы», Москва.

Забор образцов сыворотки крови для исследования проводили в соответствии с учебно-тренировочным процессом (УТП), запланированным тренером. Длительность динамического исследования распределялась на 5 этапов и составляла в общем 62 дня. Для проведения процедуры анализа пробирки с образцами крови помещали в термостат на 30 мин при  $T = 37$  °C, затем образовавшуюся сыворотку центрифугировали при 3000 об/мин (центрифуга CentrifugeCM-6M, ELMILtd, Латвия). Далее проводили тестирование полученных образцов.

Для всех фигуристов, принимавших участие в эксперименте, проведено определение показателей формулы периферической крови и биохимические исследования по унифицированным методам, принятым для обследования спортсменов [7, 8]. В каждом образце крови проанализированы следующие показатели: количество эритроцитов (RBC), ретикулоцитов (RET), тромбоцитов (PLT), концентрацию гемоглобина (HGB, г/л), гематокрит (HCT, %), средний объем эритроцитов (MCV, фл.), тромбоцитов (MPV, фл.), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH, пг.) и среднюю концентрацию клеточного гемоглобина (MCHC, г/л). Также были рассчитаны показатели лейкоцитарной формулы – относительное и абсолютное количество нейтрофилов (NEUT, % и  $10^9/\text{л}$ ), лимфоцитов (LYMPH, % и  $10^9/\text{л}$ ), моноцитов (MONO, %, и  $10^9/\text{л}$ ), эозинофилов (EOS, % и  $10^9/\text{л}$ ) и базофилов (BASO, %, и  $10^9/\text{л}$ ). При проведении биохимического анализа крови определяли уровень кортизола, тестосте-

рона (нмоль/л), железа, креатинина прямого и общего билирубина (мкмоль/л), мочевины, глюкозы, кальция общего, магния (ммоль/л), общего белка, АЛТ, АСТ (ЕД/л).

Определение антител к регуляторам адаптации осуществляли методом твердофазного ИФА [6]. Иммуноферментный анализ (ИФА) выполняли на полистирольных планшетах фирмы Nunc (Дания). Учет результатов ИФА проводили на спектрофотометре с вертикальным ходом луча фирмы Thermo (Финляндия) при длине волны 450 нм. Иммунохимическое исследование методом ИФА включало следующие этапы: иммобилизацию комплекса синтетического антигена, состоящего из коньюгата-гаптена производного  $\beta$ -эндорфина, орфанина, с полимерным носителем на полистирольном планшете. Связывание указанного выше антигена со специфическими антителами анализируемого образца. Выявление образовавшегося иммунного комплекса с помощью антивидовых антител, меченных ферментом пероксидазой хрена. Измерение ферментативной активности в образовавшемся иммунном комплексе. Для проведения ИФА использовали «Набор реагентов для иммуноферментного определения антител к эндогенным биорегуляторам в сыворотке крови «АДИМУСТАТ®» (ФСР 2010/08813) (производство «Дианарк»). Результаты измерения в ИФА оптической плотности (ОП) выражают в условных единицах ( $K_{OD_{450}}$ ) и рассчитывают по формуле  $K_{OD_{450}} = \text{ОП анал. обр.} - \text{ОП контр. обр.} / \text{ОП контр. обр.}$  Синтез коньюгированных антигенов и условия проведения анализа выполняли в соответствии с разработанной нами ранее схемой [8].

Результаты исследований оценивали с использованием средней арифметической величины ( $M$ ), их стандартного отклонения ( $s$ ). Анализ различий показателей, измеренных в процессе этапов тренировки, проводили при помощи парного критерия Стьюдента. Достоверность различий показателей у спортсменов и лицами из контрольной группы проводили, используя критерий Стьюдента. Связь между параметрами оценивали с помощью уравнения регрессии, силу связи и направление определяли вычислением коэффициента корреляции ( $r$ ) по Пирсону. Зависимость между несколькими переменными величинами описывали уравнением множественной регрессии (коэффициент корреляции  $R$ ). Для анализа данных использовали пакеты программ «Биостат» и «Статистика 6».

## Результаты

Проведено обследование 10 спортсменов, занимающихся парным фигурным катанием. Ана-

лиз образцов сыворотки крови на начальном этапе тренировок включал биохимическое и иммунологическое исследование, а также определение показателей формулы периферической крови. Обнаружено, что в большинстве своем, гематологические и биохимические показатели не отличались от нормы. Так, уровень эритроцитов, гемоглобина, ретикулоцитов, средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците у всех спортсменов были в норме. Уровень железа соответствовал норме в 90% случаев. Показатели гематокрита снижены у двух спортсменов. У всех спортсменов уровень кортизола был в пределах референсного диапазона, а уровень тестостерона значительно понижен у половины обследованных спортсменов.

В лейкоцитарной формуле наблюдали отклонения. Так, у 4 спортсменов из 10 было снижено содержание нейтрофилов и, соответственно, повышенено содержание лимфоцитов. У одного фигуриста повышен уровень эозинофилов (на 2%) и снижен уровень лейкоцитов. И еще, для одного спортсмена снижено содержание лейкоцитов, нейтрофилов, повышенено содержание лимфоцитов и базофилов. Таким образом, отклонения в лейкоцитарной формуле наблюдали у 6 спортсменов из 10 (60%).

Анализ биохимических показателей не выявил отклонений в содержании печеночных ферментов. У всех обследуемых спортсменов содержание прямого билирубина, кальция общего магний было в норме. У трех наблюдали 1,5-2-кратное снижение глюкозы и повышение уровня креатинина на 13-18 мкМ. На рисунке 1 представлены спортсмены (в%), имеющие наиболее значимые отклонения в клинических и биохимических показателях.

Перспективными маркерами, которые можно использовать для оценки адаптации организма к экстремальным нагрузкам, являются факторы гуморального иммунитета – естественные антитела (е-Ат) к эндогенным регуляторам адаптации. Проведено определение уровня е-Ат к  $\beta$ -эндорфину и орфанину в сыворотке крови спортсменов фигуристов.

Анализ иммунологических показателей, уровней е-Ат у фигуристов показал на начальном этапе (таб.1), для системы опиоидных пептидов содержание антител к  $\beta$ -эндорфину в целом, находится в границах нормы, снижен только у одного спортсмена. С другой стороны, уровень антител к орфанину для большинства фигуристов находится на верхней границе нормы или превышает ее.

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ФИГУРИСТОВ НА НАЧАЛЬНОМ ЭТАПЕ ОБСЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. IMMUNOLOGICAL INDICATORS OF FIGURE SKATERS AT THE INITIAL STAGE OF THE EXAMINATION

Показатели уровня естественных антител (KOD <sub>450</sub> ИФА) в сыворотке крови обследуемых фигуристов, выраженные в условных единицах					
Исследуемые эндогенные биорегуляторы Studied endogenous bioregulators	Обследуемая группа фигуристов Group of surveyed figure skaters				
	Спортсменки Sportswomen				
	1	2	3	4	5
β-эндорфин β-endorphin	0,41 ↓	0,79	0,65	0,68	0,67
Орфанин Orphanin	1,26 ↑	1,14 ↑	0,76	1,94 ↑	1,18
	Спортсмены Sportsman				
	1	2	3	4	5
β-эндорфин β-endorphin	0,85 ↑	0,79	0,59	0,71	0,51
Орфанин Orphanin	1,14 ↑	0,96	0,91	1,06 ↑	0,68

Примечание. ↑ – увеличение показателя при сравнении со значениями контроля ( $p < 0,05$ ), ↓ – снижение показателя при сравнении со значениями контроля ( $p < 0,05$ ). Показатели контрольной группы для β-эндорфина составляли диапазон 0,59-0,69, а для орфанина 0,76-0,88 усл. ед.

Note. ↑, increase in the indicator comparing with the control values ( $p < 0.05$ ); ↓, decrease in the indicator comparing with the control values ( $p < 0.05$ ). Indicators of control group to β-endorphin ranged from 0.59-0.69 and for orphanin from 0.76-0.88 c. u.

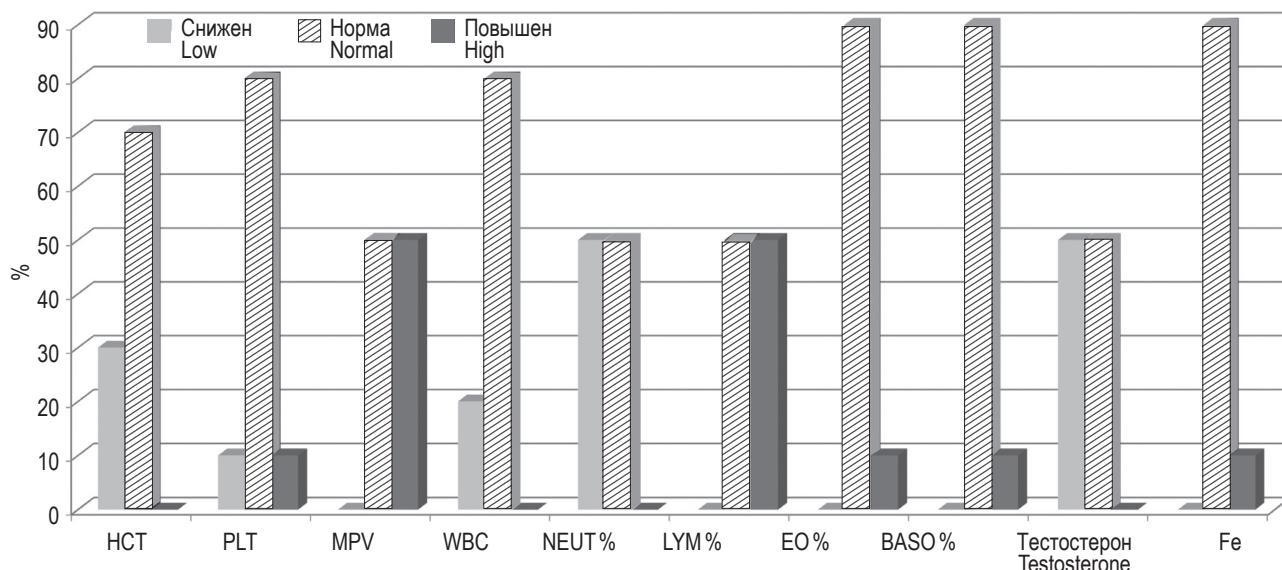


Рисунок 1. Показатели крови у фигуристов. Градация по уровням: пониженный, норма, повышенный

Figure 1. Blood indicators of figure skaters. Gradation by level: low, normal, high

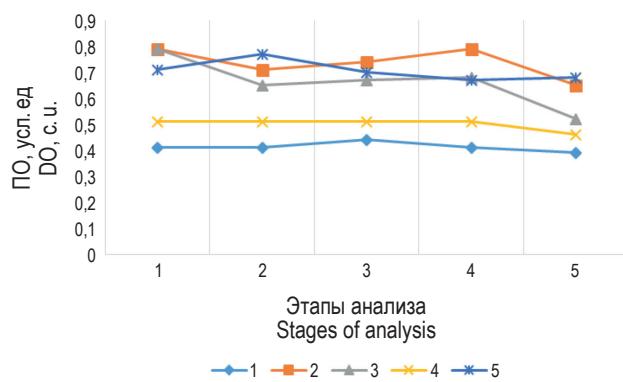


Рисунок 2. Динамика уровней бета-эндорфина в группе спортсменок-фигуристок

Figure 2. Dynamics of beta-endorphin levels in the group of female figure skaters

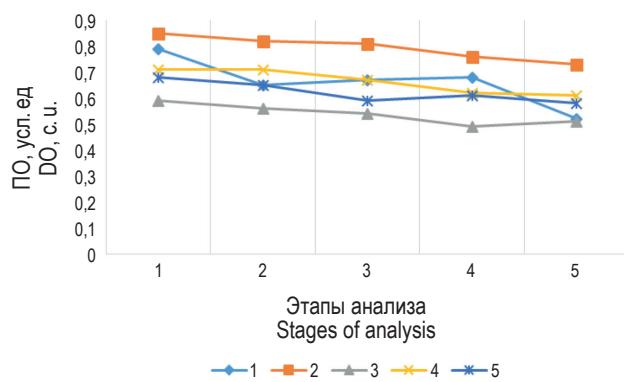


Рисунок 3. Динамика уровней бета-эндорфина в группе спортсменов-фигуристов

Figure 3. Dynamics of beta-endorphin levels in the group of male figure skaters

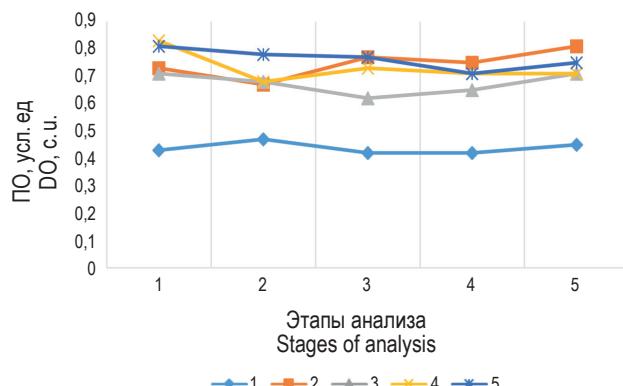


Рисунок 4. Изменение уровней е-Ат к орфанину в группе спортсменок-фигуристок

Figure 4. Changes in the levels of e-At to orphafin in the female group

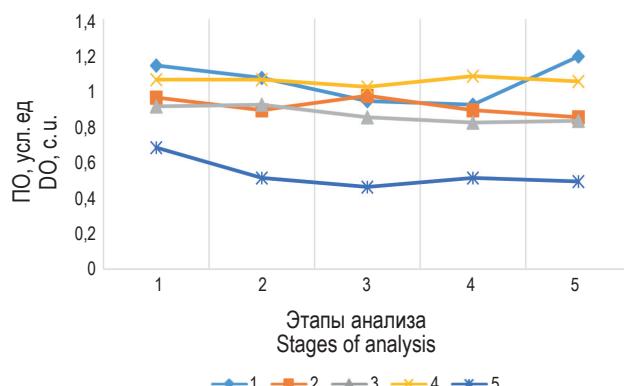


Рисунок 5. Изменение уровней е-Ат к орфанину в группе спортсменов-фигуристов

Figure 5. Changes in the levels of e-At to orphafin in the male group

Далее проводили динамические наблюдения на 5 этапах в течении 62 дней. При этом спортсменами соблюдался режим тренировочных нагрузок, при двух тренировках в день и участии в серии товарищеских показательных выступлений. На рисунках 2-5 представлены результаты исследования уровней е-Ат к  $\beta$ -эндорфину и орфанину в динамике.

На начальном этапе тренировок (табл. 1) иммунологические показатели для  $\beta$ -эндорфина в основном у всех спортсменов достоверно не отличались от нормы. Только для спортсмена под номером один в группе девушек его уровень значительно снижен, а в группе юношей повышен. На заключительном этапе тренировок указанные показатели сохранили тенденцию к снижению для всех спортсменов. В дополнение произошло уменьшение уровня е-Ат к  $\beta$ -эндорфину для фигуристов под №3 в группах девушек и юношей.

К началу тренировок показатели для орфанина превышают норму для всех спортсменок группы девушек и фигуристов №1 и №4 в группе юношей. На заключительном этапе тренировок для фигуристок девушек сохранились повышенные показатели орфанина. А в случае рассмотрения юношеской группы отмечена тенденция к снижению этих показателей у всех спортсменов. Для фигуриста №5 этой группы обнаружен достоверный спад уровня е-Ат к орфанину.

## Обсуждение

Важной задачей спортивной медицины является обеспечение объективной оценки состояния организма спортсмена, достоверное определение его текущей адаптации к высоким тренировочным нагрузкам и прогноза его адаптационных возможностей в будущем [17, 18]. Поиску причин

и механизмов возникновения утомления и максимально точного определения этого состояния на основе методов лабораторной диагностики уделяется много внимания отечественными и зарубежными авторами. На сегодняшний день общепризнанным является факт возникновения торможения корковых нейронов при утомлении и нарушения вегетативного равновесия в работе нервной системы. Для диагностики утомления используют спектр биохимических, физиологических и психофизиологических методов [3, 20].

К настоящему времени собран большой фактический материал об определении множества биохимических показателей у элитных спортсменов [13, 21]. Проводятся поиски по выбору биопоказателей, которые могут быть маркерами развития таких нежелательных процессов, как утомление, истощение, перенапряжение и перетренированность [10, 21]. Так, мониторинг у спортсменов уровня кортизола, пролактина, АКТГ, гормона роста, показало, что наиболее чувствительные показатели – АКТГ и пролактин [21]. В группе обследованных спортсменов проведено определение общепринятых биохимических и гематологических показателей, характерных для оценки состояния переутомления. Отмечается стабильность полученных результатов на всем протяжении тренировочного процесса, а не большие отклонения у ряда спортсменов в лейкцитарной формуле, повышение уровня креатинина и снижение содержания глюкозы были нормализованы на втором этапе наблюдения.

В последнее время все больше внимания уделяется изучению иммунной системы спортсмена и ее роли в адаптации к нагрузкам [4, 12, 17, 18]. Показано, что при нагрузках у спортсменов высшей квалификации изменяется уровень показателей Т- и В-клеточного звеньев иммунного ответа, что угнетение Т-клеточного иммунитета влечет за собой активацию В-системы гуморального иммунитета [16]. Одним из основных параметров гуморального звена иммунной системы являются (e-Ат), которые присутствуют в организме всех здоровых лиц, направленные к самым различным эндогенным молекулам. Совокупность e-Ат отражает и регулирует индивидуальный молекулярно-клеточный состав организма. При различных патологических состояниях количество e-Ат в кровотоке достоверно изменяется. Важно, что изменение уровня e-Ат к некоторым эндогенным молекулам возникает уже на доклинической стадии, что делает возможным предсказать заболевание до появления характерных симптомов.

Известно, что при снижении АП и переутомлении у спортсмена в первую очередь снижает-

ся тонус ЦНС, что проявляется нарушениями психо-эмоционального статуса. Наблюдается апатия, потеря мотивации, нарушается сон, появляются болевые синдромы различного генеза, расстройство пищеварения, половой функции. Эти состояния во многом регулируются медиаторами опиоидной системы, к которым относятся  $\beta$ -эндорфин и орфанин. Оба нейропептида являются эндогенным лигандом опиоидных рецепторов, участвует в устраниении отрицательных эмоций и боли. Исследователи предполагают, что благодаря выбросу  $\beta$ -эндорфин спортсмен со временем, при увеличении интенсивности упражнений, приобретает устойчивость к боли [14]. Эффект центрального действия опиоидов заключается также в том, что спортсмены неизвестно мотивированы, чтобы преодолеть боль, чтобы побить личный рекорд, выиграть медаль или доказать, что они показали себя наилучшим образом. У спортсменов орфанин играет важную роль в модуляции ноцицептивных сигналов, в частности при различных воспалениях сухожилий. Таким образом, от уровня продукции пептидов бета-эндорфина и орфанина зависит регуляция таких важных характеристик спортивной адаптации, как настроение, чувство удовлетворения и удовольствия, а также сбалансированная регуляция болевых ощущений.

Проведенное обследование спортсменов показало, что каждый спортсмен характеризуется особым, индивидуальным иммунопрофилем, т. е. индивидуальными сочетаниями уровней e-Ат к биомолекулам, включенным в регуляцию систем адаптации к нагрузке.

Так, в системе опиоидных пептидов уровень антител к  $\beta$ -эндорфину в целом находился в границах нормы, достоверно снижен у одной фигуристки. По мере наблюдения в динамике прослеживается тенденция к снижению иммунологического показателя для всей группы фигуристов. Оценка текущего психологического состояния выявила у некоторых спортсменов (№2 и №3 девушки и №1 юноши) симптомы повышения психической напряженности, у некоторых обнаружены даже симптомы утомления. Эти данные коррелируют с иммунохимическими показателями, резкого колебания содержания e-Ат к  $\beta$ -эндорфину. При анализе показателей содержания антител к орфанину обнаружено превышение нормы для большинства спортсменов. Полученные данные свидетельствуют об активации орфанинергической системы. Что может быть связано как с регуляцией антиноцицепции, т. е. ингибиторным контролем болевого сигнала, так и с участием в механизмах вознаграждения и

удовольствия, в частности, активацией «состояние благополучия» [11]. Оценка результатов наблюдения текущего психологического состояния показала, что обследованные спортсмены обладают более высокой болевой терпимостью по сравнению с обычно активными людьми.

## Заключение

Очевидно, что без утомления спортсмену невозможно достичь оптимальной функциональной готовности, обуславливающей достижение высокого спортивного результата. Однако нужно учитывать, что утомление может явиться причиной возникновения предпатологических состояний и патологических реакций организма, в частности, перенапряжения сердечно-сосудистой и других жизненно-важных систем. В связи с этим актуальны исследования, направленные на раскрытие механизмов срочной адаптации в условиях учебно-тренировочной работы спортсменов, а также поиск диагностических маркеров этого процесса. В результате проведенного исследования установлено, что иммунологические показатели, естественные антитела к опиоидным пептидам, изменяются в соответствии с ресурсным состоянием адаптации спортсмена. Эти показатели отражают с момента начала тренировок и на протяжении всего периода психоэмоциональ-

ный потенциал и порог переносимости боли для спортсменов. Поэтому важно с прогностической точки зрения проводить контроль содержания  $\epsilon$ -Ат к  $\beta$ -эндорфину и орфанину у спортсменов в процессе тренировки. Такой мониторинг индивидуального профиля иммунологических показателей спортсмена позволит подбирать более эффективную, персональную тренировочную программу.

## Благодарности

Авторы благодарят сотрудников ИЦ Олимпийского комитета России за помощь в подготовке работы со спортсменами.

### Этические нормы

Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены локальным биоэтическим комитетом «Института физиологически активных веществ РАН» (Черноголовка, Московская обл.).

### Информированное согласие

Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

## Список литературы / References

1. Бушуева Т.В., Макарова Г.А., Аришин А.В. Прогностическая значимость показателей функционального состояния центральной и автономной нервной системы в аспекте физиологической составляющей успешности соревновательной деятельности пловцов-спринтеров // Актуальные вопросы физической культуры и спорта, 2016. Т. 18. № 1. С. 129-137. [Bushueva T.V., Makarova G.A., Arishin A.V. Predictive value of central and autonomic nervous system functional state parameters as a physiological component of sprint swimmers' successful competitive activity. *Aktualnye voprosy fizicheskoy kultury i sporta = Topical Issues of Physical Culture and Sports*, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 129-137. (In Russ.)]
2. Иорданская Ф.А. Нарушения показателей «срочной» адаптации в процессе напряженной тренировочной работы высококвалифицированных спортсменов и средства квалифицированных спортсменов и средства их профилактики // Вестник спортивной науки, 2018. № 3. С. 35-40. [Iordanskaya F.A. Disturbances of “urgent” adaptation indicators in the process of stressed training work in elite athletes and means of their prevention. *Vestnik sportivnoy nauki = Sports Science Bulletin*, 2018, no. 3, pp. 35-40. (In Russ.)]
3. Кулиненко О.С., Лашин И.А. Биохимия в практике спорта. М.: Спорт, 2019. 184 с. [Kulinenko, O.S., Lashin I.A. Biochemistry in the practice of sports]. Moscow: Sport, 2019. 184 p.
4. Макарова Г.А., Локтев С.А., Порубайко Л.Н. Факторы риска возникновения синдрома перетренированности у спортсменов // Международный журнал экспериментального образования, 2014. № 4 (1). С. 170-172. [Makarova G.A., Loktev S.A., Porubayko L.N. Risk factors for the overtraining syndrome of athletes. *Mezhdunarodny zhurnal eksperimentalnogo obrazovaniya = International Journal of Experimental Education*, 2014 no. 4 (1), pp. 170-172. (In Russ.)]
5. Мягкова М.А., Морозова В.С. Естественных антитела и их физиологические функции // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2014. № 3. С. 75. [Myagkova M.A., Morozova V.S. Natural antibodies

and their physiologodal fanctions. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2014, no 3, p. 75. (In Russ.)]

6. Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Левашова А.И. Оценка адаптационных возможностей организма на основе анализа естественных антител к эндогенным биорегуляторам // *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, 2018. Т. 1, № 3, e00038. [Myagkova M.A., Petrochenko S.N., Levashova A.I., Assessment of the adaptation capacities of the body based on the determination of the natural antibodies to the endogenous bioregulators. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, 2018, Vol. 1, no. 3, e00038. doi: 10.18097/BMCRM00038].

7. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. Практическое руководство. М.: Медицина, 2007. 544 с. [Nazarenko G.I., Kishkun A.A. Clinical evaluation of laboratory test results. A practical guide]. Moscow: Meditsina, 2007. 544 p.

8. Никулин Б.А., Родионова И.И. Биохимический контроль в спорте. Научно-методическое пособие. М.: Советский спорт, 2011. 229 с. [Nikulin B.A., Rodionova I.I. Biochemical control in sports. Scientific and methodological manual]. Moscow: Sovetskiy sport, 2011. 229 p.

9. Петроченко С.Н., Боброва З.В., Мягкова М.А., Спасский А.А., Ледовской С.М., Ильина А.К., Михайлов А.А. Определение антител к эндогенным биорегуляторам для оценки функционального состояния здоровья спортсменов // Клиническая лабораторная диагностика, 2017. Т. 62, № 2. С. 346. [Petrochenko S.N., Bobrova Z.V., Myagkova M.A., Spasskiy A.A., Ledovskiy S.M., Iljina A.K. The detection of antibodies to endogenous bio-regulators for evaluating functional condition of health of sportsmen. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, Vol. 62, no. 2, p. 346. (In Russ.)]

10. Рахманов Р.С., Разгулин С.А., Блинова Т.В., Колесов С.А., Страхова Л.А., Берзин И.А., Хайров Р.Ш. Оценка функциональной надежности спортсменов по показателям обменных процессов организма // Вестник спортивной науки, 2018. № 1. С. 44-48. [Rakhmanov R.S., Razgulin S.A., Blinova T.V., Kolesov S.A., Strakhova L.A., Berzin I.A., Khayrov R.Sh. Evaluation of functional reliability of sportsmen according to indices of metabolic processes in human organism. *Vestnik sportivnoy nauki = Sports Science Bulletin*, 2018, no. 1, pp. 44-48. (In Russ.)]

11. Решетняк В.К., Кукушкин М.Л. Центральные и периферические механизмы физиологической и патологической боли // Клиническая патофизиология, 2015. № 1. С. 1-17. [Reshetnyak V.K., Kukushkin M.L. Central and peripheral mechanisms of physiological and pathological pain. *Klinicheskaya patofiziologiya = Clinical Pathophysiology*, 2015, no. 1, pp. 1-17. (In Russ.)]

12. Рыбина И.Л., Нехвядович А.И., Ширковец Е.А. Неспецифические адаптационные реакции в системе оценки биоэнергетических возможностей организма пловцов высокой квалификации // Вестник спортивной науки, 2015. № 1. С. 33-37. [Rybina I.L., Nekhvyadovich A.I., Shirkovets E.A. Nonspecific adaptive reactions in the system of assessing the bioenergetic capabilities of the organism of highly qualified swimmers. *Vestnik sportivnoy nauki = Bulletin of Sports Science*, 2015. No. 1, pp. 33-37. (In Russ.)]

13. Спасский А.А., Мягкова М.А., Левашова А.И., Кукушкин С.К., Куршев В.В., Янова Ю.В. Методология комплексной оценки адаптационного потенциала спортсмена к нагрузке // Спортивная медицина: наука и практика, 2019. № 3. С. 49-61. [Spassky A.A., Myagkova M.A., Levashova A.I., Kukushkin S.K., Kurshev V.V., Yanova Yu.V. Methodology of comprehensive assessment of the athlete's adaptive potential to the load. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika = Sports Medicine: Science and Practice*, 2019, no. 3, pp. 49-61. (In Russ.)]

14. Attal N., Bouhassira D., Baron R.. Diagnosis and assessment of neuropathic pain through questionnaires. *Lancet Neurol.*, 2018, Vol. 17, no. 5, pp. 456-466.

15. Decroix L., Piacentini M.F., Rietjens G., Meeusen R. Monitoring physical and cognitive overload during a training camp in professional female cyclists. *Int. J. Sports Physiol. Perform.* 2016, Vol. 11, no. 7, pp. 933-999.

16. Isaev A.P., Erlikh V.V., Zalyapin V.I., Bakhareva A.S., A.V. Nenasheva A.V., Romanov Yu.N., Sashenkov S.L., Shevtsov A.V., Maleev D.O., Korableva Yu.B. The immune system of athletes of different sports. *Pedagogics, Psychology, Medical-Biological Problems of Physical Training and Sports*. 2018, Vol. 22, no. 6, pp. 280-286.

17. Katharina B., Körber N., Hoffmann D., Wolfarth B. Training load, immune status, and clinical outcomes in young athletes: a controlled, prospective, longitudinal study. *Front. Physiol.*, 2018, Vol. 9, 120. doi: 10.3389/fphys.2018.00120.

18. Lee E.C., Fragala M.S., Kavouras S.A., Queen R.M., Pryor J.L., Casa D.J. Biomarkers in sports and exercise: tracking health, performance, and recovery in athletes. *J. Strength Cond. Res.*, 2017, Vol. 31, no. 10, pp. 2920-2937.

19. Martínez-Silván D., Díaz-Ocejo J., Murray A. Predictive Indicators of overuse injuries in adolescent endurance athletes. *Int. J. Sports Physiol. Perform.*, 2017, Vol. 12 (Suppl. 2), pp. S2153-S2156.

20. Nieman D.C., Groen A.J., Pugachev A., Vacca G. Detection of functional overreaching in endurance athletes using proteomics. *Proteomes*. 2018, Vol. 6, no. 3, 33. doi: 10.3390/proteomes6030033.
21. Timmermans N., Buyse L., Decroix L., Barbé K., Verrelst R., Meeusen R. Improving the diagnosis of nonfunctional overreaching and overtraining. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 2019, Vol. 51, no. 12, pp. 2524-2530.
22. Toll L., Bruchas M.R., Calo' G., Cox B.M., Zaveri N.T. Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems. *Pharmacol. Rev.*, 2016, Vol. 68, no. 2, pp. 419-436.

---

**Авторы:**

**Мягкова М.А.** – д.б.н., профессор, заведующая лабораторией иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

**Петроченко С.Н.** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

**Боброва З.В.** – младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

**Орлова Е.А.** – научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

**Крылов А.С.** – инженер-исследователь лаборатории иммунохимии ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

**Мосейкин И.А.** – к.м.н., врач-невролог, Российская медицинская академия последипломного образования, Москва, Россия

**Authors:**

**Myagkova M.A.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

**Petrochenko S.N.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

**Bobrova Z.V.**, Junior Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

**Orlova E.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

**Krylov A.S.**, Research Engineer, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

**Moseykin I.A.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Neurologist, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation

# ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК НА АКТИВНОСТЬ МЫШИНЫХ СПЛЕНОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Цыпленкова Е.С., Вязовая Е.А., Даниленко Е.Д.

Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Новосибирская обл., Россия

**Резюме.** Рибонуклеиновые кислоты (РНК), в частности двуспиральные РНК, благодаря их способности модулировать врожденные иммунные реакции представляют несомненный интерес с точки зрения их использования в качестве вакцинных адьювантов. Однако несмотря на то, что препараты дсРНК известны довольно давно, вопросы клеточных взаимодействий и направленности развития иммунных реакций в условиях их воздействия изучены пока недостаточно. Целью настоящего исследования являлась оценка реакции спленоцитов мышей на воздействие дсРНК в культуре клеток и после введения препарата *in vivo*. Исследования проведены на самках мышей линии Balb/c. Статус активации различных популяций клеток селезенки после воздействия препаратов дрожжевой дсРНК и препарата сравнения PolyI:PolyC оценивали методами проточной цитометрии по экспрессии активационных маркеров CD69 и CD86 на В-лимфоцитах CD19<sup>+</sup> и дендритных клетках (ДК) CD11c<sup>+</sup>. В исследованиях *in vitro* спленоциты инкубировали в среде ДМЕМ, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, в течение 22 ч после внесения субстанции дрожжевой дсРНК или PolyI:PolyC в количестве 2,5 мкг/мл. В качестве дополнительного контроля использовали препарат одноцепочечной высокополимерной РНК (впРНК), входящий в состав субстанции, в количестве 16 мкг/мл. В ходе исследования продемонстрировано активирующее влияние дсРНК и PolyI:PolyC на экспрессию маркеров CD86 и CD69 на клетках всего пула спленоцитов, В-лимфоцитах и ДК. Высокополимерная РНК повышала общее количество CD86<sup>+</sup> клеток в популяции без изменения уровня экспрессии маркеров на В-лимфоцитах и ДК. В исследованиях *in vivo* препарат дрожжевой дсРНК (субстанция) вводили внутривенно мышам в дозе 2,5 мг/кг, впРНК – 16 мг/кг. Количество CD69<sup>+</sup> и CD86<sup>+</sup> спленоцитов оценивали через 4 часа после введения препаратов. Наибольший стимулирующий эффект дсРНК был зарегистрирован в отношении экспрессии CD69: отмечен значительный рост числа CD69<sup>+</sup> клеток среди В-лимфоцитов и в общем клеточном регионе. Менее выраженной, но статистически значимой была стимуляция экспрессии корецептора CD86 на В-лимфоцитах. Отмечена способность одноцепочечных и двуспиральных РНК достоверно повышать количество CD86<sup>+</sup> клеток в популяции дендрит-

#### Адрес для переписки:

Цыпленкова Елена Сергеевна  
Институт медицинской биотехнологии ФБУН  
«Государственный научный центр вирусологии  
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора  
633010, Россия, Новосибирская обл., г. Бердск,  
ул. Химзаводская, 9.  
Тел.: 8 (383) 363-80-24 (доп. 53-16).  
Факс: 8 (383) 363-80-16.  
E-mail: tsyplenkovaes@gmail.com

#### Address for correspondence:

Elena S. Tsyplenkova  
Institute of Medical Biotechnology, State Research Center  
of Virology and Biotechnology “Vector”  
9 Khimzavodskaya St  
Berdsk, Novosibirsk Region  
633010 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 363-80-24 (acc. 53-16).  
Fax: +7 (383) 363-80-16.  
E-mail: tsyplenkovaes@gmail.com

#### Образец цитирования:

Е.С. Цыпленкова, Е.А. Вязовая, Е.Д. Даниленко  
«Изучение влияния двуспиральных РНК на активность мышевых спленоцитов методом проточной цитометрии» // Медицинская иммунология, 2023.  
Т. 25, № 2. С. 387-394.  
doi: 10.15789/1563-0625-STE-2572

© Цыпленкова Е.С. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

#### For citation:

E.S. Tsyplenkova, E.A. Vyazovaya, E.D. Danilenko  
“Studying the effect of double-stranded RNA upon activity  
of mouse splenocytes using flow cytometry”, Medical  
Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya, 2023,  
Vol. 25, no. 2, pp. 387-394.  
doi: 10.15789/1563-0625-STE-2572

© Tsyplenkova E.S. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-STE-2572

ных клеток. Результаты исследования позволили оценить влияние дсРНК на функцию иммунных клеток в некоторых процессах их взаимодействия, созревания и миграции. Этот подход может быть полезен при разработке оптимальных стратегий отбора и исследовательского скрининга новых адъювантов нуклеиновой природы.

*Ключевые слова: дсРНК, PolyI:PolyC, селезенка, В-лимфоциты, антиген-презентирующие клетки, дендритные клетки, мыши*

## STUDYING THE EFFECT OF DOUBLE-STRANDED RNA UPON ACTIVITY OF MOUSE SPLENOCYTES USING FLOW CYTOMETRY

**Tsyplenkova E.S., Vyazovaya E.A., Danilenko E.D.**

*Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation*

**Abstract.** Ribonucleic acids (RNA), in particular, double-stranded RNAs, due to their ability to modulate innate immune responses, are of undoubted interest in view of their usage as vaccine adjuvants. However, despite the fact that dsRNA preparations have been known for a long time, the issues of cellular interactions and orientation of immune response upon their exposure have not yet been properly studied. The aim of this work was to evaluate the *in vitro* response of mouse splenocytes to dsRNA exposure in cell cultures, and after drug administration *in vivo*. The studies were carried out in female Balb/c mice. Activation status of various splenocyte populations after treatment with yeast dsRNA and reference substance (PolyI:PolyC) was assessed by means of flow cytometry by expression of CD69 and CD86 activation markers on CD19<sup>+</sup>B lymphocytes and CD11c<sup>+</sup> dendritic cells (DC). During *in vitro* studies, the splenocytes were incubated in DMEM medium containing 10% fetal calf serum for 22 hours following addition of the yeast dsRNA preparations, or PolyI:PolyC (2.5 µg/mL) preparation. Single-stranded high-polymer RNA (hpRNA), which is a component of the substance, was used as an additional control at the dose of 16 µg/mL. Our study has shown that the activating effect of dsRNA and PolyI:PolyC on expression of CD86 and CD69 markers upon the cells of the entire pool of splenocytes, B lymphocytes and DC. Highly polymeric RNA increased the total number of CD86<sup>+</sup> cells in the population without changing the expression level of these markers upon B lymphocytes and DCs. When performing the *in vivo* studies, yeast dsRNA substance was administered intravenously into mice at a dose of 2.5 mg/kg, and hpRNA was used at a dose of 16 mg/kg. The number of CD69<sup>+</sup> and CD86<sup>+</sup> splenocytes was assessed 4 hours after drug administration. The highest stimulating effect of dsRNA was registered with CD69 expression marker: significantly increased numbers of CD69<sup>+</sup> cells were registered for B lymphocytes and the entire cell population. The stimulation of CD86 co-receptor expression on B lymphocytes was less pronounced, but statistically significant. The ability of single-stranded and double-stranded RNAs to cause significant increase in CD86<sup>+</sup> cell numbers was demonstrated among dendritic cell population. The results of the study made it possible to evaluate the effect of dsRNA on the immune cell function, with respect of their interaction, maturation, and migration. This approach may be useful for developing optimal strategies for selection and screening of new nucleic acid-based adjuvants.

*Keywords: dsRNA, PolyI:PolyC, spleen, B lymphocytes, antigen-presenting cells, dendritic cells, mice*

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания, тема Г3-38/21.

### Введение

Важным моментом фармацевтической разработки новых лечебно-профилактических средств борьбы с инфекциями является понимание молекулярных и клеточных механизмов иммунных

процессов, разворачивающихся после их применения. Несмотря на то, что первичный контакт с патогеном в ходе инфицирования происходит в «воротах инфекции» и барьерных тканях, традиционно в качестве модели при изучении иммунных реакций используются клетки селезенки. Это связано с тем, что данный орган является важным сайтом кроветворения, где присутствуют все виды иммунокомпетентных клеток, тесно

взаимодействующие как друг с другом, так и с поступающими через кровоток патогенами [2].

Как известно, двусpirальные РНК (дсРНК) благодаря своей структуре, близкой к структуре вирусного агента, способны связываться с клеточными Толл-лайк рецепторами (Toll-like receptors, TLR), запускать сигнальные пути, регулирующие синтез интерферонов, интерлейкинов и ряда других цитокинов [2], индуцировать и модулировать врожденные и адаптивные клеточные иммунные реакции [6, 9]. Препараты на основе синтетической дсРНК PolyI:PolyC проходят клинические и экспериментальные исследования в качестве средств лечения сезонного гриппа, адьювантов вакцин [7]. Однако несмотря на то, что препараты дсРНК известны довольно давно, вопросы клеточных взаимодействий и направленности развития иммунных реакций в условиях их воздействия изучены еще недостаточно [14].

**Целью данного исследования** являлась оценка реакции спленоцитов (В-лимфоциты, дендритные клетки) мыши на введение препарата двусpirальных РНК *in vitro* и *in vivo*.

## Материалы и методы

Исследования проведены на 55 самках мышей линии Balb/c возрастом 8-12 недель с массой тела 18-22 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирской обл. В ходе экспериментов животные содержались при естественном освещении на стандартном рационе питания со свободным доступом к воде.

В экспериментах использовали субстанцию натриевой соли дсРНК (далее дсРНК), выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (ООО «Диафарм», г. Бердск Новосибирской области), с содержанием нуклеотидного материала 95,2%, из которого 13,6% – дсРНК, 86,4% – одноцепочечные высокополимерные РНК (впРНК). В качестве препарата сравнения использовали синтетический комплекс PolyI:PolyC (Sigma-Aldrich, США) и препарат впРНК (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск Новосибирской области).

В экспериментах *in vitro* суммарный пул спленоцитов получали путем измельчения селезенки интактных мышей ножницами в среде ДМЕМ, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (Fetal calf serum, FCS), 0,004% гентамицина, и фильтрации клеточной супензии через сито с размером пор 70 мкм (BD Falcon, США). Клетки обрабатывали раствором, лизирующим эритроциты (150 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 2 мМ HEPES, 1 мМ ЭДТА, pH 7,4), в течение 8 мин при комнатной температуре с последующей отмыккой средой ДМЕМ с 10% FCS и гентамицином. После подсчета в ка-

мере Горяева клетки разносили по лункам 24-луночного планшета в количестве  $1,5 \times 10^6$  спленоцитов в лунку в объеме 1,5 мл и инкубировали в течение 22 ч при 37 °C в среде ДМЕМ с 10% FCS и гентамицином (контроль). В опытные лунки добавляли субстанцию натриевой соли дсРНК в дозе 2,5 мкг на 1 мл среды в лунке. В качестве дополнительного контроля использовали препарат впРНК (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск Новосибирской области) в дозе, соответствующей содержанию впРНК в субстанции дсРНК (16 мкг на 1 мл среды в лунке), или раствор PolyI:PolyC в дозе, эквивалентной дозе дсРНК, в качестве положительного контроля.

В исследовании *in vivo* дрожжевую дсРНК вводили мышам внутривенно в дозе 2,5 мг/кг, впРНК в дозе 16 мг/кг в объеме 0,5 мл на 20 г массы тела. Контрольные животные получали инъекцию физиологического раствора в том же объеме. Эксперименты проводили в трех повторах, группы состояли из 4-5 животных. Получение клеточной супензии и культивирование клеток проводили способом, описанным выше, без внесения в культуральную среду препаратов.

Субпопуляционный состав и функциональную активность клеток селезенки определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител производства фирмы eBioscience (США). Клетки снимали с планшета пипетированием и концентрировали до  $1,5 \times 10^6/0,075$  мл центрифугированием при 250 g. Перед окрашиванием клетки инкубировали с анти-CD32/CD16 (клон 2.4G2) мыши в течение 15 минут при 4 °C для блокирования неспецифического связывания через Fc-рецепторы. Для окрашивания антителами из лунок отбирали по  $1 \times 10^6$  клеток в 50 мкл среды ДМЕМ с 2% FCS. Для иммунофенотипирования в экспериментах использовали традиционные маркеры: CD19 (APC), B220 (PC7), CD11c (APC), CD86 (APC, PE), CD69 (APC). Клетки отмывали 500 мкл среды с последующим центрифугированием и далее ресуспендировали в 350 мкл раствора Хенкса для анализа на цитофлуориметре.

Для идентификации погибших клеток в пробирки добавляли 5 мкл 7AAD (BioLegend, США) на  $1 \times 10^6$  клеток за 5-10 минут до анализа.

Цитометрический анализ проводили на приборе CytoFlex (Beckman Coulter, США) с использованием программного обеспечения CytExpert 2.4. Для каждого образца было записано 10 000-20 000 событий. Выбор региона исследования осуществляли с использованием параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Устранение сигналов от агрегатов клеток и их обломков выполняли на графике площади пика

флуоресценции (FSC-A) в зависимости от высоты пика флуоресценции (FSC-H).

Статистический анализ проводили с помощью пакета статистических программ Statgraphics, Vers. 5.0 (Statistical Graphic Corp., США). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me), 1-го ( $Q_{0,25}$ ) и 3-го ( $Q_{0,75}$ ) квартилей. Для оценки значимости межгрупповых различий использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез ( $p$ ) принимали равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

При анализе спленоцитов на графиках прямого и бокового светорассеяния отмечено, что клетки после инкубации и всех этапов пробоподготовки формируют дополнительный регион Р2

(рис. 1Б), в отличие от свежевыделенных клеток (рис. 1А).

Окрашивание с помощью 7AAD показало, что в регионе Р2 преобладают погибшие клетки (90% и более). Это позволяет предположить, что некоторые клеточные субпопуляции в экспериментах *in vitro* могут быть представлены в меньших количествах, чем *in vivo* (рис. 1В). Для дальнейшего анализа во всех экспериментах использовали регион Р1.

Оценка жизнеспособности спленоцитов после 22 часов инкубации с дсРНК показала, что препарат не оказывал влияния на количество погибших клеток в регионе Р1. Доля 7AAD-положительных клеток в опытной группе составила 0,9 (0,9-1,1) %, в контроле – 0,6 (0,6-1,6) %. PolyI:PolyC также не оказывал токсического действия на спленоциты: доля погибших клеток в

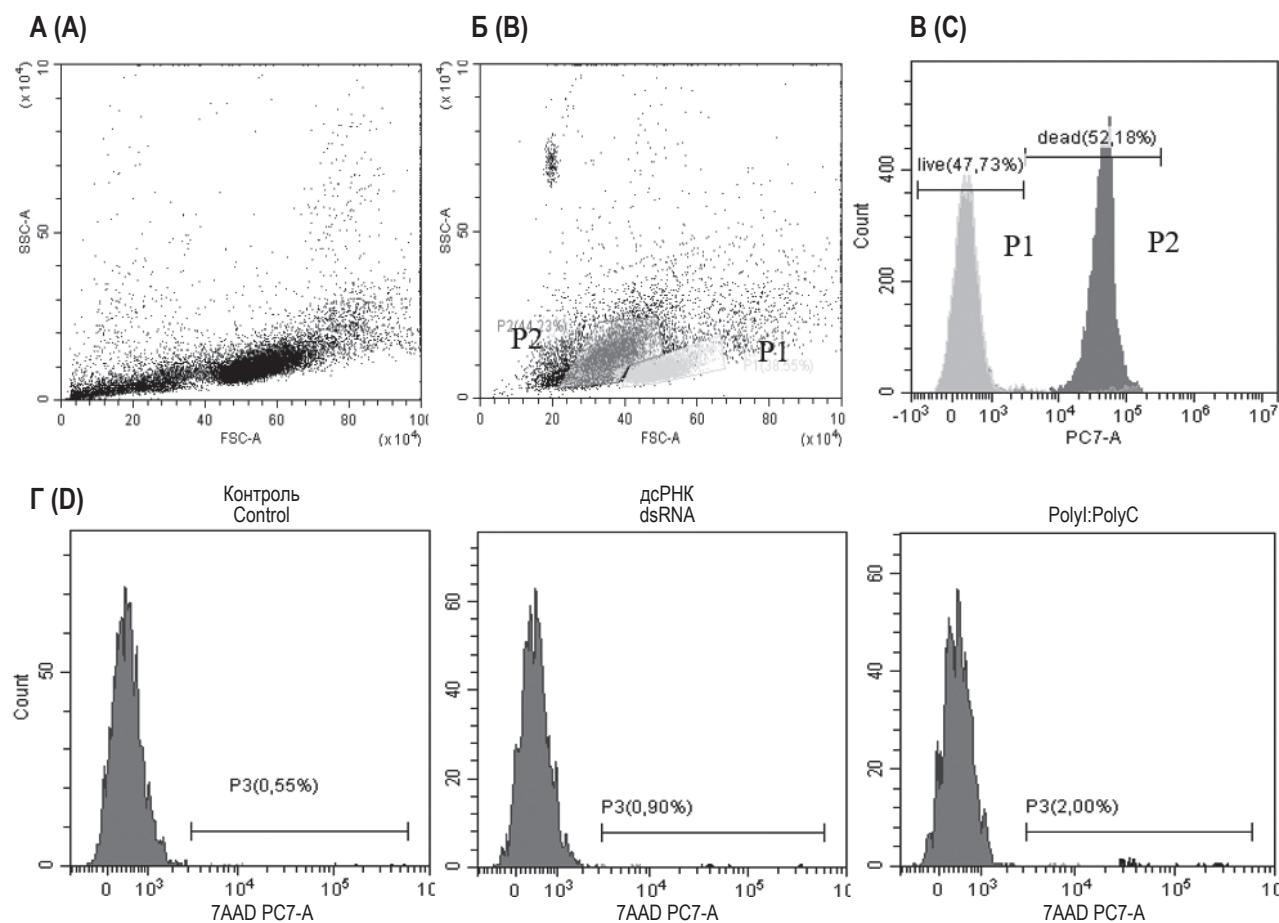


Рисунок 1. Характеристика спленоцитов по морфологическим параметрам и жизнеспособности

Примечание. А – график распределения спленоцитов по параметрам FSC и SSC сразу после выделения. Б – график распределения спленоцитов по параметрам FSC и SSC после 22 часов инкубации. В – гистограмма распределения 7AAD<sup>+</sup> в регионах Р1 и Р2 после 22 часов инкубации. Г – гистограмма распределения 7AAD<sup>+</sup> в регионе Р1 после 22 часов инкубации.

Figure 1. Characteristics of splenocytes by morphological parameters and viability

Note. (A) Graph of splenocyte distribution according to FSC and SSC parameters immediately after isolation. (B) Graph of splenocyte distribution by FSC and SSC parameters after 22 hours of incubation. (C) Histogram of 7AAD<sup>+</sup> distribution in P1 and P2 regions after 22 hours of incubation. (D) Histogram of 7AAD<sup>+</sup> distribution in P1 region after 22 hours of incubation.

этих лунках, в среднем, составляла 2,0 (2,0-3,3) % (рис. 1Г).

В процессе иммунофенотипирования спленоцитов после инкубации в среде ДМЕМ с 10% FCS установлено, что относительное содержание В-лимфоцитов ( $CD19^+$ ) в исследуемом регионе составляло  $16,3 \pm 2,8\%$ . Субпопуляционный состав В-клеток был достаточно однороден, около 95% из них несли на клеточной поверхности маркер  $B220^+$ . Определение относительного содержания общих маркеров активации лимфоцитов показало более низкие уровни экспрессии на спленоцитах маркера  $CD69$  относительно  $CD86$ . Доля дендритных клеток ( $CD11c^+$ ) составляла  $0,9 \pm 0,2\%$ .

Инкубация спленоцитов с препаратами дсРНК приводила к значительному увеличению количества клеток, несущих фенотип  $CD19^+CD86^+$ , в общем исследуемом регионе (рис. 2А).

Формирование пула клеток, несущих маркер активации  $CD86$ , внутри популяции В-лимфоцитов приводило к статистически значимому повышению данного показателя по сравнению с группой контроля (рис. 2Б).

Как известно,  $CD86$  является лигандом белков клеточной мембраны Т-лимфоцитов. Экспрессия  $CD86$  на В-лимфоцитах ведет к их взаимной стимуляции с Т-лимфоцитами и последующей специфической дифференцировке. Индукция  $CD86$  на поверхности В-клеток под действием дсРНК свидетельствует о ее способности оказывать регуляторное влияние на процессы клеточных взаимодействий.

Сравнительная оценка влияния на экспрессию корецептора  $CD86$  разных типов дсРНК показала, что синтетический комплекс PolyI:PolyC оказывал сходное действие на В-лимфоциты (рис. 2В). Следовательно, можно предположить, что несмотря на различия в источнике и спосо-

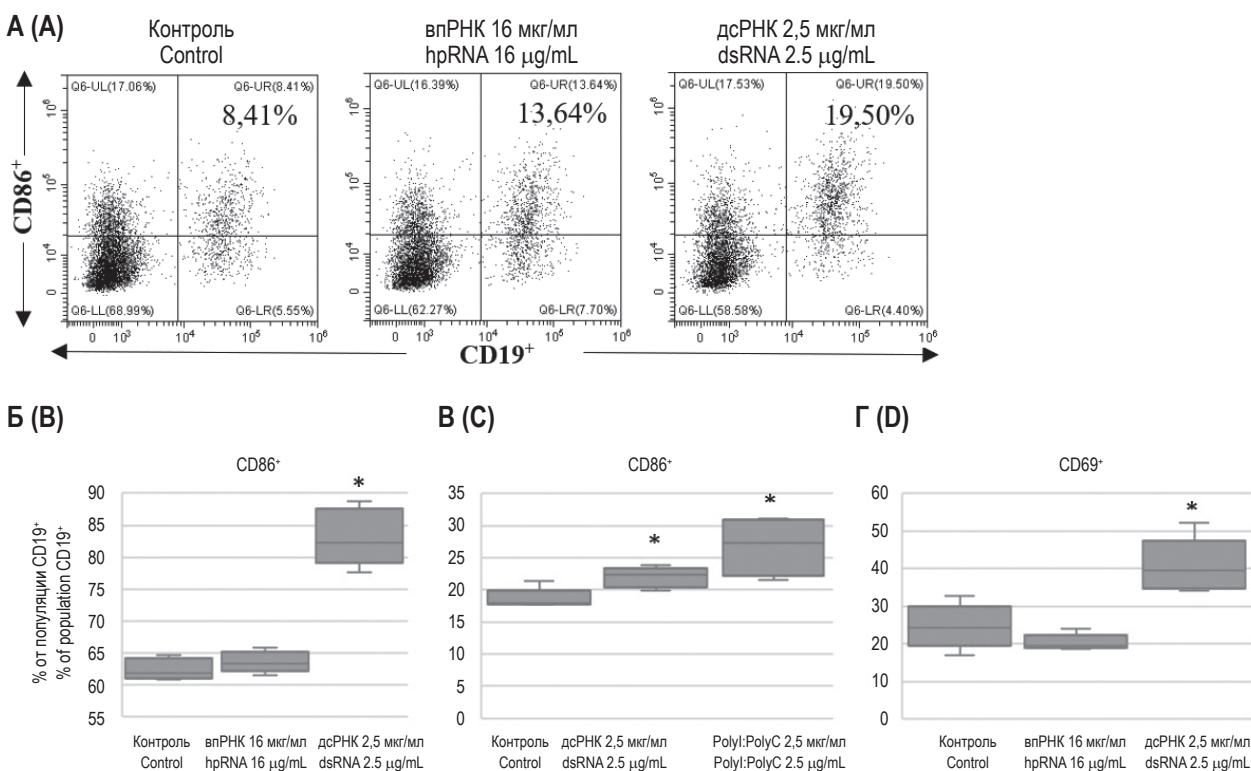


Рисунок 2. Относительное количество маркеров активации на поверхности клеток селезенки мышей Balb/c после 22 часов инкубации с препаратами РНК

Примечание. А – распределение  $CD19^+$  и  $CD86^+$  на клетках исследуемого региона. Б – процент  $CD86^+$  в гейте  $CD19^+$  в первой серии экспериментов. В – процент  $CD86^+$  в гейте  $CD19^+$  во второй серии экспериментов. Г – процент  $CD69^+$  в гейте  $CD19^+$  гейте. \* – статистически значимое отличие относительно контрольной группы, непараметрический критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ .

Figure 2. Relative number of activation markers on the surface of the spleen cells of Balb/c mice after 22 hours of incubation with RNA preparations

Note. (A) Distribution of  $CD19^+$  and  $CD86^+$  on the cells of the studied region. (B) Percentage of  $CD86^+$  in  $CD19^+$  gate in the first series of experiments. (C) Percentage of  $CD86^+$  in  $CD19^+$  gate in the second series of experiments. (D) Percentage of  $CD69^+$  in  $CD19^+$  gate. \*, statistically significant difference relative to the control group, nonparametric Mann–Whitney criterion,  $p < 0.05$ .

бе получения, молекулы дсРНК разной природы воздействуют на одни и те же клеточные механизмы активации иммунных клеток. Поскольку двусpirальные РНК играют роль регуляторов врожденного иммунитета [5, 15], в то время как

CD86 является элементом адаптивных иммунных реакций, полученные данные могут свидетельствовать о комбинаторном эффекте дсРНК на функцию В-клеток. Аналогичные закономерности, отражающие связь между эффектами

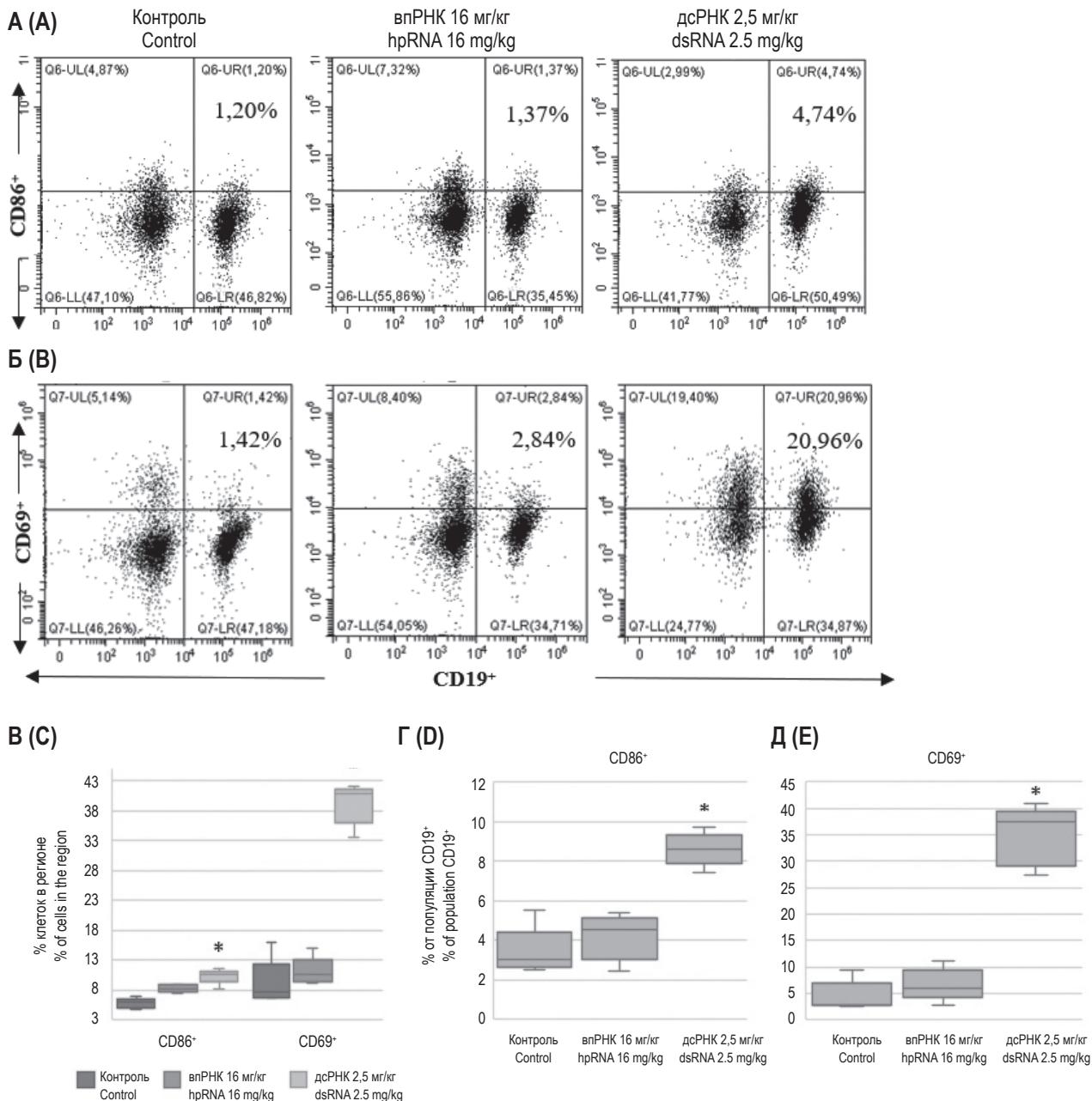


Рисунок 3. Относительное количество маркеров активации на поверхности клеток селезенки мышей Balb/c через 4 часа после внутривенного введения препаратов РНК

Примечание. А – распределение CD19<sup>+</sup> и CD86<sup>+</sup> на клетках исследуемого региона. Б – распределение CD19<sup>+</sup> и CD69<sup>+</sup> на клетках исследуемого региона. В – относительное количество CD86<sup>+</sup> и CD69<sup>+</sup> на поверхности клеток селезенки. Г – процент CD86<sup>+</sup> в гейте CD19<sup>+</sup>. Д – процент CD69<sup>+</sup> в гейте CD19<sup>+</sup>. \* – статистически значимое отличие относительно контрольной группы, непараметрический критерий Манна–Уитни,  $p < 0.05$ .

Figure 3. Relative number of activation markers on the surface of the spleen cells of Balb/c mice 4 hours after intravenous administration of RNA preparations

Note. (A) Distribution of CD19<sup>+</sup> and CD86<sup>+</sup> on the cells of the studied region. (B) Distribution of CD19<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup> on the cells of the studied region. (C) Relative amount of CD86<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup> on the surface of the spleen cells. (D) Percentage of CD86<sup>+</sup> in CD19<sup>+</sup> gate. (E) Percentage of CD69<sup>+</sup> in CD19<sup>+</sup> gate. \*, statistically significant difference relative to the control group, nonparametric Mann–Whitney criterion,  $p < 0.05$ .

врожденных и костимулирующих сигналов на В-клетки при заражении вирусным агентом, описаны авторами работы [10].

Одноцепочечная РНК, входящая в состав препарата, в отличие от дсРНК, стимулирующего влияния на поверхностную экспрессию данного активационного маркера на В-клетках не оказывала.

Оценка уровня экспрессии CD69 на спленоцитах показала выраженный рост количества CD69<sup>+</sup> клеток в популяции CD19<sup>+</sup> под воздействием дсРНК (рис. 2Г). Как известно, экспрессия CD69 повышается при активации лимфоцитов разных типов [13], что лежит в основе его широкого использования в качестве активационного маркера. В результате идентификации специфических лигандов данного маркера (Gal-1, S1P1) установлена способность CD69 модулировать дифференцировку Т-клеток [4] и регулировать их выход из лимфоидных органов [12]. Таким образом, можно предположить, что дсРНК, усиливая экспрессию CD69, способна влиять на процессы клеточного созревания и миграции.

Следует отметить, что внесение в культуральную среду дсРНК приводило к активации не только В-лимфоцитов, но и всего клеточного пулла селезенки (графические данные не приведены). Анализ процентного содержания CD86<sup>+</sup> и CD69<sup>+</sup> во всем клеточном регионе выявил статически значимое повышение данных маркеров в опытных группах. Относительное количество CD86<sup>+</sup> увеличилось с 25,3 (25,2-25,5) % в контроле до 35,2 (32,3-36,8) % в опыте (группа «дсРНК»), CD69<sup>+</sup> – с 7,5 (6,7-9,5) % до 15,2 (12,9-16,8) %, соответственно. В популяции дендритных клеток (ДК) (CD11c<sup>+</sup>) обнаружено достоверное увеличение доли CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> (в 1,3 раза, по сравнению с контролем), что свидетельствует о стимулирующем действии дсРНК и на это звено иммунитета.

Препарат впРНК, также как дсРНК, статически значимо повышал относительное количество CD86<sup>+</sup> клеток общего клеточного региона (до 27,1 (27,0-28,8) %), но при этом не оказывал влияния на активность ДК и экспрессию CD69.

Оценка экспрессии активационных маркеров на поверхности спленоцитов мышей после внутривенной инъекции дсРНК, как и в экспериментах *in vitro*, продемонстрировала усиление данного процесса (рис. 3А, Б).

Наибольший стимулирующий эффект был отмечен в отношении CD69: его общая экспрессия на спленоцитах повышалась в 4 раза, в популяции CD19<sup>+</sup> – в 8 раз (рис. 3В, Д). Несколько менее выраженным был эффект в отношении CD86, что, возможно, связано с тем, что временная точка являлась слишком ранней для тестирования развития стимулирующего сигнала (рис. 3В, Г). Несмотря на это, относительное количество CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> в популяции ДК статистически значимо возрастало после введения дсРНК с 14,0 (13,0-16,9) % до 29,5 (28,9-30,4) %. Повышение числа CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> ДК было отмечено и в случае введения впРНК (до 22,5 (19,4-26,0) %).

Как было показано авторами работы [12], внутривенное введение PolyI:PolyC способствует существенному увеличению экспрессии CD69 на клетках лимфоидных органов на фоне снижения его количества в кровотоке. Можно предположить, что подобный механизм позволяет локально увеличивать количество лимфоцитов в месте реакции, необходимое для развития иммунного ответа. Стоит отметить, что активность лимфоцитов в селезенке и лимфатических узлах способна повышаться под действием стромальных соединительнотканых клеточных элементов, которые продуцируют цитокины в ответ на TLR-опосредованную стимуляцию дсРНК [8].

## Заключение

Установлено, что препарат дсРНК, выделенный из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (субстанция), обладал способностью повышать экспрессию клеточных маркеров активации CD86 и CD69 на В-лимфоцитах и дендритных клетках селезенки как в культуре клеток, так и в экспериментах *in vivo*. Высокополимерная одноцепочечная РНК такими свойствами в отношении данных маркеров не обладала, хотя следует отметить ее вклад в рост количества CD86<sup>+</sup> спленоцитов *in vitro* и CD86<sup>+</sup> клеток в популяции ДК после внутривенного введения. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о способности двусpirальной РНК регулировать реакции не только врожденного, но и приобретенного иммунитета, что может быть важно с точки зрения перспектив использования препаратов данного класса в качестве вакцинных адьювантов.

## Список литературы / References

1. Батенева А.В., Гамалей С.Г., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д. Стимулирующее влияние дрожжевой двуспиральной РНК на активность генов белков системы интерферона // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 6. С. 1155-1162. [Bateneva A.V., Gamaley S.G., Lebedev L.R., Danilenko E.D. Activation of interferon system gen transcription by yeast double-stranded RNA. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 6, pp.1155-1162. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-SEO-2082.

2. Antoniak S., Tatsumi K., Bode M., Vanja S., Williams J.C., Mackman N. Protease-activated receptor 1 enhances Poly I:C induction of the antiviral response in macrophages and mice. *J. Innate Immun.*, 2017, Vol. 9, no. 2, pp. 181-192.
3. Barr T.A., Brown S., Ryan G., Zhao J., Gray D. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, no. 11, pp. 3040-3053.
4. de la Fuente H., Cruz-Adalia A., del Hoyo G.M., Cibrián-Vera D., Bonay P., Pérez-Hernández D., Vázquez J., Navarro P., Gutierrez-Gallego R., Ramirez-Huesca M., Martín P., Sánchez-Madrid F. The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. *Mol. Cell Biol.*, 2014, Vol. 34, no. 13, pp. 2479-2487.
5. Gantier M., Williams B. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2007, Vol. 18, no. 5-6, pp. 363-371.
6. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, Vol. 34, no. 5, pp. 637-650.
7. Matsumoto M., Tatematsu M., Nishikawa F., Azuma M., Ishii N., Morii-Sakai A., Shime H., Seya T. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production *in vivo*. *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, no. 6280. doi: 10.1038/ncomms7280.
8. Nelson J., Sorensen E.W., Mintri S., Rabideau A.E., Zheng W., Besin G., Khatwani N., Su S.V., Miracco E.J., Issa W.J., Hoge S., Stanton M.G., Joyal J.L. Impact of mRNA chemistry and manufacturing process on innate immune activation. *Sci. Adv.*, 2020, Vol. 6, no. 26, pp. 4-22.
9. Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*, 2008, Vol. 89, no. 1, pp. 1-47.
10. Rau F.C., Dieter J., Zhang L., Priest S.O., Baumgarth N., B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 12, pp. 7661-7671.
11. Sabbatini P., Tsuji T., Ferran L., Ritter E., Sedrak C., Tuballes K., Jungbluth A.A., Ritter G., Aghajanian C., Bell-McGuinn K., Hensley M.L., Konner J., Tew W., Spriggs D.R., Hoffman E.W., Venhaus R., Pan L., Salazar A.M., Diefenbach C.M., Old L.J., Gnajatic S. Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 2012, Vol. 18, no. 23, pp. 6497-6508.
12. Shiow L.R., Rosen D.B., Brdicková N., Xu Y., An J., Lanier L.L., Cyster J.G., Matloubian M. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*, 2006, Vol. 440, no. 7083, pp. 540-544.
13. Teodorovic L.S., Riccardi C., Torres R.M., Pelanda R. Murine B cell development and antibody responses to model antigens are not impaired in the absence of the TNF receptor GITR. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 2e31632. doi: 10.1371/journal.pone.0031632.
14. Uehata T., Takeuchi O. RNA recognition and immunity-innate immune sensing and its posttranscriptional regulation mechanisms. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 7, 1701. doi: 10.3390/cells9071701.
15. Yoneyama M., Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev. Med. Virol.*, 2010, Vol. 20, no. 1, pp. 4-22.

**Авторы:**

**Цыпленкова Е.С.** – младший научный сотрудник отдела биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Новосибирская обл., Россия

**Вязовая Е.А.** – к.б.н., старший научный сотрудник отдела биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Новосибирская обл., Россия

**Даниленко Е.Д.** – к.б.н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Новосибирская обл., Россия

**Authors:**

**Tsyplenkova E.S.**, Junior Research Associate, Department of Biological Studies, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Vyazovaya E.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Biological Studies, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Danilenko E.D.**, PhD (Biology), Director, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Novosibirsk Region, Russian Federation

# ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА

Сысоева Г.М., Гамалей С.Г., Есина Т.И., Даниленко Е.Д.

Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Россия

**Резюме.** Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) представляет собой миелопоэтический фактор роста, который оказывает плейотропное действие не только на дифференцировку незрелых клеток-предшественников в полиморфноядерные нейтрофилы, моноциты/макрофаги и дендритные клетки, но и контролирует функционирование дифференцированных клеток. В настоящее время GM-CSF исследуется в клинических испытаниях в качестве иммуномодулятора и адьюванта. Однако широкий спектр биологической активности и нередко парадоксальные эффекты данного цитокина требуют более тщательного изучения механизмов его действия с целью прогнозирования его эффективности в разных условиях иммунотерапии. В данной работе исследовано влияние рекомбинантного GM-CSF человека на метаболическую активность клеток перитонеального экссудата мышей в первичной культуре клеток. Метаболическую (окислительно-восстановительную) активность клеток оценивали по способности восстанавливать нитросиний тетразолиевый (НСТ) в процессе MF- и Fc-зависимого фагоцитоза, вызванного внесением в среду опсонизированного зимозана либо эритроцитов барана. Продемонстрировано дозозависимое стимулирующее действие препарата GM-CSF на окислительный обмен фагоцитирующих перитонеальных макрофагов и нейтрофилов. Показано, что при 2- и 24-часовом культивировании пептон-элиситированных клеток с GM-CSF в широком диапазоне концентраций (от 5 до 40 000 нг/мл) более выраженный эффект препарата наблюдался в отношении нейтрофилов. Препарат GM-CSF вызывал достоверное увеличение (на 13-17%) окислительно-восстановительной активности нейтрофилов, индуцированной опсонизированным зимозаном, которое сохранялось в диапазоне низких доз и через 24 часа. Стимулирующий эффект GM-CSF на макрофаги (увеличение показателя НСТ на 16%) был отмечен только при

#### Адрес для переписки:

Сысоева Галина Михайловна  
Институт медицинской биотехнологии ФБУН  
«Государственный научный центр вирусологии и  
биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора  
633010, Россия, г. Бердск, ул. Химзаводская, 9.  
Тел.: 8 (383) 363-80-24 (доп. 53-35).  
Факс: 8 (383) 363-80-16.  
E-mail: sysoeva\_gm@vector.nsc.ru

#### Address for correspondence:

Galina M. Sysoeva  
Institute of Medical Biotechnology, State Research Center  
of Virology and Biotechnology "Vector"  
9 Khimzavodskaya St  
Berdsk  
633010 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 363-80-24 (acc. 53-35).  
Fax: +7 (383) 363-80-16.  
E-mail: sysoeva\_gm@vector.nsc.ru

#### Образец цитирования:

Г.М. Сысоева, С.Г. Гамалей, Т.И. Есина,  
Е.Д. Даниленко «Исследование иммуномодулирующих  
свойств рекомбинантного гранулоцитарно-  
макрофагального колониестимулирующего фактора  
человека» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25,  
№ 2. С. 395-402. doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2550

© Сысоева Г.М. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии

Creative Commons Attribution 4.0

#### For citation:

G.M. Sysoeva, S.G. Gamalei, T.I. Esina, E.D. Danilenko  
“Immunomodulatory properties of recombinant human  
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”, Medical  
Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya, 2023,  
Vol. 25, no. 2, pp. 395-402.  
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2550

© Sysoeva G.M. et al., 2023

The article can be used under the Creative

Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2550

кратковременном культивировании. Общей тенденцией, отмеченной на элиситированных клетках обоего типа, являлась выраженная реакция на низкие концентрации препарата (5-125 нг/мл) и ослабление эффекта при их повышении. Аналогичная закономерность была обнаружена при исследовании резидентных макрофагов. Культивирование в течение 24 часов резидентных клеток с препаратом GM-CSF в дозах от 5000 до 40 000 нг/мл вызывало достоверное повышение окислительно-восстановительной активности клеток, индуцированной зимозаном либо эритроцитами барабана (на 33-52%). Как в том, так и другом случае максимальная реакция была обнаружена в ответ на дозу 5000 нг/мл и снижалась по мере ее увеличения. Эффект стимуляции препарата GM-CSF в отношении резидентных макрофагов был более выраженным, чем элиситированных клеток, что проявлялось в удлинении периода их активации до суток от начала культивирования. Полученные данные представляют интерес с точки зрения перспектив использования препаратов GM-CSF в составе иммуномодулирующей и адьювантной терапии различных инфекционных заболеваний.

*Ключевые слова:* гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, макрофаги, нейтрофилы, метаболическая активность, зимозан, мыши

## IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR

Sysoeva G.M., Gamalei S.G., Esina T.I., Danilenko E.D.

*Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Berdsk, Russian Federation*

**Abstract.** Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is a myelopoietic growth factor that exerts pleiotropic effect not only on the differentiation of immature progenitor cells into polymorphonuclear neutrophils, monocytes/macrophages and dendritic cells, but also controls the functioning of differentiated cells. GM-CSF is currently being investigated in clinical trials as an immunomodulator and adjuvant. However, a wide range of biological activities and, sometimes, paradoxical effects of this cytokine require more thorough studies of its action, in order to predict its efficacy under different conditions of immunotherapy. In this work, we have studied the effect of recombinant human GM-CSF on metabolic activity of mouse peritoneal exudate cells in primary cell cultures. Metabolic (redox) activity of the cells was assessed by their ability to reduce nitroblue tetrazolium (NBT) in the course of MF- and Fc-dependent phagocytosis triggered by addition of opsonized zymosan, or sheep erythrocytes to the culture medium. We have shown the dose-dependent stimulatory effect of GM-CSF on the oxidative metabolism of phagocytic peritoneal macrophages and neutrophils. Upon culturing the pepton-elicited cells at wide range of GM-CSF concentrations (5 to 40,000 ng/mL) for 2 and 24 hours, a more pronounced effect of the substance was observed for neutrophils. The GM-CSF preparation caused a significant increase (by 13-17%) in the redox activity of neutrophils induced by opsonized zymosan that persisted at a low dose range, and was retained after 24 hours. The stimulatory effect of GM-CSF on macrophages with NBT index increase by 16% was observed in the short-term cultures. In general, the elicited cells of both types showed a more pronounced response to lower concentrations of GM-CSF (5-125 ng/mL), and weaker effect at higher doses of the preparation. A similar dependence was found when studying the resident macrophages. Culturing of resident cells with GM-CSF at the doses of 5,000 to 40,000 ng/mL for 24 hours caused a significantly increased redox activity of the cells induced by zymosan, or sheep erythrocytes (by 33-52%). In both cases, the maximal response was detected at a dose of 5,000 ng/mL and decreased with increasing dose. The stimulatory effect of GM-CSF upon resident macrophages was more pronounced as compared to elicited cells, which was characterized by the prolonged period of cell activation (up to 24 hours of culture). The data obtained are of interest, in view of prospective usage of GM-CSF as a component of immunomodulatory and adjuvant therapy for various infectious diseases.

*Keywords:* granulocyte-macrophage colony stimulating factor, macrophages, neutrophils, metabolic activity, zymosan, mice

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания, тема Г3-39/21.

## Введение

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) представляет собой миелопоэтический фактор роста, который оказывает плейотропное действие не только на дифференцировку незрелых предшественников в полиморфнодерные нейтрофилы, моноциты/макрофаги и дендритные клетки, но и контролирует функционирование дифференцированных иммунных клеток [3, 16]. Широкий спектр действия GM-CSF может приводить в ходе развития инфекционного или воспалительного процесса, злокачественных новообразованиях к парадоксальным результатам – как иммуностимуляции, так и иммуносупрессии [3]. Многообразные механизмы, лежащие в основе этих разнонаправленных эффектов, до конца не ясны. Однако уже сейчас известны некоторые аспекты его действия, которые могут быть причиной данного разнообразия. Прежде всего, GM-CSF в силу своей основной функции колониестимулирующего фактора оказывает влияние на дифференцировку и созревание большинства миелоидных клеток из клеток-предшественников. Помимо этого, данный цитокин реализует свое действие посредством нескольких типов сигнальных путей (JAK/STAT, PI3K, MAPK и NF-кВ), управляющих различными биологическими процессами. И наконец, GM-CSF может продуцироваться разными типами клеток в ответ на различные сигналы окружающей среды [16].

Данные, полученные в ходе изучения биологических эффектов GM-CSF, послужили толчком к началу многочисленных клинических исследований, таких, например, как вакциноадьювантная терапия для стимуляции противоопухолевого ответа, а в последнее время – и для предотвращения инфекций [4, 7, 8, 9]. Однако очевидно, что с целью прогнозирования эффективности GM-CSF в различных условиях иммунотерапии должны быть самым внимательным образом исследованы механизмы его действия.

Известно, что GM-CSF усиливает окислительный метаболизм, цитотоксичность и хемотаксис гранулоцитов [3]. Эффекты GM-CSF на функцию макрофагов менее ясны и однозначны. Известно, что данный фактор является одним из основных регуляторов дифференцировки моноцитов в тканевые макрофаги. Пул резидентных макрофагов пополняется за счет дифференцировки циркулирующих моноцитов при их попадании в ткани из кровотока.

Резидентные макрофаги обнаруживаются практически во всех тканях, где они могут составлять

до 10-15% от общего числа клеток. Макрофаги различной тканевой локализации обозначаются как остеокласты (кости), микроглиальные клетки (ЦНС), гистиоциты (соединительная ткань), клетки Купфера (печень), альвеолярные макрофаги (легкие) и фагоциты серозных полостей (в частности, перитонеальные) и т.д. Поскольку эти популяции характеризуются специфическими транскрипционными профилями, их можно рассматривать как множество разных и уникальных классов [11]. С другой стороны, основные функции макрофагов универсальны. Они играют ключевую роль в развитии тканей в иммунном ответе на патогены, в контроле и мониторинге возможных нарушений в тканях, в поддержании тканевого гомеостаза [3].

**Целью данного исследования** являлось изучение иммуномодулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека на первичной культуре клеток перитонеального экссудата мыши, а именно влияния препарата на окислительный обмен в процессе фагоцитоза перитонеальных макрофагов и нейтрофилов.

## Материалы и методы

В экспериментах использовали препарат рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (GM-CSF), полученный в Институте медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по технологии, описанной в [1, 2]. Концентрация белка в препарате составляла 3,19 мг/мл, чистота и гомогенность превышали 97%, примеси белков и ДНК штамма-производителя укладывались в заданные нормативной документацией пределы (менее 200 нг/мг белка и 100 пг/мг ДНК соответственно). Содержание бактериальных эндотоксинов (3,5 ЕЭ/дозу) не превышало значения предельной пороговой дозы, рассчитанной с учетом максимальной терапевтической дозы 10 мкг/кг/час [Государственная фармакопея РФ XIV изд. [Электронное издание]. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea>]. Препарата GM-CSF, полученного по разработанной технологии, обладал гемостимулирующей активностью, подтвержденной в системах *in vitro* и *in vivo* [6].

В качестве дополнительного контроля в ходе исследования использовали препарат эндотоксина *E. coli* UKT-B (FUJIFILM Wako Chemicals USA Corporation, серия G-85USA) с концентрацией 500 нг/флакон и биологической активностью 4300 ЕЭ/флакон.

Исследования проведены на 80 самках мышей линии BALB/c массой 20-23 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р. п. Кольцово Новосибирской обл.). До

начала эксперимента животные прошли период адаптационного карантина. Мыши содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении на сбалансированном пищевом рационе со свободным доступом к корму и воде. Работа выполнена согласно основным регулирующим стандартам в области надлежащей лабораторной практики с соблюдением международных рекомендаций Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1996).

Элиситированные перитонеальные нейтрофилы и макрофаги получали введением в брюшную полость мыши раствора 10%-го стерильного пептона. Через 3 ч животных умерщвляли декапитацией, из брюшной полости с помощью среды RPMI-1640 (5 мл, 4 °C) вымывали нейтрофилы. Перитонеальные макрофаги выделяли аналогичным образом через 96 ч после введения пептона и эвтаназии. Резидентные макрофаги получали вымыванием 5 мл среды RPMI-1640 без предварительного введения в брюшную полость пептона.

На основе перитонеального экссудата готовили клеточную взвесь в концентрации  $10^6$  клеток/мл. Клетки культивировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе (10%  $\text{CO}_2$ , 37 °C) в 96-луночных планшетах (Costar®, США) в среде RPMI-1640 с L-глутамином (ООО «БиолоТ», Россия), содержащей пенициллин, стрептомицин (по 100 ед/мл) и инактивированную фетальную сыворотку коров (10%, ООО «БиолоТ», Россия) (полная культуральная среда). В лунки планшета вносили по 100 мкл/лунку взвеси клеток перитонеального экссудата в полной среде RPMI-1640, 50 мкл препарата GM-CSF различной исходной концентрации (опыт), или 50 мкл стандарта эндотоксина в концентрации, равной его содержанию в препарате GM-CSF, или 50 мкл полной среды RPMI-1640 (контроль). Планшет помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ) на 2 или 24 часа.

По завершении инкубации определяли функциональную активность клеток спектрофотометрическим методом с использованием красителя нитросинего тетразолиевого [5]. Для этого монослои клеток дважды отмывали раствором Хенкса и в каждую лунку добавляли 50 мкл полной среды RPMI, 100 мкл раствора нитросинего тетразолиевого с концентрацией 1 мкг/мл и 50 мкл опсонизированного зимозана (Sigma, 3 мг/мл) или опсонизированных эритроцитов барана (1% суспензия). После инкубации в течение часа частицы непоглощенного зимозана отмывали раствором Хенкса, фиксировали клеточный монослои 10%-ным раствором формалина, промывали дистиллированной водой, сушили и добавляли в каждую лунку 60 мкл раствора 2М гидроксида ка-

лия и 70 мкл диметилсульфоксида. Уровень окислительно-восстановительной активности клеток оценивали по изменению оптической плотности раствора, которую измеряли при длине волны 620 нм на многоканальном спектрофотометре для планшетов Multiskan EX (Thermo, Финляндия). Показатели выражали в оптических единицах (о. е.)  $\times 100$ .

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ Statgraphics v. 5.0 (Statistical Graphics Corp., USA). Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики – среднюю арифметическую и ошибку средней. Для оценки значимости межгрупповых различий использовали непараметрические критерии – Н-критерий множественных сравнений Краскела–Уоллиса и U-критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

Принимая во внимание, что макрофаги и нейтрофилы являются профессиональными фагоцитами, активность которых модулируется как провоспалительными, так и противовоспалительными цитокинами [16], нами было проведено исследование влияния препарата GM-CSF на активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов в процессе MF- или Fc-зависимого фагоцитоза.

Показано, что двухчасовое культивирование элиситированных нейтрофилов с препаратом GM-CSF в дозах 5 и 125 нг/мл приводило к достоверному увеличению (на 16%) метаболической (окислительно-восстановительной) активности клеток, индуцированной опсонизированным зимозаном (табл. 1). Повышенная активность нейтрофилов сохранялась на этом уровне и в случае использования более высоких доз GM-CSF (от 2500 до 40 000 нг/мл), однако дальнейшего увеличения значений показателя при увеличении дозы не обнаружено.

Повышение метаболической активности клеток наблюдали и при более длительном культивировании нейтрофилов с препаратом в диапазоне низких концентраций (от 5 до 125 нг/мл).

Стимулирующий эффект GM-CSF был отмечен также в отношении макрофагов. Увеличение уровня НСТ, восстановленного фагоцитирующими клетками, после 2 часов культивирования с препаратом в дозах 5 и 25 нг/мл составляло, соответственно, 142 и 122% по отношению к контролльному уровню. Тенденция к повышению показателя при увеличении его концентрации сохранялась и в диапазоне более высоких доз препарата (табл. 1). Удлинение периода культиви-

ТАБЛИЦА 1. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ И НЕЙТРОФИЛОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c ПОСЛЕ 2-И 24-ЧАСОВОЙ ИНКУБАЦИИ С РЕКОМБИНАНТНЫМ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ GM-CSF

TABLE 1. METABOLIC ACTIVITY OF PERITONEAL MACROPHAGES AND NEUTROPHILS OF BALB/c MICE AFTER 2- AND 24-HOUR INCUBATION WITH rhGM-CSF

Препаратор, доза Preparation, dose	Уровень восстановленного НСТ, о. е. × 100 Level of reduced NBT, a. u. × 100			
	2 часа 2 hours		24 часа 24 hours	
	Макрофаги Macrophages	Нейтрофилы Neutrophils	Макрофаги Macrophages	Нейтрофилы Neutrophils
Контроль (среда RPMI-1640) Control (RPMI-1640 medium)	15,2±0,7	24,3±0,5	16,2±0,5	19,0±0,7
GM-CSF, 5 нг/мл GM-CSF, 5 ng/mL	21,6±0,7*	28,0±1,0*	17,3±0,3	23,1±0,5*
GM-CSF, 25 нг/мл GM-CSF, 25 ng/mL	18,5±0,7*	26,3±0,7	17,4±0,5	22,8±0,7*
GM-CSF, 125 нг/мл GM-CSF, 125 ng/mL	17,7±0,4	28,2±0,6*	16,6±0,6	22,4±2,1*
GM-CSF, 500 нг/мл GM-CSF, 500 ng/mL	16,9±0,6	25,3±1,1	17,1±0,3	18,7±1,0
GM-CSF, 2500 нг/мл GM-CSF, 2,500 ng/mL	16,5±0,6	27,9±0,7*	16,4±0,5	18,4±1,1
GM-CSF, 10 000 нг/мл GM-CSF, 10,000 ng/mL	18,8±0,4*	27,4±0,9*	16,2±0,3	18,9±0,9
GM-CSF, 40 000 нг/мл GM-CSF, 40,000 ng/mL	НИ NS	28,4±1,6*	НИ NS	17,9±0,5

Примечание. Экспериментальные данные представлены в виде средней арифметической величины и стандартной ошибки ( $M\pm m$ ); \* – различия с контролем (среда RPMI-1640) статистически значимы,  $p \leq 0,05$ ; НИ – не исследовали.

Note. Experimental data are presented as the arithmetic mean and standard error ( $M\pm m$ ); \*, differences with the control (RPMI-1640 medium) are statistically significant,  $p \leq 0.05$ ; NS, not studied.

рования макрофагов с GM-CSF до 24 часов приводило к исчезновению эффекта стимуляции.

Поскольку активация препаратом GM-CSF фагоцитоза элиситированных макрофагов могла иметь свои особенности, аналогичное исследование было проведено на резидентных клетках. Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что культивирование резидентных макрофагов перитонеального экссудата в течение 24 часов с препаратом в дозах от 5000 до 40 000 нг/мл вызывало достоверное повышение окислительно-восстановительной активности клеток, индуцированной опсонизированным зимозаном либо эритроцитами барана (соответственно, MF- и Fc-зависимый фагоцитоз). Как в том, так и другом случае максимальная реакция была обнаружена в ответ на дозу 5 000 нг/мл и снижалась по мере ее увеличения.

Культивирование резидентных макрофагов с эндотоксином в концентрациях, эквивалентных его содержанию в соответствующих дозах препарата GM-CSF (от 0,09 до 1,48 нг/мл), не приводило к повышению метаболической активности

клеток, индуцированной опсонизированным зимозаном (данные не приведены). Это позволяет заключить, что эффект стимуляции не связан с наличием в препарате посторонних иммуномодулирующих примесей.

Сравнение модулирующей активности препарата GM-CSF на резидентные и элиситированные макрофаги показывает, что эффект стимуляции в отношении резидентных клеток был более выраженным, что проявлялось в удлинении периода их активации до суток от начала культивирования.

Полученные данные свидетельствуют о том, что препарат рекомбинантного GM-CSF человека обладал способностью изменять окислительно-восстановительную активность клеток перитонеального экссудата (макрофаги, нейтрофилы) мышей, что проявлялось в повышении их способности метаболизировать НСТ. Эффект препарата зависел от типа клеток, их исходного состояния, дозы и длительности культивирования.

Стимулирующий эффект GM-CSF, сравнимый по интенсивности, был более пролонгиро-

**ТАБЛИЦА 2. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РЕЗИДЕНТНЫХ МАКРОФАГОВ ПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ЭКССУДА МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c ПОСЛЕ 24-ЧАСОВОЙ ИНКУБАЦИИ С РЕКОМБИНАНТНЫМ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ GM-CSF**

TABLE 2. METABOLIC ACTIVITY OF RESIDENT MACROPHAGES IN THE PERITONEAL EXUDATE OF BALB/c MICE AFTER 24-HOUR INCUBATION WITH rhGM-CSF

Препарат, доза Preparation, dose	Уровень восстановленного НСТ, о. е. × 100 Level of reduced NBT, a. u. × 100	
	Опсонизированный зимозан Opsonized zymosan	Опсонизированные эритроциты барана Opsonized sheep erythrocytes
<b>Контроль (среда RPMI-1640)</b> Control (RPMI-1640 medium)	14,8±0,2	11,2±0,4
<b>GM-CSF, 2500 нг/мл</b> GM-CSF, 2,500 ng/mL	16,4±0,6	9,3±0,7
<b>GM-CSF, 5000 нг/мл</b> GM-CSF, 5,000 ng/mL	19,7±0,6*	17,0±1,0*
<b>GM-CSF, 10 000 нг/мл</b> GM-CSF, 10,000 ng/mL	19,0±1,0*	14,4±1,7*
<b>GM-CSF, 20 000 нг/мл</b> GM-CSF, 20,000 ng/mL	18,1±0,9*	13,9±1,3*
<b>GM-CSF, 40 000 нг/мл</b> GM-CSF, 40,000 ng/mL	17,8±0,6*	13,1±1,4

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ванным в отношении фагоцитирующих пептон-элиситированных нейтрофилов по сравнению с макрофагами. Препарат GM-CSF вызывал достоверное увеличение (на 13-17%) окислительно-восстановительной активности нейтрофилов, индуцированной опсонизированным зимозаном, которое сохранялось в диапазоне низких доз и через 24 часа. Стимулирующий эффект GM-CSF на макрофаги был отмечен только при кратковременном культивировании.

Общей тенденцией, отмеченной на клетках обоего типа, являлась более выраженная реакция на низкие концентрации препарата и ослабление эффекта при их повышении. Аналогичная закономерность, как видно из представленных выше данных, наблюдалась и на резидентных макрофагах. Надо сказать, стимулирующий эффект GM-CSF в отношении фагоцитов с аналогичной дозовой зависимостью описан и другими исследователями. Так, авторами работы [10] показано, что рекомбинантный мышеский GM-CSF повышал окислительный метаболизм и фагоцитарную активность резидентных и элиситированных тиогликолятом макрофагов мыши. Как в том, так и другом случае препарат усиливал зимозан-индуцированный фагоцитоз и продукцию клетками  $H_2O_2$  в дозе 5 МЕ/мл, при этом эффект стимуляции исчезал при увеличении дозы.

Различия в реакции на объект фагоцитоза ( $\beta$ -глюкан, зимозан) резидентных и элиситированных перитонеальных макрофагов, на

наш взгляд, может быть связано с различиями в рецепторных характеристиках этих клеток. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, приведенные в работе [15], где был исследован уровень экспрессии макрофагами и связывания с лигандами рецептора  $\beta$ -гликанов дектина-1. Авторы работы показали, что 24-часовое культивирование перитонеальных макрофагов с GM-CSF значительно повышало экспрессию дектина-1 и, как следствие, связывание клетками зимозана. При этом были обнаружены количественные различия между показателями резидентных и элиситированных тиогликолятом макрофагов: величина ответа элиситированных клеток была ниже резидентных. Результатом более высокого уровня экспрессии рецепторов и связывания зимозана, по-видимому, может быть более высокий уровень окислительного метаболизма резидентных макрофагов, что и наблюдалось в наших экспериментах.

Полученные нами результаты хорошо коррелируют с данными о повышении под действием GM-CSF способности нейтрофилов и макрофагов к фагоцитированию и уничтожению грибковых и бактериальных патогенов [7]. Так, авторами работы [8] отмечено ингибирование размножения *Mycobacterium avium* в макрофагах человека, обработанных препаратом рекомбинантного человеческого GM-CSF саргамостимом. Аналогичный эффект наблюдали на мышах, инфицированных *Mycobacterium avium*. Было показано, что введение

саргамостима в течение 14 дней после заражения приводило к резкому снижению числа бактерий в печени и селезенке опытных животных по сравнению с контрольными мышами.

Препарат рекомбинантного GM-CSF обладал способностью ингибировать супрессивный эффект дексаметазона в культуре перитонеальных и бронхоальвеолярных макрофагов мышей и повышал их ингибирующую активность в отношении *Aspergillus fumigatus* [9]. Интересно то, что конидицидную активность на культурах тканевых макрофагов мышей проявляли в равной степени как мышиный, так и человеческий GM-CSF.

Данные об отсутствии различий в эффектах GM-CSF разного происхождения заставляют несколько иначе взглянуть на вопрос о видовой специфичности этого цитокина. С одной стороны, существуют многочисленные данные относительно неспособности человеческого GM-CSF специфически связываться с мышевыми рецепторами и взаимодействовать с гемопоэтическими предшественниками и клетками крови мышей [13, 14]. С другой стороны, в работе [12] было показано, что рекомбинантный GM-CSF человека способен усиливать пролиферацию мышевых гемопоэтических клеток-предшественников при совместном культивировании с мышевым IL-3. Кроме того, человеческий GM-CSF без каких-либо дополнительных экзогенных модуляторов индуцировал дифференцировку гемопоэтических клеток-предшественников в костном мозге мышей, подвергнутых сублетальному облуче-

нию, при этом эффект цитокина не отличался по интенсивности от эффекта мышевого GM-CSF. На основании этих данных можно сделать вывод о том, что человеческий GM-CSF способен воздействовать на клетки мышей, но непрямым способом.

## Выводы

1. Рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный фактор человека обладает способностью дозозависимо усиливать окислительный метаболизм тканевых дифференцированных клеток иммунной системы – нейтрофилов и макрофагов перитонеального экссудата в культуре клеток.

2. Эффект стимуляции препарата GM-CSF, сравнимый по интенсивности, был более продолжительным в отношении элиситированных нейтрофилов по сравнению с макрофагами.

3. Интенсивность и продолжительность стимулирующего эффекта GM-CSF на макрофаги зависели от функционального состояния клеточной популяции. Эффект препарата в отношении резидентных клеток был более выраженным по сравнению с элиситированными, что проявлялось в удлинении периода их активации.

Полученные данные представляют интерес с точки зрения перспектив использования препаратов GM-CSF в составе иммуномодулирующей и адьювантной терапии различных инфекционных заболеваний.

## Список литературы / References

1. Гилева И.П., Есина Т.И., Волосникова Е.А., Гогина Я.С., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д. Рекомбинантная плазмидная ДНК p280\_2GM, кодирующая полипептид со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, штамм E. COLI SG 20050/p280\_2GM – продуцент полипептида со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека и способ получения указанного полипептида. Патент Российской Федерации № 2708556; 2019. [Gileva I.P., Esina T.I., Volosnikova E.A., Gogina Ya.S., Lebedev L.R., Danilenko E.D. Recombinant plasmid DNA p280\_2GM coding polypeptide with properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of human, strain Escherichia coli SG 20050/p280\_2GM – producer of polypeptide with properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of human and method of obtaining of said polypeptide. Patent RF. No. 2708556; 2019.]
2. Есина Т.И., Лебедев Л.Р., Волосникова Е.А., Гилева И.П., Гогина Я.С., Терещенко Т.А., Kochneva G.B., Гражданцева А.А., Даниленко Е.Д. Способ получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека // Биотехнология, 2019. Т. 35, № 3. С. 68-73. [Esina T.I., Lebedev L.R., Volosnikova E.A., Gileva I.P., Gogina Ya.S., Tereshchenko T.A., Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Danilenko E.D. Method for obtaining recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Biotehnologiya = Biotechnology*, 2019, Vol. 35, no. 3, pp. 68-73. (In Russ.)]
3. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Иммунобиологические свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и синтетических пептидов его активного центра // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5. С. 1031-1054. [Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynsina M.A., Gritsenko V.A. Immunobiological properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and synthetic peptides of his active center. *Meditinskaya imunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1031-1054. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2216.
4. Сысоева Г.М., Белкина А.О., Даниленко Е.Д. Перспективы использования гранулоцит-макрофагального колониестимулирующего фактора в качестве иммуноадьюванта при вакцинопрофилактике // Биофармацевтический журнал, 2019. Т. 11, № 4. С. 3-14. [Sosoeva G.M., Belkina A.O., Danilenko E.D. Prospects

- for the use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an immunoadjuvant in vaccine prevention. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*, 2019, Vol. 11, no. 4, pp. 3-14. (In Russ.)]
5. Чесноков В.А., Воскресенский А.М., Свиридов Л.П. Оценка функциональной активности перитонеальных макрофагов с помощью тетразолиевого теста // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1985. № 5. С. 89-90. [Chesnokov V.A., Voskresensky A.M., Sviridov L.P. Evaluation of the functional activity of peritoneal macrophages using the tetrazolium test. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1985, no. 5, pp. 89-90. (In Russ.)]
6. Шимина Г.Г., Батенева А.В., Гамалей С.Г., Есина Т.И., Терещенко Т.Г., Даниленко Е.Д. Исследование гемостимулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2020. Т. 20, № 4. С. 268-276. [Shimina G.G., Bateneva A.V., Gamalei S.G., Esina T.I., Tereshchenko T.G., Danilenko E.D. Study on hemostimulating properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2020, Vol. 20, no. 4, pp. 268-276. (In Russ.)]
7. Armitage J.O. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 1998, Vol. 92, no. 12, pp. 4491-4508.
8. Bermudez L.E., Martinelli J., Petrofsky M., Kolonoski P., Lowell S., Young L.S. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances the effects of antibiotics against mycobacterium avium complex infection in the beige mouse model. *J. Infect. Dis.*, 1994, Vol. 169, no. 3, pp. 575-580.
9. Brummer E., Maqbool A., Stevens D.A. Protection of peritoneal macrophages by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) against dexamethasone suppression of killing of Aspergillus, and the effect of human GM-CSF. *Microbes Infect.*, 2002, Vol. 4, no. 2, pp. 133-138.
10. Coleman D.L., Chodakewitz J.A., Bartiss A.H., Mellors J.W. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances selective effector functions of tissue-derived macrophages. *Blood*, 1988, Vol. 72, no. 2, pp. 573-578.
11. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, pp. 953-964.
12. Hofer M., Vacek A., Weiterova L. Action of granulopoiesis-stimulating cytokines rhG-CSF, rhGM-CSF, and rmGM-CSF on murine hematopoietic progenitor cells for granulocytes and macrophages (GM-CFC). *Physiol. Res.*, 2005, Vol. 54, pp. 207-213.
13. Park L.S., Friend D., Gillis S., Urdal D.L. Characterization of the cell surface receptor for human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, 1986, Vol. 164, no. 1, pp. 251-262.
14. Schuh J.C., Morrissey P.J. Development of a recombinant growth factor and fusion protein: lessons from GM-CSF. *Toxicol. Pathol.*, 1999, Vol. 27, no. 1, pp. 72-77.
15. Willment J.A., Lin H-H., Reid D.M., Taylor P.R. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-Treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, Dexamethasone, and Lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 9, pp. 4569-4573.
16. Zhan Y., Lew A.M., Chopin M. The pleiotropic effects of the GM-CSF rheostat on myeloid cell differentiation and function: more than a numbers game. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2679. doi: 10.3389/fimmu.2019.02679.

**Авторы:**

**Сысоева Г.М.** – ведущий научный сотрудник отдела биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Россия

**Гамалей С.Г.** – заведующая отделом биологических исследований, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Россия

**Есина Т.И.** – младший научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов, Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Россия

**Даниленко Е.Д.** – к.б.н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, г. Бердск, Россия

**Authors:**

**Sysoeva G.M.**, Leading Research Associate, Department of Biological Studies, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russian Federation

**Gamalei S.G.**, Head, Department of Biological Studies, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russian Federation

**Esina T.I.**, Junior Research Associate, Department of Technology Development and Pilot Production of Biological Preparations, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russian Federation

**Danilenko E.D.**, PhD (Biology), Director, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Berdsk, Russian Federation

Поступила 12.07.2022

Отправлена на доработку 20.08.2022

Принята к печати 08.11.2022

Received 12.07.2022

Revision received 20.08.2022

Accepted 08.11.2022

# НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ У ПОСТРАДАВШИХ С ОЖОГОВОЙ ТРАВМОЙ

Пивоварова Л.П.<sup>1</sup>, Осипова И.В.<sup>1</sup>, Арискина О.Б.<sup>1</sup>,  
Орлова О.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе»,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Тяжелая ожоговая травма (ОжТ) сопровождается нарушениями микроциркуляции, вено-электролитного и кислотно-основного баланса в течение 2-3 суток после инцидента и развитием токсемии на 4-12-е сутки. Выраженность токсемии зависит от площади и глубины поражения, ре-зорбции продуктов распада тканей, формирования системного воспалительного ответа. У пострадавших с глубокими ожогами в 15% случаев развивается сепсис. Патогенез критических состояний тесно связан с функциональной активностью миелоидных клеток, в том числе нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Определение характера нарушений функции НГ у пострадавших с ОжТ важно как для прогноза развития септических осложнений, так и формирования целевой терапии. Целью настоящего исследования явилось изучение функций нейтрофилов у пострадавших с тяжелой ожоговой травмой и определение ранних предикторов ожогового сепсиса. Обследованы 53 пострадавших с тяжелой ожоговой травмой ОжТ в возрасте 43 (32-52) года; площадь повреждения составляла 43 (17-63)% поверхности тела с площадью глубоких ожогов 17 (13-27)%. Тяжесть ОжТ оценивали с помощью индекса Франка, величина которого составила 74 (62-89) у. е. В процессе исследования были выделены две группы пострадавших в зависимости от развития генерализованных бактериальных осложнений: 24 человека без сепсиса и 29 человек с сепсисом. Развитие ожогового сепсиса определяли по критериям американской ожоговой ассоциации (ABA, 2007). Исследования проводили при поступлении, на 1-е, 3-и, 5-е, 10-е и 20-е сутки ожоговой болезни. Определяли количество форменных элементов крови и лейкограмму; фенотипические и активационные маркеры гранулоцитов крови иммуноцито-химическим методом с использованием моноклональных антител: рецепторы адгезии –  $\beta 2$  интегрины (CD18<sup>+</sup>), CD14<sup>+</sup>НГ (NCL-CD14), дефенсин<sup>+</sup> НГ (human neutrophil peptides, HNP 1-3), (Def<sup>+</sup>НГ); концентрацию в крови растворимых дефенсинов (sDef) (Human HNP1-3), IL-6, IL-8 методом ИФА; содержание прокальцитонина; люминолопосредованную спонтанную и индуцированную зимозаном хемилюминесценцию НГ. Результаты исследования показали связь между количеством НГ, содержащих антимикробные пептиды, количеством НГ, экспрессирующих адгезионные молекулы CD18<sup>+</sup>, активацией окислительного метаболизма, гиперпродукцией IL-6 и развитием сепсиса у пострадавших с тяжелой ОжТ и тяжестью ожоговой травмы.

**Ключевые слова:** тяжелая ожоговая травма, функции нейтрофилов, сепсис

**Адрес для переписки:**

Пивоварова Людмила Павловна  
ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский  
институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе»  
192242, Россия, Санкт-Петербург, ул. Будапештская, 3.  
Тел.: 8 (812) 384-46-68.  
Факс: 8 (812) 384-46-46.  
E-mail: pivovaroval@yandex.ru

**Address for correspondence:**

Ludmila P. Pivovarova  
I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine  
3 Budapestskaya St  
St. Petersburg  
192242 Russian Federation  
Phone: +7 (812) 384-46-68.  
Fax: +7 (812) 384-46-46.  
E-mail: pivovaroval@yandex.ru

**Образец цитирования:**

Л.П. Пивоварова, И.В. Осипова, О.Б. Арискина,  
О.В. Орлова «Нейтрофильные гранулоциты у  
пострадавших с ожоговой травмой» // Медицинская  
иммунология, 2023. Т. 25, № 2, С. 403-408.  
doi: 10.15789/1563-0625-NGI-2327

© Пивоварова Л.П. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

L.P. Pivovarova, I.V. Osipova, O.B. Ariskina, O.V. Orlova  
“Neutrophilic granulocytes in the patients with burn injury”,  
Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya,  
2023, Vol. 25, no. 2, pp. 403-408.

doi: 10.15789/1563-0625-NGI-2327

© Pivovarova L.P. et al., 2023

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-NGI-2327

# NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN THE PATIENTS WITH BURN INJURY

Pivovarova L.P.<sup>a</sup>, Osipova I.V.<sup>a</sup>, Ariskina O.B.<sup>a</sup>, Orlova O.V.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Severe burn injury (BI) is accompanied by disturbed microcirculation, water-electrolyte and acid-base imbalance within 2-3 days after the accident, and the development of toxemia within 4-12 days. The severity of toxemia depends on the area and depth of the lesion, resorption of tissue decay products, and development of a systemic inflammatory response syndrome. In the patients suffering with deep BI sepsis, it develops in 15% of cases. Pathogenesis of critical conditions is related to the functional activity of myeloid cells, including neutrophilic granulocytes (NG). The determination of NG's dysfunctions in patients with BI is important, both for prediction of septic complications and administration of rational therapy. The aim of our work was to study the functions of neutrophils in patients with severe BI and to determine early predictors of burn-associated sepsis. The study involved 53 patients with severe BI at the mean age of 43 years (32 to 52); the area of damage was 43% (17 to 63) of the body surface, with deep-burn area of 17 (13 to 27) %. The severity of BI was assessed using the Frank index, at the average value of 74 conventional units (62 to 89). Two groups of patients were identified: 24 persons without sepsis, and 29 people with sepsis and severe sepsis. The studies were carried out upon admission, on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, and 20<sup>th</sup> day of the burn disease. We determined the numbers of NGs expressing CD18<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, defensin<sup>+</sup>; serum contents of soluble defensins (sDef), IL-6, IL-8 levels (ELISA); procalcitonin, as well as luminol-mediated spontaneous and induced NG chemiluminescence. The results of this study showed a relationship between the amounts of NGs containing antimicrobial peptides, contents of NGs expressing CD18<sup>+</sup> adhesion molecules, activation of oxidative metabolism, IL-6 overproduction, and development of sepsis in patients with burn injury, as well as with severity of burn trauma.

**Keywords:** burn injury, severe, neutrophil function, sepsis

## Введение

Тяжелая ожоговая травма (ОжТ) сопровождается нарушениями микроциркуляции, водно-электролитного и кислотно-основного баланса в течение 2-3 суток после инцидента и развитием токсемии на 4-12-е сутки. Выраженность токсемии зависит от площади и глубины поражения, резорбции продуктов распада тканей, формирования системного воспалительного ответа (СВО). У пострадавших с глубокими ожогами от 10% до 20% поверхности тела и более 20% поверхности тела сепсис развивается в 0,4%, 1,9% и 15% случаев соответственно [1].

В литературе в последнее время уделяется внимание иммунным механизмам заживления ран при глубоких ожогах, которые связаны как с местной воспалительной реакцией, так и системным воспалением [8, 12]. Активация иммунитета, и в первую очередь врожденного, реализуется посредством привлечения в очаг повреждения миелоидных клеток, содержащих антимикробные пептиды, каскадной активации окислительного метаболизма и продукции многочисленных цитокинов, хемокинов, компонентов комплемента, ростовых факторов [10]. В первую неделю ожоговой болезни высокие концентрации IL-6 и IL-8 в крови связаны с тяжестью ожогового повреж-

дения [4] и площадью поражения кожных покровов [7]. Патогенез критических состояний тесно связан с функциональной активностью миелоидных клеток – нейтрофильных гранулоцитов (НГ) и макрофагов (Мо), способных к экстренной мобилизации. НГ и Мо привлекаются из кровотока в ткани; в тканевом пространстве их функция регулируется цитокинами и факторами роста, продуцируемыми макрофагами и тучными клетками [11]. Alves-Filho J.C. и соавт. (2010) показали заметное снижение хемотаксической реакции нейтрофилов, полученных от пациентов с ожоговым сепсисом, по сравнению с нейтрофилами здоровых субъектов. Qi X.X. и соавт. (2020) связывают нарушение хемотаксиса НГ со сниженной экспрессией хемокиновых рецепторов CXCR1 и CXCR2 у пострадавших с тяжелыми ожогами на ранней стадии ожоговой болезни. Известно, что активация Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptor, TLR) бактериями и/или их продуктами приводит к чрезмерному увеличению концентрации циркулирующих цитокинов / хемокинов. Эти медиаторы, действуя совместно с ЛПС, стимулируют продукцию оксида азота (NO), нарушая миграцию нейтрофилов. NO снижает экспрессию хемокиновых рецепторов CXCR2 на нейтрофилах и молекул адгезии как на эндотелиальных клетках, так и на нейтрофилах [5]. Как

усиление, так и снижение продукции активных форм кислорода нейтрофилами у пациентов с тяжелыми ожогами и ожоговым сепсисом, связанные с развитием септических осложнений и исходом, отмечали Образцов И.В. и соавт. (2017).

Тем не менее нарушения функциональной активности нейтрофилов как важного фактора противоинфекционной резистентности до конца не изучены. Определение характера нарушений функции НГ у пострадавших с ОжТ важно как для прогноза развития гнойных осложнений, так и формирования целевой терапии.

**Цель настоящего исследования** заключалась в изучении функций нейтрофилов у пострадавших с тяжелой ожоговой травмой и определении ранних предикторов ожогового сепсиса.

## Материалы и методы

Обследованы 53 пострадавших с тяжелой ожоговой травмой в возрасте 43 (32-52) года (37 мужчин и 16 женщин); площадь повреждения составляла 43 (17-63)% поверхности тела с площадью глубоких ожогов 17 (13-27)%. Тяжесть ОжТ оценивали с помощью индекса Франка (ИФ), величина которого составила 74 (62-89) у. е. Обожженные были обследованы согласно клиническим рекомендациям по оказанию медицинской помощи пострадавшим с термической травмой. В процессе исследования были выделены две группы пострадавших в зависимости от развития генерализованных инфекционных осложнений: 24 человека без сепсиса и 29 человек с сепсисом. Развитие ожогового сепсиса определяли по критериям американской ожоговой ассоциации (American Burn Association, 2007).

Лабораторные исследования проводили при поступлении, на 1-е, 3-е, 5-е, 10-е и 20-е сутки ожоговой болезни. Определяли количество форменных элементов крови и лейкограмму (Sysmex XT 4000, Япония); фенотипические и активационные маркеры клеток крови иммуноцитохимическим методом с использованием системы визуализации (Novolink Polymer Detection Systems, Великобритания) и моноклональных антител: количество НГ, экспрессирующих рецепторы адгезии –  $\beta 2$  интегрины ( $CD18^+$ ) (Invitrogen),  $CD14^+$ НГ (NCL-CD14), количество дефенсин $^+$ НГ (human neutrophil peptides, HNP 1-3, Leica Biosystems), (Def $^+$ НГ). Также определяли концентрацию в крови растворимых дефенсинов (sDef) (Human HNP1-3, Hycult Biotech), IL-6, IL-8 («Вектор Бест», Россия) методом ИФА, содержание прокальцитонина (ПКТ) (Architecti 2000, Abbot), люминолопосредованную спонтанную (ХЛ сп.) и индуцированную (ХЛ инд.) зимозаном (Sigma) хемилюминесценцию НГ (люминометр 1251, BIO-ORBIT, Финляндия).

Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для всех данных определяли медиану (Me) и персентили ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), коэффициенты корреляции по Пирсону и Спирмену. Статистическая значимость коэффициенты корреляции принималась для  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

У всех пострадавших с ОжТ при поступлении и в 1-е сутки наблюдали лейкоцитоз, увеличение содержания зрелых НГ и палочкоядерных НГ. На 3-и сутки после ожога, когда начинает развиваться токсемия, у больных обеих групп содержание лейкоцитов и сегментоядерных НГ снижалось, но возрастало число палочкоядерных гранулоцитов и в наибольшей степени – у пациентов с сепсисом. В 1-е сутки после ожоговой травмы абсолютное количество НГ в крови было тем ниже, чем выше риск летального исхода ( $r = -0,429$ ;  $p < 0,05$ ).

Антимикробные пептиды –  $\alpha$ -дефенсины человека, локализованные в лизосомальных гранулах нейтрофилов, осуществляют киллинг патогенов в миелоидных клетках, начиная со стадии промиелоцитов [2]. У всех пострадавших при поступлении отмечено увеличение содержание Def $^+$ НГ по сравнению с контролем: у больных без сепсиса – в 6,8 раза ( $p < 0,000$ ) и у больных с сепсисом – в 4,3 раза ( $p < 0,001$ ). На 3-и сутки наблюдения у пострадавших с сепсисом выявлены высокие концентрации sDef 1426 (667-45070) мкг/мл в сыворотке крови (в 7,9 раза выше контроля,  $p < 0,002$ ) на фоне близких к норме значений (1,53 (1,22-2,49)  $\times 10^9$ /л) количества Def $^+$ НГ (2,0 (0,4-3,7)  $\times 10^9$ /л). Однако у пострадавших без сепсиса в эти же сроки наблюдения значения как sDef (567 (317-1015) мкг/мл), так и Def $^+$ НГ (6,0 (3,4-6,1)  $\times 10^9$ /л) были одинаково повышенными. Уже в 1-е сутки после ожога показатели концентрации sDef и количества Def $^+$ НГ демонстрировали положительную корреляционную связь с величиной ИФ, индекса SIRS и риском развития сепсиса (табл. 1).

Ожоговое повреждение вызывает высвобождение различных медиаторов, таких как активные формы кислорода (АФК), цитокины и медиаторы воспаления [8]. Mühl D. и соавт. (2011) показали, что АФК были значительно повышенны у больных сепсисом при поступлении, и продолжали возрастать до 5-го дня наблюдения. В нашем исследовании у пациентов без сепсиса активация окислительного метаболизма гранулоцитов происходила при поступлении (ХЛ сп 20,2; 16,1; 24,4 мВ) и ХЛ инд. 61,1; 58,0; 10,2 мВ), нормализовалась через сутки и оставалась в пределах нормы в течение всего периода наблюдения. В то же время у пострадавших с сепсисом спон-

ТАБЛИЦА 1. ВЫЯВЛЕННАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ ТЯЖЕСТЬЮ ОЖОГОВОЙ ТРАВМЫ И ПОКАЗАТЕЛЯМИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

TABLE 1. CORRELATION BETWEEN THE SEVERITY OF BURN INJURY AND INDICATORS OF NONSPECIFIC RESISTANCE

Показатели Indicators	Индекс Франка (индекс тяжести поражения) Frank index (index of severity of damage)		ССВО SIRS		Осложнения (сепсис) Complications (sepsis)	
Лейкоциты, × 10 <sup>9</sup> /л Leukocytes, × 10 <sup>9</sup> /L	–	–	–	–	-0,613 p < 0,01	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day
п/я НГ, % stab NG, %	-0,498 p < 0,05	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day	–	–	-0,455 p < 0,01	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day
НГ, % NG, %	–	–	–	–	-0,465 p < 0,01	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day
НГ, × 10 <sup>9</sup> /л NG, × 10 <sup>9</sup> /L	-0,471 p < 0,05	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day	0,320 p < 0,05	20-е сут. 20 <sup>th</sup> day	-0,390 p < 0,05	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day
Def <sup>+</sup> НГ,% Def <sup>+</sup> NG,%	0,697 p < 0,05 0,376 p < 0,05 0,328 p < 0,0	пост. admission 1-е сут. 1 <sup>st</sup> day 5-е сут. 5 <sup>th</sup> day	0,821 p < 0,01 0,361 p < 0,0	пост. admission 1-е сут. 1 <sup>st</sup> day	–	–
Def <sup>+</sup> НГ, × 10 <sup>9</sup> /л Def <sup>+</sup> NG, × 10 <sup>9</sup> /L	–	–	0,349 p < 0,05	1-е сут. 1 <sup>st</sup> day	-0,361 p < 0,015	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day
sDef	–	–	0,427 p < 0,05 0,392 p < 0,05	1-е сут. 1 <sup>st</sup> day 10-е сут. 10 <sup>th</sup> day	0,365 p < 0,05	1-е сут. 1 <sup>st</sup> day
Хл сп. НГ CL sp. NG	–	–	0,327 p < 0,05	20-е сут. 20 <sup>th</sup> day	0,442 p < 0,01	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day
Хл инд. НГ CL ind. NG	-0,730 < 0,05	3-и сут. 3 <sup>rd</sup> day	0,533 p < 0,05 0,357 p < 0,05	3-и сут. 3 <sup>rd</sup> day 20-е сут. 20 <sup>th</sup> day	0,408 p < 0,01	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day
CD14 <sup>+</sup> НГ, × 10 <sup>9</sup> /л CD14 NG, × 10 <sup>9</sup> /L	0,576 p < 0,05 0,395 p < 0,05	пост. admission 1-е сут. 1 <sup>st</sup> day	–	–	–	–
IL-6	0,516 p < 0,05	20-е сут. 20 <sup>th</sup> day	–	–	0,344 p < 0,05	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day
IL-8	0,411 p < 0,05	20-е сут. 20 <sup>th</sup> day	0,359 p < 0,05 0,527 p < 0,05	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day 10-е сут. 10 <sup>th</sup> day	–	–
CD18 НГ, % CD18 NG, %	–	–	0,432 p < 0,05	1-е сут. 1 day	–	–
CD18 <sup>+</sup> НГ, × 10 <sup>9</sup> /л CD18 <sup>+</sup> NG, × 10 <sup>9</sup> /L	–	–	-0,338 p < 0,05	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day	-0,400 p < 0,01	5-е сут. 5 <sup>th</sup> day

Примечание. p – уровень статистической значимости коэффициентов корреляции. Отсутствие выявленной корреляционной связи между исследованными параметрами обозначено дефисом.

Note. p is the level of statistical significance of the correlation coefficients. The absence of the revealed correlation between the studied parameters is indicated by a hyphen.

тальная и индуцированная продукция АФК увеличивалась только к 3-м суткам наблюдения по сравнению с контролем в 2,7 раза (контроль: ХЛ сп. 7,06; (5,45-9,05) и ХЛ инд. 9,6; (7,4-11,7) мВ; и оказалась в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) выше, чем у пациентов без сепсиса. Отсроченное развитие лейкоцитоза, гранулоцитоза, активации кислородного метаболизма у больных с сепсисом, отсутствие увеличения количества НГ с антимикробными пептидами, но при этом многократное увеличение растворимых дефенсивов в плазме, позволяет предположить существующую до поступления в стационар недостаточность гранулоцитопеоза и дисфункцию нейтрофилов. В то же время Рена О.М. и соавт. (2014) рассматривают развитие СВО и сепсиса как генетически детерминированный процесс. Используя секвенирование комплементарной ДНК для клонирования генов эукариот в прокариотах из мононуклеарных клеток, был идентифицирован генетический профиль толерантности к эндотоксинам (называемый сигнатурой толерантности к эндотоксинам (Endotoxin Tolerance Signature или ETS), которая чаще проявляется у пациентов с сепсисом и чаще ассоциируется с органной недостаточностью и тяжестью заболевания.

Известно, что раннее распознавание консервативных патогенассоциированных мембранных паттернов (ПАМП) происходит с участием активации антигенов CD14, экспрессирующихся в составе TLR4 на мемbrane не только моноцитов, макрофагов, но и НГ. Активация TLR4 патогенами приводит к активации секреции воспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-8 и др. У всех пострадавших с тяжелой ожоговой травмой мы наблюдали увеличение содержания CD14<sup>+</sup>НГ в 2-3 раза при поступлении и в 1-е сутки наблюдения по сравнению с нормой (2,01; 1,87; 2,37  $\times 10^9$ /л), которое было связано с тяжестью ОжТ (табл. 1). Количество CD14<sup>+</sup>НГ снижалось до уровня нормальных значений к 3-и суткам, но вновь возрастало в 2 раза ( $p < 0,05$ ) к 20-м суткам наблюдения (начало периода ожоговой септицемии).

Одновременно мы отметили увеличение содержания IL-8 и IL-6 в крови. В группах пациентов без сепсиса и с сепсисом концентрация IL-8 на 3-и сутки после ожога была максимальной и превышала референсные значения (5,6 (5,2-6,05) пг/мл) в 75 и 53 раза соответственно. На 10-е сутки у пострадавших с сепсисом значение IL-8 было в 2,5 раза выше, чем у больных без сепсиса (284 (75,8-474,0) и 109,4 (44,1-208,3) пг/мл соответственно,  $p < 0,039$ ). На 5-е сутки у пациентов с сепсисом продукция IL-6 – маркера развития СВО, в 2 раза превышала этот показа-

тель у пострадавших без сепсиса (384 (163-499 и 180 (111-311) пг/мл соответственно,  $p < 0,05$ ). На 20-е сутки концентрация IL-6 у пациентов с сепсисом снижалась до значений 165 (50-386) пг/мл, и оставалась в 3 раза выше ( $p < 0,017$ ), чем в группе без сепсиса и была связана с тяжестью индекса поражения (табл. 1).

Известно, что повышение в крови провоспалительных цитокинов ведет к активации эндотелия, индукции адгезии лейкоцитов к поверхности эндотелиальных клеток, запускает процесс перестройки межклеточных контактов и миграции лейкоцитов через эндотелий [15]. У всех пострадавших с тяжелой ОжТ при поступлении отмечено трехкратное по сравнению с контролем ( $p < 0,004$ ) повышение содержания CD18<sup>+</sup>НГ, ответственных за адгезию и трансэндотелиальную миграцию клеток в очаге поражения. Следует отметить, что на 3-и сутки наблюдения содержание CD18<sup>+</sup>НГ у пациентов с сепсисом снижалось до нормальных значений (2,69 (2,09-3,46)  $\times 10^9$ /л), в то время как у пострадавших без сепсиса содержание CD18<sup>+</sup>НГ было увеличено в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ). К 20-м суткам наблюдения у пострадавших с сепсисом отмечено снижение содержания CD18<sup>+</sup>НГ% по сравнению с контролем (на 22%,  $p < 0,01$ ) и по сравнению с пациентами без сепсиса (на 21%,  $p < 0,01$ ). Эти наблюдения, вероятно, отражают нарушение адгезионных свойств и способности нейтрофилов к миграции в очаг поражения у пострадавших с осложнениями ОжТ и также связано с развитием СВО (табл. 1).

В настоящее время общепризнанным маркером сепсиса является концентрация ПКТ. Различия этого показателя между группами отмечены на 10-е и 20-е сутки после травмы ( $p < 0,05$ ), т. е. данный показатель при ожоговой травме являлся достоверным диагностическим тестом, но не прогностическим.

## Заключение

Таким образом, результаты исследования показали связь между количеством НГ, содержащих антимикробные пептиды, количеством НГ, экспрессирующих адгезионные молекулы CD18<sup>+</sup>, активацией окислительного метаболизма, гиперпродукцией IL-6 и развитием сепсиса у пострадавших с тяжелой ОжТ, а также с тяжестью ожоговой травмы. Оценка функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с ожоговой травмой актуальна на всех стадиях болезни, так как позволяет прогнозировать развитие септических осложнений и оценивать эффективность проводимой терапии.

## Список литературы / References

1. Алексеев А.А., Крутиков М.Г., Яковлев В.П. Ожоговая инфекция: этиология, патогенез, диагностика, профилактика и лечение. М.: Вузовская книга: 2010, 416 с. [Alekseev A.A., Krutikov M.G., Yakovlev V.P. Burn infection: etiology, pathogenesis, diagnosis, prevention and treatment]. Moscow: Vuzovskaya kniga, 2010. 416 p.

2. Будихина А.С., Пинегин Б.В.  $\alpha$ -Дефенсины – антимикробные пептиды нейтрофилов: свойства и функции // Иммунология, 2008. № 5. С. 317-320. [Budikhina A.S., Pinegin B.V.  $\alpha$ -Defensins – antimicrobial peptides of neutrophils: properties and functions. *Immunologiya = Immunologiya*, 2008, no. 5, pp.317-320. (In Russ.)]
3. Образцов И.В., Годков М.А., Кулабухов В.В., Владимирова Г.А., Измайлов Д.Ю., Проскурнина Е.В. Функциональная активность нейтрофилов при ожоговом сепсисе // Общая реаниматология, 2017. Т. 13, № 2. С. 41-51. [Obraztsov I.V., Godkov M.A., Kulabukhov V.V., Vladimirova G.A., Izmailov D.Yu., Proskurnina E.V. Functional activity of neutrophils in burn sepsis. *Obshchaya reanimatologiya = General Resuscitation*, 2017, Vol. 13, no. 2, pp. 41-51. (In Russ.)]
4. Щербук Ю.А., Багненко С.Ф., Джурук Б.И. Патогез и лечение шока различной этиологии. Руководство для врачей. СПб.: Стикс, 2010. С. 320-355. [Shcherbuk Yu.A., Bagnenko S.F., Dzhurko B.I. Pathogens and treatment of shock of various etiology. A guide for doctors]. St. Petersburg: Stiks, 2010, pp. 320-355.
5. Alves-Filho J.C., de Freitas A., Spiller F., Souto F.O., Cunha F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*, 2008, Vol. 30, no. 1, pp. 3-9.
6. Alves-Filho J.C., Spiller F., Cunha F.Q. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock*, 2010, Vol. 34, no. 1, pp. 15-21.
7. Bergquist M., Hästbacka J., Glaumann C., Freden F., Huss F., Lipcsey M. The time-course of the inflammatory response to major burn injury and its relation to organ failure and outcome. *Burns*, 2019, Vol. 45, no. 2, pp. 354-363.
8. Chakraborty R.K., Burns B. Systemic Inflammatory Response Syndrome. 2020, Nov 16. In: Stat Pearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing.
9. George B., Suchithra T.V., Bhatia N. Burn injury induces elevated inflammatory traffic: the role of NF- $\kappa$ B. *Inflamm. Res.*, 2021, Vol.70., no. 1, pp. 51-65.
10. Mühl D., Woth G., Drenkovics L., Varga A., Ghosh S., Csontos C., Bogár L., Wéber., Lantos J. Comparison of oxidative stress leukocyte activation in patients with severe sepsis and burn injury. *Indian J. Med. Res.*, 2011, Vol. 134, no. 1, pp. 69-78.
11. Oskeritzian CA. Mast cells and wound healing. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, 2012, no. 1, pp. 23-28.
12. Pena O.M., Hancock D.G., Lyle N.H., Linder A., Russell J.A., Xia J., Fjell C.D., Boyd J.H., Hancock R.E. An endotoxin tolerance signature predicts sepsis and organ dysfunction at initial clinical presentation. *EBioMedicine*, 2014, Vol. 1, no. 1, pp. 64-71.
13. Porter C., Tompkins R.G., Finnerty C.C., Sidossis L.S., Suman O.E., Herndon D.N. The metabolic stress response to burn trauma: Current understanding and therapies. *Lancet*, 2016, Vol. 388, pp. 1417-1426.
14. Qi X.X., Yang Y.X., Sun B.W. Early changes of chemotactic function of peripheral blood neutrophil of patients with severe burns and the influence factor. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 2020, Vol. 36, no. 3, pp. 204-209.
15. Sun X., Belkin N., Feinberg M.W. Endothelial microRNAs and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2013, Vol. 15, no. 12, 372. doi: 10.1007/s11883-013-0372-2.

**Авторы:**

**Пивоварова Л.П.** – д.м.н., руководитель отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

**Осипова И.В.** – к.м.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

**Арискина О.Б.** – к.б.н., научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

**Орлова О.В.** – к.м.н., старший научный сотрудник отдела термических поражений ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», ассистент кафедры общей хирургии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

**Authors:**

**Pivovarova L.P.**, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory Diagnostics Department, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Osipova I.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory Diagnostics Department, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Ariskina O.B.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory Diagnostics Department, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Orlova O.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Thermal Injuries, I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine; Department Assistant, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

# ГИПОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ВЫСОКОГОРЬЯ И ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЗАКОН

Галиев Р.С.<sup>1</sup>, Дробленков А.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ЧОУВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Исследования проводились на 24 половозрелых морских свинках-самцах. На них моделировалась аллергическая реакция немедленного типа – активная кожная анафилаксия. Животные были разделены на 2 группы: контрольную и опытную. Контрольная группа находилась на протяжении эксперимента в условиях долины, а опытная – в течение 45 суток в условиях высокогорья (пер. Анзоб, 3375 м над ур.м.). Все животные на 30-е сутки эксперимента были сенсибилизированы лошадиной сывороткой. На 12-е сутки сенсибилизации забиралась кровь для анализов, а на 15-е сутки вызывалась аллергическая реакция. Выявлено, что в условиях высокогорья сила реакции была в 1,5 раза ниже, чем в контрольной группе. Кроме того, в высокогорье у животных содержание в крови Т-, В-лимфоцитов и IgE-антител было ниже, чем в контрольной, а фагоцитарно активных нейтрофилов, а также суммарный эффект фагоцитоза, наоборот, был выше. Видимо, этому способствует гипоксия, так как известно, что в энергетическом обмене лимфоцитов преобладают аэробные процессы, а у нейтрофилов анаэробные. Аллергические заболевания имеют три стадии развития. Иммунологическая стадия является первой и основной. От нее во многом зависит аллергическая перестройка организма. В чем же сущность перестройки в условиях высокогорья? Мы предполагаем, что наряду с биогенетическим законом Геккеля–Мюллера существует и иммуногенетический закон: «Последовательность активации звеньев в системе защиты организма – повторение филогенеза, то есть включение последующего звена в системе защиты происходит по тем же принципам, по которым в процессе эволюции происходило усложнение и совершенствование этой системы. А именно по принципу несостоительности предыдущего звена в системе защиты полностью элиминировать антиген». Условно можно считать, что первым защитным барьером от антигенов являются наиболее эволюционно древние структуры – наружные покровы и слизистая оболочка, вторым – факторы неспецифической защиты организма (фагоцитоз, лизоцим, интерферон и др.), третьим – клеточный иммунитет (Т-эффекторы и др.), четвертым – гуморальный иммунитет и пятый защитным барьером является эволюционно поздняя защита – аллергическая реакция, пусковым механизмом которой служат IgE-антитела. Исходя из вышеизложенного, становится очевидным, что причиной снижения аллергической реакции (пятого барьера) у животных опытной группы, явились адаптивные изменения в защитных механиз-

**Адрес для переписки:**

Галиев Ринат Султанович  
ЧОУВО «Санкт-Петербургский медико-социальный  
институт»  
194356, Россия, Санкт-Петербург,  
ул. Заречная, 45, кв. 586.  
Тел.: 8 (908) 404-69-40.  
E-mail: galiev59@yandex.ru

**Address for correspondence:**

Rinat S. Galiev  
St. Petersburg Medical and Social Institute  
45 Zarechnaya St, Apt 586  
St. Petersburg  
194356 Russian Federation  
Phone: +7 (908) 404-69-40.  
E-mail: galiev59@yandex.ru

**Образец цитирования:**

Р.С. Галиев, А.В. Дробленков «Гипосенсибилизирующий  
эффект высокогорья и иммуногенетический закон»  
// Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2.  
С. 409-414. doi: 10.15789/1563-0625-HEO-2335

© Галиев Р.С., Дробленков А.В., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

R.S. Galiev, A.V. Droblenkov “Hypsensitizing effect of high  
altitude and immunogenetic law”, Medical Immunology  
(Russia)/Meditinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2,  
pp. 409-414.

doi: 10.15789/1563-0625-HEO-2335

© Galiev R.S., Droblenkov A.V., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-HEO-2335

мака организма, а именно в условиях высокогорья произошло повышение функциональной активности фагоцитов (второго барьера) и снижение активности лимфоцитов — клеток, ответственных за эволюционно более поздние барьеры защиты.

**Ключевые слова:** аллергическая реакция, высокогорье, адаптивный иммунитет, фагоцитоз нейтрофилов, сенсибилизация, иммуногенетический закон, барьер защиты

## HYPOSENSITIZING EFFECT OF HIGH ALTITUDE AND IMMUNOGENETIC LAW

Galiev R.S.<sup>a</sup>, Drobilenkov A.V.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> St. Petersburg Medical and Social Institute, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The studies were carried out in 24 sexually mature male guinea pigs. They were used as model of immediate-type allergic reaction (active cutaneous anaphylaxis). The animals were divided in 2 groups: control and experimental. The control group was housed in the mountain valley during the study, and the experimental group stayed for 45 days in high mountains (Anzob, 3375 m above sea level). On the day +30, all animals were sensitized with horse serum. On the 12<sup>th</sup> day of sensitization, blood was taken for analysis, and on the 15<sup>th</sup> day, an allergic reaction was provoked. We have revealed that, under high-altitude conditions, the severity of reaction was 1.5 times lower than in controls. Moreover, the animals kept in highlands exhibited lower contents of T and B lymphocytes, and IgE antibodies than in the control group. On the contrary, the numbers of phagocytically active neutrophils, as well as total effect of phagocytosis, proved to be higher in this group. This shift may be facilitated by hypoxia, since aerobic processes are known to prevail in the energy metabolism of lymphocytes, and anaerobic processes dominate in neutrophils. The allergic conditions are developed in three stages. Immunological stage is the first and main one, and allergic restructuring of the body immunity largely depends on it. What is the matter of reconstruction under the high-altitude conditions? We suggest, that, along with Haeckel—Müller biogenetic rule, there is also an immunogenetic law: “The activation sequence of events in the body’s defense system is a reproduction of phylogenesis, i.e., switching of subsequent link in defense system follows the evolutionary principles of complication and improvement. Namely, with respect to failing of previous link to completely eliminate the antigen in defense system”. One may conventionally consider that the first protective barrier against antigens is the most evolutionarily ancient structure, i.e., skin and mucous membrane; the second represents factors of nonspecific defense (phagocytosis, lysozyme, interferon, etc.); the third barrier is presented by cellular immunity (T effector cells, etc.), with humoral immunity serving as the fourth barrier. The fifth protective barrier provides evolutionarily late defense, i.e. allergic reaction, which is triggered by Ig E antibodies. On the mentioned basis, one may state that the decreased allergic reaction (the 5<sup>th</sup> barrier) in the animals from the experimental group was caused by adaptive changes in protective mechanisms of body. One may suggest that, under the high-altitude conditions an increase was observed in functional activity of phagocytes (2<sup>nd</sup> barrier), along with a decrease in activity of lymphocytes, i.e., cell populations responsible for the evolutionary later protective barriers.

**Keywords:** allergy, highlands, adaptive immunity, neutrophils, phagocytosis, immunogenetic law, protective barrier

### Введение

Мировая информация последних лет свидетельствует не только о широкой распространенности аллергических заболеваний, но и о неуклонной тенденции к росту. Причем в большинстве случаев аллергия протекает по немедленному типу [2, 9, 10, 12].

Одной из основных причин увеличения заболеваемости этой патологией являются условия жизни современного человека, которые изменяют реактивность организма. К этим условиям обычно относят: гиподинамию, загрязнение окружающей среды, широкое применение химических препаратов в быту и другие [4, 6].

ТАБЛИЦА 1. ИНТЕНСИВНОСТЬ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОГОРЬЯ,  $X \pm m$

TABLE 1. INTENSITY OF ALLERGIC REACTION UNDER HIGH ALTITUDE CONDITIONS,  $X \pm m$

Показатели Indicators	Сенсибилизованные животные Sensitized animals	
	Контроль Control n = 12	Опыт Experience n = 12
Интенсивность активной кожной анафилаксии, усл. ед. Intensity of active skin anaphylaxis, c. u.	22,3±1,7	15,3±2,1*

Примечание. \* – различия достоверны.

Note. \*, differences are significant.

**Целью работы** является обоснование гипосенсибилизирующего эффекта горного климата иммуногенетическим законом в эксперименте.

## Материалы и методы

Исследования были проведены на 24 пологородных морских свинках-самцах, массой тела 250-300 г. На них моделировалась аллергическая реакция немедленного типа – активная кожная анафилаксия (АКА) [1]. Животные были разделены на 2 группы: контрольную и опытную. Контрольная группа животных находилась на

протяжении эксперимента в условиях долины, а опытная – в течение 45 суток в условиях высокогорья (пер. Анзоб, 3375 м над ур. м.). Парциальное давление кислорода на такой высоте ниже на 32-48% (в зависимости от температуры воздуха), чем над уровнем моря, что достаточно для проявления гипоксии организма.

Все животные на 30-е сутки эксперимента были сенсибилизированы. Для этого животным обеих групп подкожно вводили по 0,1 мл раствора лошадиной сыворотки. До начала эксперимента и на 12-е сутки сенсибилизации из ушной

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ МОРСКИХ СВИНОК В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОГОРЬЯ,  $X \pm m$

TABLE 2. DYNAMICS OF ADAPTIVE IMMUNE INDICATORS IN SENSITIZED GUINE PIGS UNDER HIGH ALTITUDE CONDITIONS,  $X \pm m$

Показатели Indicators	Сенсибилизованные животные Sensitized animals	
	Контроль Control n = 12	Опыт Experience n = 12
Т-лимфоциты, % $\times 10^6/\text{л}$ T lymphocytes, % $\times 10^6/\text{L}$	55,5±2,1	51,2±2,8
	2,32±0,10	1,43±0,07*
В-лимфоциты, % $\times 10^6/\text{л}$ B lymphocytes, % $\times 10^6/\text{L}$	37,5±1,8	45,4±2,1
	1,55±0,08	1,24±0,07*
IgE-антитела, усл. ед. IgE antibodies, c. u.	25,4±2,1	14,7±1,1*

Примечание. \* – различия достоверны.

Note. \*, differences are significant.

краевой вены забиралась кровь для анализов, а на 15-е сутки вызывалась АКА.

Изучение состояния иммунитета проводилось определением содержания Т- и В-лимфоцитов в периферической крови, IgE-антител в сыворотке крови, фагоцитарной активности нейтрофилов (ФАН), среднего фагоцитарного индекса (СФИ), суммарного эффекта фагоцитоза (СЭФ), а также оценкой ферментативной активности нейтрофилов по НСТ-тесту [3, 13].

## Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в условиях высокогорья развивается аллергическая реакция у всех животных, причем менее выражено, чем в контрольной группе (табл. 1).

Из таблицы видно, что интенсивность АКА в опытной группе была ниже в 1,5 раза ( $p \leq 0,05$ ), чем в контрольной. Причиной, способствующей у опытных животных уменьшению силы аллергической реакции, по-видимому, являются адаптационные изменения в защитных механизмах организма, как в специфических, так и неспецифических факторах защиты.

Состояние некоторых показателей адаптивного иммунитета оценивали по содержанию в периферической крови Т- и В-лимфоцитов, а также IgE-антител в сыворотке крови (табл. 2).

Из таблицы видно, что относительные показатели содержания Т- и В-лимфоцитов достоверно не отличаются в опытной и контрольной группе. А абсолютные показатели имеют выраженную динамику в сторону снижения в опытной группе. Так, у сенсибилизованных в условиях высокогорья животных содержание в периферической крови Т-лимфоцитов в 1,62 ( $p \leq 0,05$ ), а В-лимфоцитов – в 1,25 раза ( $p \leq 0,05$ ) ниже, чем в условиях долины. Содержание IgE-антител у сенсибилизованных животных в условиях высокогорья также было ниже в 1,7 раза ( $p \leq 0,05$ ), чем в условиях равнины. Такая динамика является показателем снижения активности адаптивного иммунитета в условиях высокогорья. Видимо, этому способствует гипоксия. Известно, что в энергетическом обмене лимфоцитов преобладают аэробные процессы [11].

Состояние некоторых показателей врожденного иммунитета оценивали по показателям функциональной активности нейтрофилов (табл. 3).

Из таблицы видно, что относительное содержание фагоцитарно активных нейтрофилов при сенсибилизации в условиях высокогорья в 1,5 ( $p \leq 0,05$ ) раза выше, чем в контрольной группе. Фагоцитарный индекс практически не изменился. При сенсибилизации в условиях высокогорья СЭФ был выше в 1,9 раза ( $p \leq 0,05$ ), по сравне-

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ МОРСКИХ СВИНОК В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОГОРЬЯ,  $X \pm m$

TABLE 3. DYNAMICS OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN SENSITIZED GUINEA PIGS UNDER HIGH ALTITUDE CONDITIONS,  $X \pm m$

Показатели Indicators	Сенсибилизованные животные Sensitized animals	
	Контроль Control n = 12	Опыт Experience n = 12
ФАН, % PAN, %	47,6 $\pm$ 2,1	72,7 $\pm$ 2,7*
ФИ PI	6,3 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,4
СЭФ, $\times 10^6$ /л TER, $\times 10^6$ /L	8,9 $\pm$ 0,3	16,5 $\pm$ 0,7*
НСТ <sup>+</sup> клетки, % $\times 10^6$ /л NBT <sup>+</sup> cell, % $\times 10^6$ /L	81,0 $\pm$ 2,3 2,44 $\pm$ 0,06	73,8 $\pm$ 3,1 2,34 $\pm$ 0,09

Примечание. \* – различия достоверны.

Note. \*, differences are significant.

нию с показателем в долине. Видимо, такая динамика связана с тем, что в энергетическом обмене нейтрофилов преобладают анаэробные процессы [11]. Поэтому нейтрофилы в условиях гипоксии не только не теряют активности, а компенсируя снижение количества лимфоцитов, проявляют большую активность.

Из таблицы также видно, что относительные и абсолютные показатели НСТ-теста у сенсилизированных морских свинок обеих групп не отличаются.

Известно, что аллергические заболевания или реакции, независимо от условий, в которых они протекают, имеют три стадии развития: иммунологическую, патохимическую и патофизиологическую [8]. Нарушения в любой стадии могут привести к изменению силы аллергической реакции.

Иммунологическая стадия является первой и основной. От нее во многом зависит аллергическая перестройка организма. В чем же сущность этой перестройки? Мы предполагаем, что наряду с биогенетическим законом Геккеля–Мюллера существует и иммуногенетический закон: «Последовательность активации звеньев в системе защиты организма – повторение филогенеза, т. е. включение последующего звена в системе защиты происходит по тем же принципам, по которым в процессе эволюции происходило усложнение и совершенствование этой системы. А именно, по принципу несостоительности предыдущего звена в системе защиты полностью элиминировать антиген» [5]. Условно можно считать, что первым защитным барьером от антигенов являются наиболее эволюционно древние структуры – наружные покровы и слизистая оболочка, вторым – факторы неспецифической защиты организма (фагоцитоз, лизоцим, интерферон и др.), третьим – клеточный иммунитет (Т-эффекторы и др.), четвертым – гуморальный иммунитет (антитела, относящиеся к IgM, IgG, IgA) и пятым защитным барьером является эволюционно позд-

няя защита – аллергическая реакция, пусковым механизмом которой служат IgE-антитела. Исходя из вышеизложенного, становится очевидным, что причиной снижения аллергической реакции (пятого барьера) у животных опытной группы, явились адаптивные изменения в защитных механизмах организма. В частности, в условиях высокогорья произошло повышение функциональной активности фагоцитов (второго барьера), что способствовало, наряду с гипоксией, снижению лимфоцитов – клеток, ответственных за эволюционно более поздние барьеры защиты [5, 7].

Исходя из иммуногенетического закона можно предположить, что для снижения проявлений аллергической реакции, в том числе лечения аллергии, достаточно усилить любой барьер защиты, предшествующий аллергическому, пятому барьери.

## Заключение

Таким образом, результаты экспериментальных исследований показали, что сенсилизация в условиях высокогорья способствует развитию более слабой аллергической реакции немедленного типа, чем в условиях долины. Такая динамика определяется адаптационными перестройками защитных механизмов организма в условиях гипоксии (высокогорья), которые согласно иммуногенетическому закону, снижают или предотвращают из-за ненадобности развитие более поздних механизмов защиты, в том числе и аллергической. В частности, отмечается увеличение активности и содержания клеток неспецифической защиты – нейтрофилов и снижение количества и активности клеток специфической защиты – лимфоцитов.

На основе иммуногенетического закона можно обосновать не только гипосенсилизирующее действие горного климата, но и аллерген-специфическую иммунотерапию, сенсилизацию в условиях загрязненной окружающей среды и т.д.

## Список литературы / References

1. Адо А.Д. Вопросы общей патологии. М.: Медицина, 1985. 238 с. [Ado A.D. Questions of general pathology]. Moscow: Meditsina, 1985. 238 p.
2. Аллергология и иммунология: национальное руководство. Под ред. Хайтова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 656 с. [Allergology and immunology: national guidelines. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.]. Moscow: GEOTAR-Media, 2009. 656 p.
3. Бердиев Н.Б., Адамчук Л.В., Галиев Р.С. Точная формула для расчета среднего фагоцитарного индекса при учете стадий фагоцитоза // Здравоохранение Таджикистана, 1990. № 2. С. 82-83. [Berdiev N.B., Adamchuk L.V., Galiev R.S. The exact formula for calculating the average phagocytic index, taking into account the stages of phagocytosis. Zdravookhranenie Tadzhikistana = Health of Tajikistan, 1990, no. 2, pp. 82-83. (In Russ.)]
4. Галиев Р.С. К механизму профилактического действия физических нагрузок на аллергические заболевания // Иммунология, 2001. № 4. С. 72-74. [Galiev R.S. To the mechanism of the preventive effect of physical activity on allergic diseases. Immunologiya = Immunology, 2001, no. 4, pp. 72-74. (In Russ.)]

5. Галиев Р.С. Современное представление о механизме развития аллергии немедленного типа // Вестник Волжского университета им. В.Н. Татищева. Серия «Экология», 2002. № 2. С.143-148. [Galiev R.S. Modern idea of the mechanism of development of an allergy of immediate type. *Vestnik Volzhskogo universiteta im. V.N. Tatishcheva. Seriya "Ekologiya" = Bulletin of the V. Tatishchev Volga University. Series "Ecology"*, 2002, no. 2, pp. 143-148. (In Russ.)]
6. Галиев Р.С., Галиева С.А. Особенности развития аллергической реакции в условиях воздействия выхлопных газов автотранспорта различной интенсивности // Экология человека, 2007. № 10. С. 32-37. [Galiev R.S., Galieva S.A. Features of the development of an allergic reaction under conditions of exposure to vehicle exhaust gases of varying intensity. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2007, no. 10, pp. 32-37. (In Russ.)]
7. Гущин И.С. Аллергия – поздний продукт эволюции иммунной системы // Иммунология, 2019. Т. 40, № 2. С. 43–57. [Gushchin I.S. Allergy is a late product of the evolution of the immune system. *Immunologiya = Immunologiya*, 2019. Vol. 40, no. 2. pp. 43-57. (In Russ.)]
8. Гущин И.С. Немедленная гиперчувствительность (аллергические реакции 1 типа) // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 1993. № 2. С. 54-63. [Gushchin I.S. Immediate hypersensitivity (type 1 allergic reactions). *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 1993, no. 2, pp. 54-63. (In Russ.)]
9. Клинические рекомендации. Аллергология. Под ред. Хайтова Р.М., Ильиной Н.И. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 240 с. [Clinical recommendations. Allergology. Ed. Khaitov R.M., Ilyina N.I.]. Moscow: GEOTAR-Media, 2006. 240 p.
10. Колхир П.В. Доказательная аллергология-иммунология. М.: Практическая медицина, 2010. 528 с. [Kolkhir P.V. Evidence-based allergology-immunology]. Moscow: Prakticheskaya Meditsina, 2010. 528 p.
11. Маршак М.Е. Физиологическое значение углекислоты. М.: Медицина, 1969. 98 с. [Marshak M.E. Physiological significance of carbon dioxide]. Moscow: Meditsina, 1969. 98 p.
12. Паттерсон Р., Грэммер Л.К., Гринбергер П.А. Аллергические болезни: диагностика и лечение. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000. 768 с. [Patterson R., Grammer L.K., Grinberger P.A. Allergic diseases: diagnosis and treatment]. Moscow: GEOTAR-Media, 2000. 768 p.
13. Фримель Г. Иммунологические методы. М.: Медицина, 1987. С. 354-365. [Frimel G. Immunological methods]. Moscow: Meditsina, 1987, pp. 354-365.

---

**Авторы:**

**Галиев Р.С.** – д.б.н., профессор кафедры медико-биологических дисциплин ЧОУВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт», г. Санкт-Петербург, Россия

**Дробленков А.В.** – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой медико-биологических дисциплин ЧОУВО «Санкт-Петербургский медико-социальный институт»; ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия

Поступила 07.04.2021  
Принята к печати 04.01.2022

**Authors:**

**Galiev R.S., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Medical and Biological Disciplines, St. Petersburg Medical and Social Institute, St. Petersburg, Russian Federation**

**Drobilenkov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Medical and Biological Disciplines, St. Petersburg Medical and Social Institute; Leadinf Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation**

Received 07.04.2021  
Accepted 04.01.2022

# ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗЫ CD39 В РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТКАХ У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Радыгина Т.В.<sup>1</sup>, Сорокина Е.Г.<sup>1</sup>, Петричук С.В.<sup>1</sup>, Купцова Д.Г.<sup>1</sup>,  
Курбатова О.В.<sup>1</sup>, Потапов А.С.<sup>1, 2</sup>, Афанасьева С.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Резюме.** В связи с ростом заболеваемости и распространенности воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) поиск прогностических маркеров эффективности проводимой терапии является актуальной проблемой. Дисбаланс между Th17-лимфоцитами и регуляторными Т-клетками (Treg) является ключевым дефектом иммунной системы, приводящим к ВЗК. Внеклеточный АТФ, образующийся при повреждении тканей, обладает провоспалительным эффектом и способствует дифференцировке Th17-клеток. Эктонуклеотидаза CD39 катализирует дефосфорилирование АТФ до АМФ с последующим превращением в аденоzin под действием CD73. CD39 экспрессируется в разных типах клеток, в том числе в Treg. Цель – оценить функциональную активность CD39<sup>+</sup> в Treg у детей с ВЗК с помощью люциферин-люциферазного метода.

Обследовано 68 детей с ВЗК. Из них 28 детей были в состоянии ремиссии, 40 – в обострении. Оценку количества Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>), экспрессирующих CD39, проводили методом проточной цитометрии. Концентрацию АТФ в супернатантах и клетках определяли с помощью люциферин-люциферазного теста. Результаты представлены в виде медианы (Ме) и квартилей (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Достоверность различий между группами оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

Относительное количество CD39<sup>+</sup>Treg у пациентов в ремиссии ВЗК было достоверно выше, чем у пациентов в состоянии обострения. Снижение концентрации АТФ под действием CD39<sup>+</sup>Treg у пациентов с ВЗК происходило сразу при добавлении экзогенного АТФ. АТФ у пациентов в ремиссии снижалось на 44,5% (Ме 54,5 (41,5-65,9)), у пациентов в обострении – на 32,5% (Ме 67,5 (59,7-71,3)).

#### Адрес для переписки:

Радыгина Татьяна Вячеславовна  
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ  
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1.  
Тел: 8 (499) 134-13-98.  
Факс: 8 (499) 134-70-01.  
E-mail: radigina.tv@nczd.ru

#### Address for correspondence:

Tatiana V. Radygina  
National Medical Research Center of Children's Health  
2 bldg 1 Lomonosovsky Ave  
Moscow  
119991 Russian Federation  
Phone: +7 (499) 134-13-98.  
Fax: +7 (499) 134-70-01.  
E-mail: radigina.tv@nczd.ru

#### Образец цитирования:

Т.В. Радыгина, Е.Г. Сорокина, С.В. Петричук, Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова, А.С. Потапов, С.А. Афанасьева «Оценка функциональной активности эктонуклеотидазы CD39 в регуляторных Т-клетках у детей с воспалительными заболеваниями кишечника» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2. С. 415-422. doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2616

© Радыгина Т.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

#### For citation:

T.V. Radygina, E.G. Sorokina, S.V. Petrichuk, D.G. Kuptsova, O.V. Kurbatova, A.S. Potapov, S.A. Afanasyeva “Evaluation of the functional activity of CD39 ectonucleotidase in regulatory T cells in children with inflammatory bowel diseases”, Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 415-422.

doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2616

© Radygina T.V. et al., 2023

The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2616

При этом у пациентов в состоянии ремиссии снижение содержания АТФ через 5 минут реакции было достоверно выше, чем у пациентов в состоянии обострения ( $p = 0,01$ ), через 35 минут реакции достоверной разницы не выявлено. Показано, что образцы с меньшим количеством клеток и меньшей интенсивностью экспрессии CD39 в Treg имели большую активность эктонуклеотидазы CD39.

Для эффективного гидролиза АТФ, помимо количества CD39 в Treg, важна их функциональная активность. Оценка катализической активности CD39 в Treg у пациентов с ВЗК наиболее информативна в первые минуты после добавления экзогенной АТФ. У пациентов в состоянии ремиссии катализическая активность CD39 в Treg была выше, чем у пациентов в состоянии обострения.

*Ключевые слова:* Treg, CD39, гидролиз, АТФ, ВЗК, дети

## EVALUATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF CD39 ECTONUCLEOTIDASE IN REGULATORY T CELLS IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

**Radygina T.V.<sup>a</sup>, Sorokina E.G.<sup>a</sup>, Petrichuk S.V.<sup>a</sup>, Kuptsova D.G.<sup>a</sup>,  
Kurbatova O.V.<sup>a</sup>, Potapov A.S.<sup>a, b</sup>, Afanasyeva S.A.<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Abstract.** In connection with the increasing incidence and prevalence of inflammatory bowel disease (IBD), the search for prognostic markers of the effectiveness of therapy is an urgent problem. An imbalance between Th17 lymphocytes and regulatory T cells (Treg) is a major defect in the immune system leading to IBD. Extracellular ATP produced during tissue damage, rebound pro-inflammatory effects, and activates Th17 cell differentiation. Ectonucleotidase CD39 catalyzes the dephosphorylation of ATP to AMP, followed by conversion to adenosine by CD73. CD39 is expressed in various cell types, including Treg. Aim – evaluate the functional activity of CD39<sup>+</sup> in Treg in children with IBD using the luciferin-luciferase method.

68 children with IBD were examined. Of these, 28 children were in remission, 40 were in exacerbation. The number of Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>) expressing CD39 was estimated by flow cytometry. The ATP concentration in supernatants and cells was determined using the luciferin-luciferase test. Results are presented as median (Me) and quartiles (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>). The significance of differences between groups was assessed using the nonparametric Mann-Whitney U test.

The relative number of CD39<sup>+</sup>Treg in patients in remission of IBD was significantly higher than in patients in a state of exacerbation. A decrease in ATP concentration under the influence of CD39<sup>+</sup>Treg in patients with IBD occurred immediately upon the addition of exogenous ATP. ATP in patients in remission decreased by 44.5% (Me 54.5 (41.5-65.9)), in patients in exacerbation – by 32.5% (Me 67.5 (59.7-71.3)). At the same time, in patients in remission, the decrease in the ATP content after 5 minutes of the reaction was significantly higher than in patients in the state of exacerbation ( $p = 0.01$ ), after 30 minutes of the reaction, no significant difference was found. It was shown that samples with a smaller number of cells and a lower intensity of CD39 expression in Treg had a higher activity of CD39 ectonucleotidase.

For efficient ATP hydrolysis, in addition to the amount of CD39 in Treg, their functional activity is important. The assessment of the catalytic activity of CD39 in Treg in patients with IBD is most informative in the first minutes after the addition of exogenous ATP. In patients in remission, the catalytic activity of CD39 in Treg was higher than in patients in a state of exacerbation.

*Keywords:* Treg, CD39, ATP, hydrolysis, IBD, children

### Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) относятся к иммунопатологическим заболеваниям, характеризующимся прогресси-ю

ющим хроническим воспалительно-деструктивным поражением желудочно-кишечного тракта [1]. Основными формами ВЗК являются болезнь Крона (БК) и язвенный колит [11]. В современном понимании ВЗК возникают у

генетически предрасположенных людей при нарушении регуляции иммунного ответа, направленного против компонентов кишечной микрофлоры [11]. Поиск прогностических маркеров для оценки эффективности лечения ВЗК остается актуальной проблемой. Отмечено увеличение распространенности и заболеваемости ВЗК в России [2]. Точных данных о заболеваемости и распространенности ВЗК у детей в России нет, за исключением отдельных регионов [1].

Ключевым дефектом иммунной системы, приводящим к ВЗК, считается дисбаланс между Th17-лимфоцитами и Т-регуляторными клетками (Treg) [3, 9, 14]. Известно, что для дифференцировки Th17-лимфоцитов необходима внеклеточная аденоzinтрифосфорная кислота (АТФ), которая образуется из поврежденных клеток и относится к DAMPs сигналам (damage associated molecular patterns) [13]. При адекватном иммунном ответе внеклеточная АТФ может быть дефосфорилирована до аденоцина, обладающего противоспалительными свойствами. Эктонуклеотидаза CD39 (CD39 – ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, E-NTPDase1) катализирует превращение АТФ в аденоцинмонофосфат с последующим гидролизом с помощью эктонуклеотидазы CD73 (CD73 – ecto-5'-nucleotidase, Ecto5'NTase) до аденоцина [6]. Эктонуклеотидазы экспрессируются в различных популяциях лимфоцитов, в том числе в Treg и Th17-клетках [15]. Показано, что высокая экспрессия CD39 в циркулирующих Treg коррелирует с клинической и эндоскопической ремиссией у пациентов с ВЗК [7].

Работ по оценке ферментативной активности эктонуклеотидазы CD39 крайне мало, и они противоречивы. Например, у пациентов с аутоиммунным гепатитом было показано снижение активности эктонуклеотидазы CD39 в Treg [8]. В другой работе у пациентов с рассеянным ремитирующим склерозом наоборот было продемонстрировано увеличение активности CD39 вне зависимости от проводимой терапии [4].

Для определения ферментативной активности эктонуклеотидазы CD39 используют различные методы. Косвенная оценка активности CD39 после добавления к клеткам АТФ возможна по изменению концентрации свободного фосфата с использованием набора для колориметрического анализа Sensolyte® (AnaSpec, Seraing, Бельгия) [10]. Другой метод измерения катализической активности эктонуклеотидазы CD39 возможен по изменению концентрации не гидролизованного АТФ путем измерения частоты люминесцентных событий в системе обнаружения на основе люциферазы (ATP Lite Luminescence System, Perkin-Elmer) [8].

Целью настоящей работы было оценить функциональную активность CD39<sup>+</sup> в Treg у детей с ВЗК с помощью люциферин-люциферазного метода.

## Материалы и методы

Было проведено обследование 68 детей с ВЗК. На основании педиатрических индексов активности болезни PCDAI/PUCAI (значение индекса < 10 соответствовало состоянию ремиссии, > 10 – обострению) дети были разделены на группы: в состоянии обострения было 40 пациентов, в состоянии ремиссии – 28 пациентов.

Для определения активности CD39<sup>+</sup> в Treg из цельной венозной крови выделяли мононуклеарные лимфоциты (PBMC) после центрифугирования в градиенте плотности Histopaque – 1,077 г/см<sup>3</sup> (Sigma-Aldrich, США). Клетки PBMC окрашивали с помощью моноклональных антител: CD4-FITC (cat. A07750, Beckman Coulter, США), CD127-PE (cat. IM 10980U, Beckman Coulter, США), CD25-PC7 (cat. A52882, Beckman Coulter, США), CD39-APC-Cy7 (Clone A1, cat. RT2241130 Sony Biotechnology, США). Количество CD39<sup>+</sup>Treg клеток оценивали с помощью проточной цитометрии (Novocyte, ACEA Biosciences, США). Использовали тактику последовательного гейтинга для выделения Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>), экспрессирующих CD39. Сортировку PBMC для получения популяции Treg проводили с помощью Cell Sorter SH800S (Sony, Япония). Из каждого образца PBMC собирали по 100 тысяч клеток Treg в среду TexMACS GMP Medium (США), оптимальную для поддержания жизнеспособности Treg. После сортировки жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя 7-ADD, и она составляла не менее 98%. Далее клетки помещали в CO<sub>2</sub> инкубатор при 37 °C на сутки.

После 24 часов инкубации в суспензии клеток оценивали количество Treg, экспрессирующих CD39<sup>+</sup> и интенсивность его флюоресценции (F1) с помощью проточной цитометрии.

Для оценки гидролиза АТФ клетки центрифугировали при 300 G в течение 5 минут. Готовили 3 пробы суспензии клеток по 200 мкл каждой. Супернатант пробы 1 использовали для измерения фонового значения собственной АТФ клеток. К пробе 2 и 3 добавляли по 10 мкл 500 мкМ АТФ (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации 25 мкМ. Пробу 2 сразу после добавления АТФ центрифугировали при 300 G, при 4 °C, в течение 5 минут. Пробу 3 инкубировали в темноте на водяной бане при 37 °C, в течение 30 минут. Далее суспензию центрифугировали при 300 G, при 4 °C, в течение 5 минут. Супернатанты пробы 2 и 3 использовали в реакции.

Содержание АТФ определяли в супернатантах с помощью люциферин-люциферазы (Promega, США) в 0,1 М Tris acetate буфере при pH 7,75 [5]. Содержание АТФ в клетках определяли с помощью модифицированного люциферин-люциферазного теста [12]. Для этого к ним добавляли 2% трихлоруксусную кислоту / 2мМ ЭДТА с последующей нейтрализацией 3М KOH / 1,5М Tris acetate буфером [5].

Люминесценцию определяли с использованием многофункционального мультипланшетного считывателя Clariostar (BMG, Германия). Измерение проводили в пробах (110 мкл Tris acetate буфера + 50 мкл образца) сразу после добавления люциферин-люциферазы (40 мкл). Величину люминесценции соотносили с калибровочной кривой, сохраняющей линейность в диапазоне от 0,5 (500 нМ) до 50 мКМ АТФ. Активность CD39 АТФ-азы (%АТФ) определяли по разнице между пробой 1 и пробой 2, между пробой 1 и 3 и выражали в % к 1 точке, принимаемой за 100%.

Для анализа данных пациенты с ВЗК были разделены на группы по количеству CD39<sup>+</sup>Treg (1-я и 2-я группы) и интенсивности флюоресценции (3-я и 4-я группы) CD39 в Treg: 1-я группа – < 300 кл/мкл; 2 группа – > 800 кл/мкл; 3-я группа – флюоресценция (Fl в MFI – средняя интенсивность флюоресценции) в диапазоне от 2,3 до 4,6 MFI; 4-я группа – Fl в диапазоне от 6,85 до 7 MFI.

Исследование получило одобрение локально-го этического комитета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ (протокол № 6, 11.06.19 г). Перед исследованием было получено информированное согласие родителей в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft, США). Описательная статистика количественных признаков представлена в формате: медиана (нижние и верхние квартили) – Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Достоверность различий между группами оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

### Экспрессия CD39<sup>+</sup> в Treg при обострении и ремиссии ВЗК

Анализ количества Treg, экспрессирующих CD39, у пациентов с ВЗК в состоянии ремиссии и обострения показал достоверное снижение относительного количества CD39<sup>+</sup>Treg при обострении: Me 18,9 (10,9-36,5) при обострении против Me 34,8 (24,7-38,4) в ремиссии,  $p = 0,002$ . Полученные данные согласуются с данными Gibson D (2015) о корреляции экспрессии CD39 в циркулирующих Treg с клинической и эндоскопической ремиссией у пациентов с ВЗК [7]. Распределение пациентов по относительному количеству CD39<sup>+</sup>Treg в состоянии обострения и ремиссии показано на рисунке 1. Оказалось, что у большинства пациентов в ремиссии заболевания (87,5%) относительное количество CD39<sup>+</sup> в Treg было больше 20%. Распределение пациентов в обострении описывается кривой с двумя пиками. У 52% пациентов в состоянии обострения ВЗК содержание CD39<sup>+</sup> в Treg было более 20%, у 48% пациентов – менее 20% (рис. 1).

Можно предположить, что у пациентов в обострении с высоким количеством CD39<sup>+</sup>Treg сни-

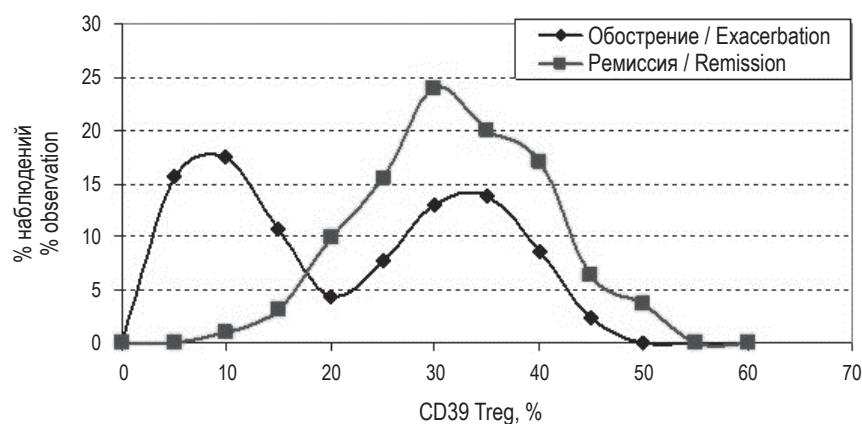


Рисунок 1. Относительное число клеток, экспрессирующих CD39 в Treg у пациентов в состоянии обострения и ремиссии ВЗК

Figure 1. Relative number of cells expressing CD39 in Treg in patients in IBD exacerbation and remission

жена активность эктонуклеотидазы CD39, как это было описано при аутоиммунном гепатите [4]. Таким образом, помимо количества CD39<sup>+</sup> в Treg важна и оценка их функциональной активности.

#### Измерение ферментативной активности CD39<sup>+</sup> в Treg у пациентов с ВЗК

Для оценки катализической активности эктонуклеотидазы CD39 было проведено исследование динамики снижения экзогенно добавленного АТФ к CD39<sup>+</sup>Treg. В клеточном осадке всех исследованных образцов АТФ определялась в следовых количествах – Мe 0,029 (0,021-0,031) мкМ.

Анализ динамики снижения концентрации экзогенно добавленной АТФ у пациентов с ВЗК показал, что в первые 5 минут реакции (2 точка на графике) АТФ падает с 25 мкМ до 15,3 (13,6-17,5) мкМ – на 39% от исходного уровня. Через 30 минут инкубации при 37 °C (3 точка) уровень АТФ продолжает снижаться и составляет 11,4 (9,2-12,6) мкМ, 54,4% от исходного уровня (рис. 2). Наши данные согласуются с исследованием Moncrieffe H о наличии АТФ-азной активности CD39<sup>+</sup> клеток из PBMC, детектируемой при комнатной температуре [10].

#### Оценка гидролиза АТФ у пациентов с ВЗК

Учитывая большой разброс показателей концентрации АТФ во 2 и 3 точке, был проведен анализ динамики снижения АТФ у пациентов в состоянии обострения и ремиссии.

Реакция гидролиза АТФ начинается сразу после добавления экзогенного АТФ. В состоянии ремиссии концентрация АТФ через 5 минут реакции падает на 44,5% (Мe 54,5 (41,5-65,9)), в то

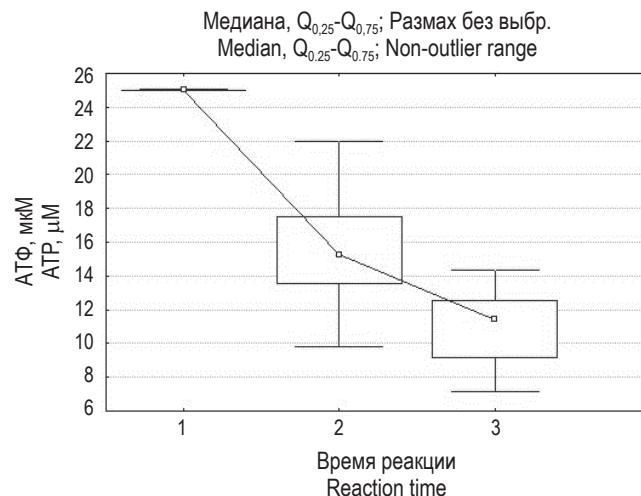


Рисунок 2. Динамика снижения АТФ у пациентов с ВЗК

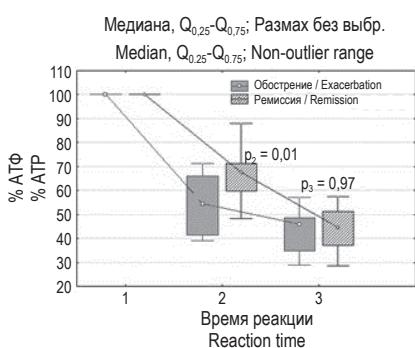
Примечание. По оси абсцисс: 1 – 0 минут (25 мкМ АТФ), 2 – 5 минут после добавления АТФ, 3 – 35 минут после добавления АТФ.

Figure 2. Dynamics of decrease ATP concentration in patients with IBD

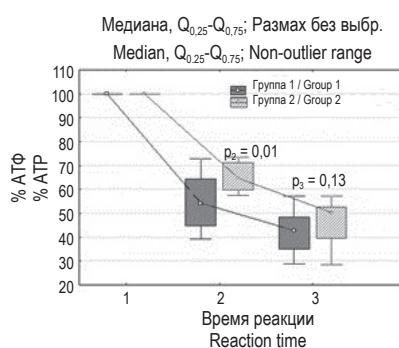
Note. Along abscissa axis: 1, 0 minutes; 2, 5 minutes after ATP addition; 3, 35 minutes after ATP addition.

время как у пациентов в обострении – на 32,5% (Мe 67,5 (59,7-71,3)). У пациентов в состоянии ремиссии снижение содержания АТФ во 2 точке было достоверно больше, чем у пациентов в состоянии обострения ( $p = 0,01$ , рис. 3А). Таким образом, можно предположить, что АТФ-азная активность CD39<sup>+</sup> в Treg выше у пациентов в ремиссии, чем у пациентов в обострении.

#### А (А)



#### Б (Б)



#### В (С)

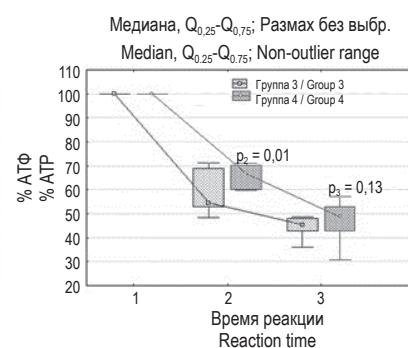


Рисунок 3. Динамика относительного уровня АТФ

Примечание. А – изменение уровня АТФ у пациентов в состоянии обострения и ремиссии. Б – изменение уровня АТФ в зависимости от количества CD39<sup>+</sup>Treg (1-я группа – < 300 кл/мкл; 2-я группа – > 800 кл/мкл). С – изменение уровня АТФ в зависимости от FI CD39<sup>+</sup>Treg.  $p_2$  – достоверность между группами пациентов во 2 точке,  $p_3$  – достоверность между группами пациентов в 3 точке.

Figure 3. Dynamics of the relative level of ATP

Note. (A) Change in the level of ATP in patients in a state of exacerbation and remission. (B) ATP level change depending on the amount of CD39<sup>+</sup>Treg (group 1 – < 300 cells/μl; group 2 – > 800 cells/μl). (C) ATP level change depending on FI CD39<sup>+</sup>Treg.  $p_2$ , significance between groups of patients at point 2;  $p_3$ , significance between groups of patients at point 3.

В 3 точке (после 30 мин инкубации при 37 °C) достоверной разницы между группами пациентов в состоянии обострения и ремиссии получено не было ( $p = 0,97$ ). Вероятно, активность фермента CD39 необходимо оценивать в первые минуты реакции.

Для оценки гидролиза АТФ в зависимости от количества клеток были проанализированы группы с низким и высоким содержанием CD39<sup>+</sup> в Treg: группа 1  $< 300$  кл/мкл (Ме – 108 (73-247)), группа 2  $> 800$  кл/мкл (Ме – 1228,65 (895-1738)) (рис. 2Б). Было получено, что в группе 1 через 5 минут после добавления АТФ (2 точка) наблюдалось достоверное увеличение ферментативной активности TregCD39<sup>+</sup> по сравнению с группой 2 (рис. 3Б). В 3-й точке через 30 минут после добавления АТФ достоверной разницы между группами обнаружено не было. Таким образом, образцы с меньшим количеством клеток имели большую активность эктонуклеотидазы CD39. Возможно, что увеличение количества клеток CD39<sup>+</sup> в Treg при обострении заболевания является компенсаторной реакцией на дисфункцию CD39, что согласуется с данными о снижение функциональной активности CD39 при аутоиммунном гепатите [8].

На следующем этапе работы была проанализирована зависимость снижения концентрации АТФ от интенсивности экспрессии CD39<sup>+</sup> в Treg (FL). В зависимости от интенсивности флюоресценции CD39<sup>+</sup> в Treg образцы были поделены на группы: группу 3 составили образцы с FL в диапазоне 2,3-4,6 MFI (Ме – 3,9 (3,87-4,25)), группу 4 – образцы с FL в диапазоне 6,85-7 MFI (Ме – 6,76 (6,41-6,9)).

Через 5 минут после добавления АТФ снижение концентрации АТФ в группе 3 было достоверно выше чем в группе 4 ( $p = 0,01$ , рис. 3С). При этом снижение концентрации в группе 3 было на 45,5%, а в группе 4 – на 33,3%. Таким образом, Treg с меньшей плотностью CD39 имели большую ферментативную активность во 2 точке. В 3

точке не было выявлено достоверных различий в ферментативной активности CD39 между группами. Вероятно, что для оценки эффективности гидролиза эктонуклеотидазы CD39 важно учитывать как количество клеток с экспрессией CD39, так и плотность экспрессии рецептора CD39<sup>+</sup>.

## Заключение

Использование люциферин-люциферазного метода на ограниченной выборке пациентов показало возможность оценки катализической активности CD39<sup>+</sup> в Treg по снижению концентрации экзогенной АТФ в образцах РВМС.

Показано, что реакция гидролиза начиналась в первые минуты после добавления экзогенной АТФ. Инкубация при 37 °C в течение 30 минут приводила к менее существенному снижению концентрации АТФ в образцах. Вероятно, для обеспечения эффективного противовоспалительного ответа важна скорость гидролиза АТФ и своевременная его утилизация. Таким образом, оценка катализической активности CD39 в Treg у пациентов с ВЗК наиболее информативна в первые минуты после добавления экзогенной АТФ.

Пациенты в состоянии ремиссии ВЗК имели большую активность CD39<sup>+</sup> в Treg по сравнению с пациентами в обострении заболевания. Увеличение количества клеток с экспрессией эктонуклеотидазы CD39<sup>+</sup> в Treg у части пациентов в состоянии обострения ВЗК может быть связано с их функциональной недостаточностью, что подтверждается нашими результатами: в образцах с большим количеством CD39<sup>+</sup> в Treg наблюдалась меньшая активность эктонуклеотидазы CD39. Таким образом, повышение количества CD39<sup>+</sup> в Treg может являться компенсаторным механизмом.

Целесообразны дальнейшие исследования по оценке кинетики гидролиза АТФ в большей выборке пациентов.

## Список литературы / References

1. Горелов А.В., Каннер Е.В. Воспалительные заболевания кишечника у детей: особенности течения и терапии // Медицинский совет, 2018. № 2. С. 140-145. [Gorelov A.V., Kanner E.V. Inflammatory bowel diseases in children: peculiarities of the disease Course and therapy. Meditsinskij sovet = Medical Council, 2018, no. 2, pp. 140-145. (In Russ.)]
2. Организация медицинской помощи пациентам с воспалительными заболеваниями кишечника в РФ в 2015-2021 гг.: информационный материал рабочей группы Экспертного совета по здравоохранению Комитета Совета Федерации по социальной политике //Медицинские технологии. Оценка и выбор, 2021 № 4. С. 9-15. [Healthcare for patients with inflammatory bowel disease in Russian Federation in 2015-2021: information from the Healthcare Expert Advisory Board of the Social Policy Committee of the Federation Council. Meditsinskie tehnologii. Otsenka i vybor = Medical Technologies. Assessment and Choice, 2021, no. 4, pp. 9-15. (In Russ.)]
3. Петричук С.В., Мирошкина Л.В., Семикина Е.Л., Топтыгина А.П., Потапов А.С., Цимбалова Е.Г., Радыгина Т.В. Показатели популяционного состава лимфоцитов как предикторы эффективности терапии ингибитором TNF $\alpha$  у детей с воспалительными заболеваниями кишечника // Медицинская иммунология

- гия, 2018. Т. 20, № 5. С. 721-730. [Petrichuk S.V., Miroshkina L.V., Semikina E.L., Toptygina A.P., Potapov A.S., Tsimbalova E.G., Radygina T.V. Indicators of the lymphocyte subsets as efficiency predictors of therapy with inhibitors of TNF $\alpha$  in children with inflammatory bowel diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 721-730. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-721-730.
4. Álvarez-Sánchez N., Cruz-Chamorro I., Díaz-Sánchez M., Lardone P.J., Guerrero J.M., Carrillo-Vico A. Peripheral CD39-expressing T regulatory cells are increased and associated with relapsing-remitting multiple sclerosis in relapsing patients. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, 2302. doi: 10.1038/s41598-019-38897-w.
5. Budd S.L., Nicholls D.G. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, 1996, Vol. 67, no. 6, pp. 2282-2291.
6. Di Virgilio F., Sarti A.C., Silva R.C. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2020, Vol. 318, no. 5, pp. 832-835.
7. Gibson D.J., Elliott L., McDermott E., Tosetto M., Keegan D., Byrne K., Martin S.T., Rispens T., Cullen G., Mulcahy H.E., Cheifetz A.S., Moss A.C., Robson S.C., Dohert G.A., Ryan E.J. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2015, Vol. 21, pp. 2806-2814.
8. Grant C.R., Liberal R., Holder B.S., Cardone J., Ma Y., Robso S.C., Mieli-Vergani G., Vergani D., Longhi M.S. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2014, Vol. 59, no. 3, pp. 1007-1015.
9. Guo J., Wang L.-Y., Wu J., Xu L.F., Sun M. The JAK2 inhibitor AG490 regulates the Treg/Th17 balance and alleviates DSS-induced intestinal damage in IBD rats. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, 2020, Vol. 47, no. 8, pp. 1374-1381.
10. Moncrieffe H., Nistala K., Kamhieh Y., Evans J., Eddaoudi A., Eaton S., Wedderburn L.R. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 1, pp. 134-143.
11. Negi S., Saini S., Tandel N., Sahu K., Mishr R., Tyagi R.K. Translating Treg therapy for inflammatory bowel disease in humanized mice. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 8, 1847. doi: 10.3390/cells10081847.
12. Sorokina E.G., Reutov V.P., Senilova Y.E., Khodorov B.I., Pinelis V.G. Changes in ATP content in cerebellar granule cells during hyperstimulation of glutamate receptors: possible role of NO and nitrite ions. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2007, Vol. 143, no. 4, pp. 442-445.
13. Vuerich M., Harshe R.P., Robson S.C., Longhi M.S. Dysregulation of adenosinergic signaling in systemic and organ-specific autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 3, 528. doi: 10.3390/ijms20030528.
14. Yan J.B., Luo M.M., Chen Z.Y., He B.H. The function and role of the Th17/Treg cell balance in Inflammatory bowel disease. *J. Immunol. Res.*, 2020, 8813558. doi: 10.1155/2020/8813558.
15. Zeng J., Ning Z., Wang Y., Xiong H. Implications of CD39 in immune-related diseases. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 89, Pt A, 107055. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107055.

**Авторы:**

**Радыгина Т.В.** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Сорокина Е.Г.** – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Петричук С.В.** – д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии лабораторного отдела НИИ педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Купцова Д.Г.** – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Radygina T.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Sorokina E.G.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Neurobiology and States of Brain Development, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Petrichuk S.V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Kuptsova D.G.**, Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Курбатова О.В.** – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Потапов А.С.** – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории научных основ детской гастроэнтерологии и гепатологии, заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Афанасьева С.А.** – лаборант-исследователь лаборатории нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Поступила 24.11.2022

Принята к печати 20.02.2023

**Kurbatova O.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

**Potapov A.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Scientific Foundations of Pediatric Gastroenterology and Hepatology, Head of Gastroenterology Department with Hepatology Group, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

**Afanasyeva S.A.**, Laboratory Assistant, Laboratory of Neurobiology and States of Brain Development, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Received 24.11.2022

Accepted 20.02.2023

# ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

**С 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.**

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

## Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «**Материалы и методы**».

## Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

## Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

## Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

### Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 $\beta$  на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64-69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 $\beta$  in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

### Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer]. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.

### Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

## Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3-5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, кДа и т.д.), регламентированного международными правилами.

### Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присыпается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

#### Размеры иллюстраций:

- максимальная высота – 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца – 82 мм, для 2 столбцов – 170 мм

**Таблицы.** Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (\*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (\*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

**Рисунки (графики и фотографии).** В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенд должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 дп при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

### Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

### Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

**А.** Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнале материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.

- Б.** Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В.** Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
- 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
    - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
    - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
  - Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
  - Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученыe степени, ученыe звания, должности.
  - Полное название статьи, направляемой в редакцию.
  - Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
  - Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
  - Дата отправления работы.
- 2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)
- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
  - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученоe звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
  - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
  - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
  - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
  - адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем – не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть – каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx., rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть – каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы <a href="http://www.e-library.ru">www.e-library.ru</a>

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

**Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи:  
Каталог «УРАЛ-ПРЕСС» – индекс 42311.  
Подписка на электронную версию журнала на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**

# АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абидов М.Т. ....	287	Ерешченко А.А. ....	367	Мовчан Л.В. ....	309	Прокофьев В.Ф. ....	331
Абрамова З.И. ....	233	Ермакова О.В. ....	331	Мосейкин И.А. ....	377	Проксура А.В. ....	357
Арискина О.Б. ....	403	Есина Т.И. ....	395	Мохонова Е.В. ....	339	Радыгина Т.В. ....	415
Архипов С.А. ....	357	Зафранская М.М. ....	309	Муслимов С.А. ....	301	Сенников С.В. ....	253, 271
Аутеншлюс А.И. ....	357	Ибрагимов Б.Р. ....	233	Мягкова М.А. ....	377	Скибо Ю.В. ....	233
Афанасьева С.А. ....	415	Кадушкин А.Г. ....	309	Назаров К.В. ....	253	Сорокина Е.Г. ....	415
Афанасьев С.А. ....	301	Караулов А.В. ....	271	Неумоина М.В. ....	339	Студеникина А.А. ....	357
<b>Бейкин Я.Б. ....</b>	<b>349</b>	Климов В.В. ....	319	Неумоина Н.В. ....	339	Сысоева Г.М. ....	395
Березовская К.В. ....	319	Кондратьева Д.С. ....	301	Никитина А.А. ....	319	Таганович А.Д. ....	309
Боброва З.В. ....	377	Коненков В.И. ....	331	Новиков В.В. ....	339	Трошина Т.А. ....	339
Булавинцева Т.С. ....	287	Кошкарова Н.С. ....	319	Новиков Д.В. ....	339	Трунов А.Н. ....	331
Вараксин Н.А. ....	357	Крылов А.С. ....	377	Новиков П.С. ....	319	Худякова М.И. ....	319
Вязовая Е.А. ....	387	Кузнецова М.С. ....	271	Орлова Е.А. ....	377	Цыпленкова Е.С. ....	387
Галиев Р.С. ....	409	Купцова Д.Г. ....	415	Орлова О.В. ....	403	Черевко Н.А. ....	319
Гамалей С.Г. ....	395	Курбатова О.В. ....	415	Осипова И.В. ....	403	Черных В.В. ....	331
Гареев Е.М. ....	301	Лагерева Ю.Г. ....	349	Перфилова К.М. ....	339	Шевченко А.В. ....	331
Гильмиярова Ф.Н. ....	367	Лапин В.А. ....	339	Петричук С.В. ....	415	Шевченко Ю.А. ....	253
Гусякова О.А. ....	367	Лебедева А.И. ....	301	Петроченко С.Н. ....	377	Шику Хироши. ....	271
Даниленко Е.Д. ....	387, 395	Лямин А.В. ....	367	Пивоварова Л.П. ....	403	Шман Т.В. ....	309
Данилова И.Г. ....	287	Мелентьев Д.А. ....	339	Пичугова С.В. ....	349	Шутова И.В. ....	339
Денисов А.А. ....	319	Мигачева Н.Б. ....	367	Попов С.В. ....	301	Юшков Б.Г. ....	287
Дробленков А.В. ....	409	Михайлова Е.С. ....	357	Потапов А.С. ....	415		

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптационный ресурс .....	378	естественные антитела .....	378	системная красная волчанка .....	340
адаптивный иммунитет .....	410	желудочно-кишечный фенотип...	320	тяжелая ожоговая травма .....	403
адоптивная Т-клеточная терапия ..	272	зимозан .....	396	фагоцитоз нейтрофилов .....	410
азитромицин .....	310	иммуногенетический закон .....	410	фенотипы РАС .....	320
аллергическая реакция .....	410	иммунотерапия солидных		фето-материнская толерантность..	254
аллогенный биоматериал .....	302	опухолей .....	272	физиологические условия .....	288
аллоксановый диабет .....	288	иммуноферментный анализ .....	378	функции нейтрофилов .....	403
антиген-презентирующие клетки ..	388	ингибитор фиброза .....	302	хемокиновые рецепторы .....	310
антитела .....	368	инсулин-синтезирующая система..	288	хемотаксис .....	310
АТФ .....	416	инфекционный фенотип .....	320	ХОБЛ .....	310
автоантитела .....	340	ишемия .....	302	хронический гастрит .....	340
автоиммунитет .....	234	корь .....	368	цитокинотерапия .....	272
автоиммунные заболевания .....	340	макрофаги .....	288, 396	цитокины .....	350, 358
автоиммунный тиреоидит .....	340	медицинские работники .....	368	эритроидные клетки .....	254
автофагия .....	234	метаболическая активность .....	396	эякулят .....	350
барьер защиты .....	410	метастазирование .....	358	В-лимфоциты .....	388
беременность .....	254	миокард .....	302	Beclin-1 .....	234
бесплодие .....	350	мыши .....	388, 396	BiTE-антитела .....	272
будесонид .....	310	нейтрофилы .....	396	CAR-T-клетки .....	272
вакцинальная неудача .....	368	орфанин .....	378	CCL5 .....	310
вакцинация .....	368	первичная открытоугольная		CD39 .....	416
варикоцеле .....	350	глаукома .....	332	checkpoint-ингибиторы .....	272
ВЗК .....	416	переутомление в спорте .....	378	CXCL10 .....	310
воспаление .....	234	подростки .....	350	<i>Helicobacter pylori</i> .....	340
высокогорье .....	410	полиморфизм .....	332	Ki-67 .....	358
гены ингибиторов матриксных		полуаллоргенный плод .....	254	LC3 .....	234
металлопротеиназ .....	332	предикторы .....	368	LC3-ассоциированный фагоцитоз ..	234
гены матриксных		пролиферация .....	358	NK-клетки .....	310
металлопротеиназ .....	332	протеины .....	358	PolyI:PolyC .....	388
гидролиз .....	416	рак молочной железы .....	358	Т-лимфоциты .....	272
гранулоцитарно-макрофагальный		расстройства аутистического		TCR-T-клетки .....	272
колониестимулирующий фактор ..	396	спектра .....	320	Treg .....	416
дendритные клетки .....	388	ревматоидный артрит .....	340	Vps34 .....	234
дермато-респираторный фенотип ..	320	селезенка .....	388	β-эндорфин .....	378
дети .....	416	сенсибилизация .....	410		
дсРНК .....	388	сепсис .....	403		

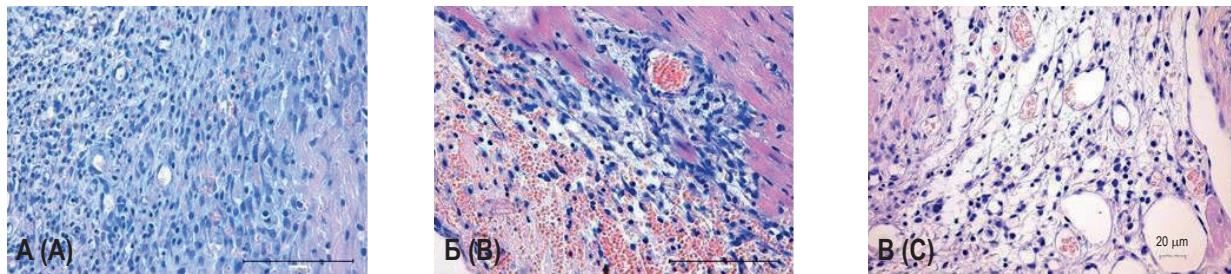


Рисунок 1. Перииинфарктная зона миокарда

Примечание. А – грануляционная ткань с высокой клеточной плотностью в контрольной группе (14 суток). Б – инфильтрация ДБМ макрофагами в I опытной группе (7 суток). В – рыхлая волокнистая соединительная ткань во II опытной группе (14 суток). Увел.  $\times 400$ . Окраска гематоксилином и зозином.

Figure 1. Periinfarction zone of the myocardium

Note. (A) granulation tissue with high cell density in the control group (14 days). (B) infiltration of DBM by macrophages in the I experimental group (7 days). (C) loose fibrous connective tissue in the II experimental group (14 days). Magn.  $\times 400$ . Stained with hematoxylin and eosin.

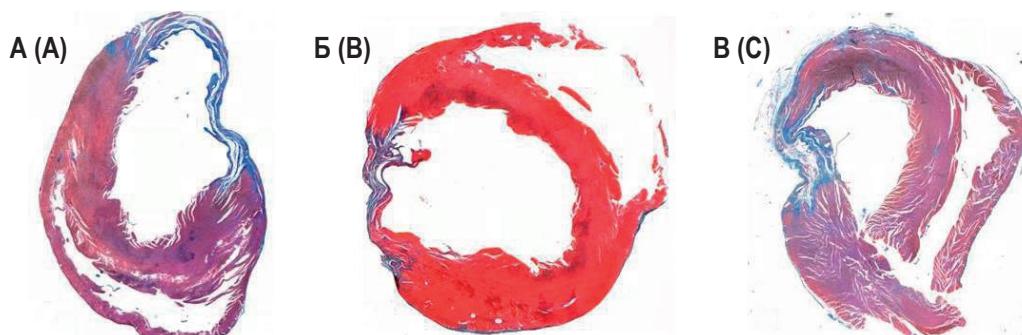


Рисунок 2. Поперечный срез миокарда

Примечание. А – контрольная группа. Б – I опытная группа. В – II опытная группа. Увел.  $\times 40$ . Окраска по Маллори.

Figure 2. Cross-section of the myocardium

Note. (A) control group. (B) I experimental group. (C) II experimental group. Magn.  $\times 40$ . Color by Mallory.

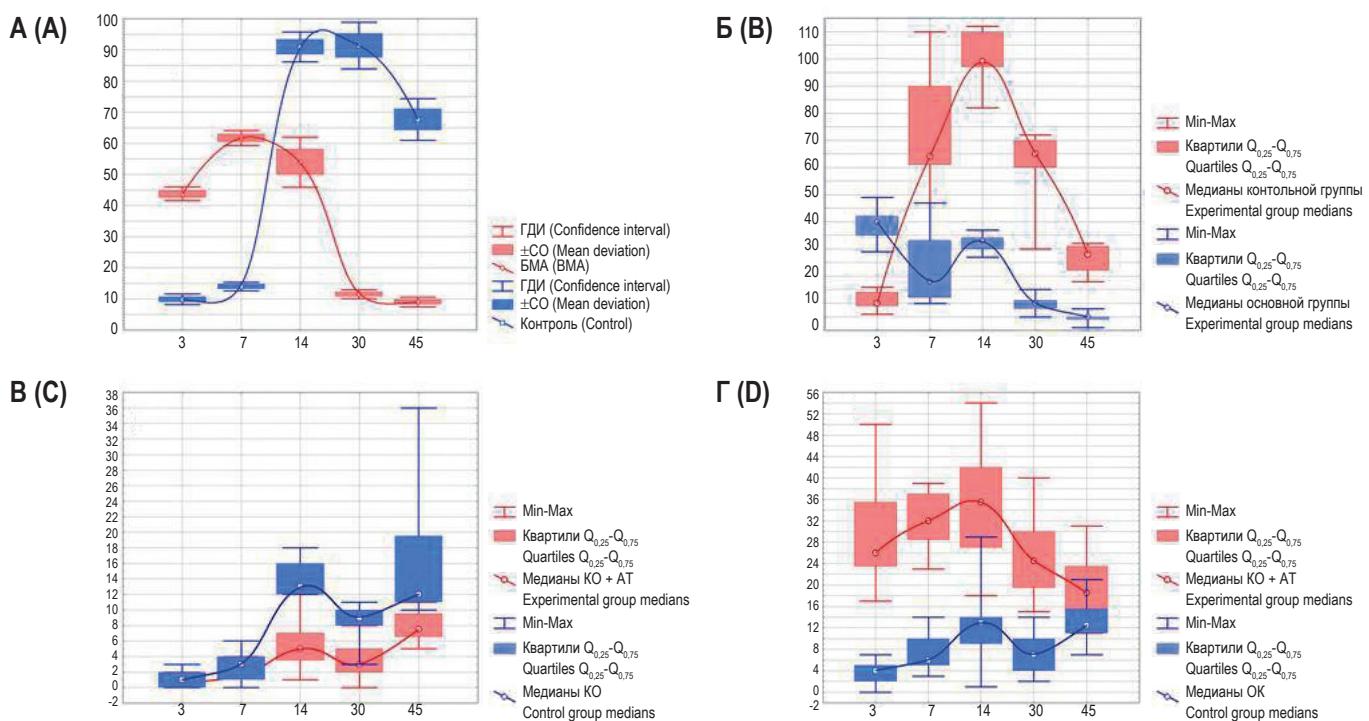


Рисунок 4. Реакция фиброгенных факторов в миокарде в остром периоде

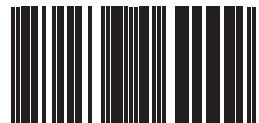
Примечание. А – bFGF-1<sup>+</sup> клетки в I опытной группе (красный график) и в контрольной (синий график). Б – TGFb-1<sup>+</sup> клетки в I опытной группе (синий график) и в контрольной (красный график). В – MMP-9<sup>+</sup> клетки в контрольной группе (синий график) и в I опытной группе (красный график). Г – TIMP-2<sup>+</sup> клетки в контрольной группе (синий график) и в I опытной группе (красный график). По оси абсцисс – дни, по оси ординат – количество.

Figure 4. Reaction of fibrogenic factors in the myocardium in the acute period

Note. (A) bFGF-1<sup>+</sup> cells in the experimental group I (red graph) and in the control group (blue graph). (B) TGFb-1<sup>+</sup> cells in the experimental group I (blue graph) and in the control group (red graph). (C) MMP-9<sup>+</sup> cells in the control group (blue graph) and in the experimental group I (red graph). (D) TIMP-2<sup>+</sup> cells in the control group (blue graph) and in the experimental group I (red graph). On the abscissa axis – days, on the ordinate axis – quantity.

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:  
УРАЛ-ПРЕСС – 42311**

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >