

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

Том 26, № 4. С. 641-874

2024

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

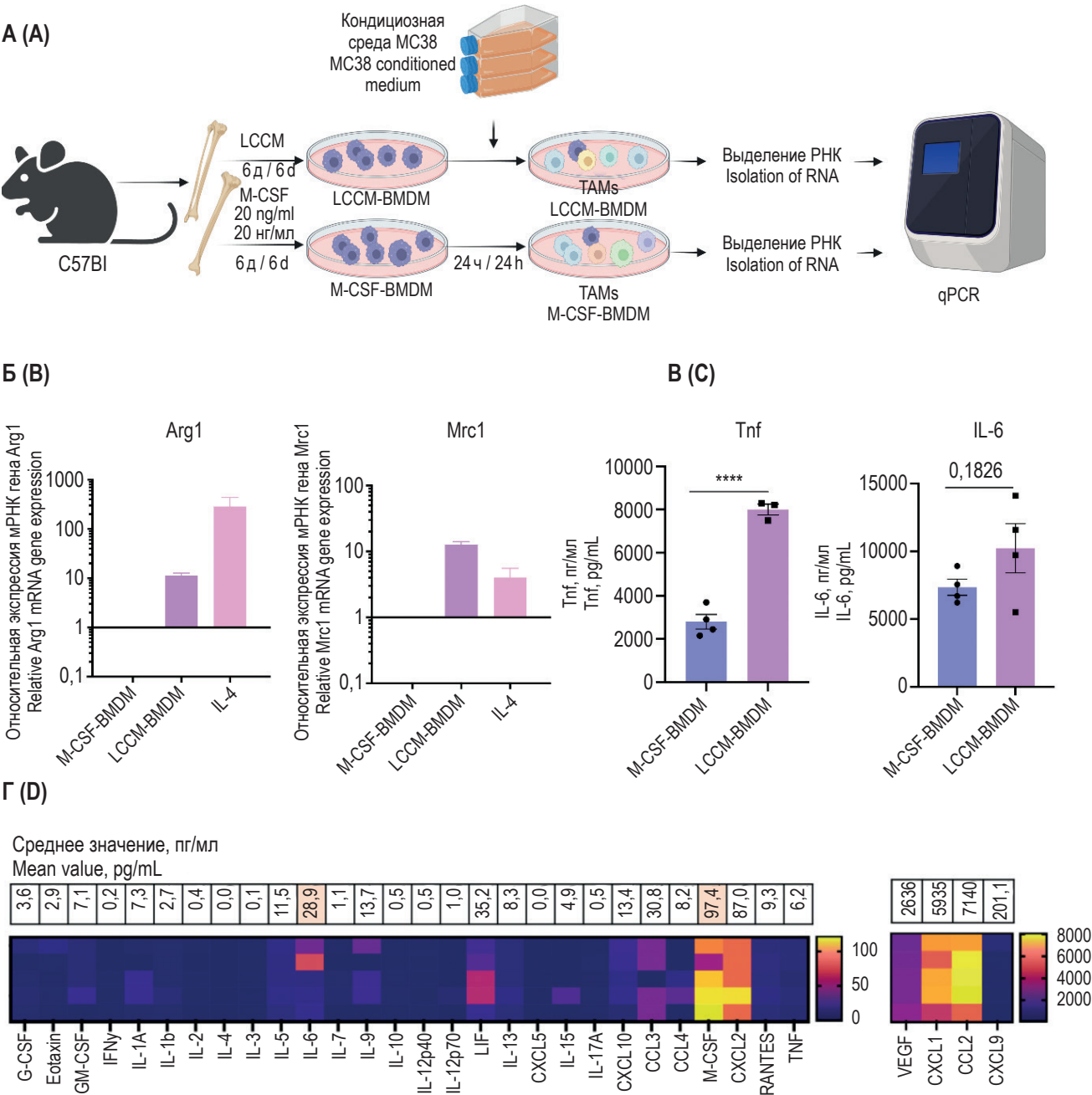


Рисунок 1. Характеристика получения TAMs *in vitro*

Примечание. А – схема эксперимента. Б – изменения относительной экспрессии мРНК *Arg1* и *Mrc1* в LCCM-BMDM по сравнению с M-CSF-BMDM после дифференцировки, перед ассоциацией с опухолевой средой. Данные qPCR. Уровень экспрессии был нормализован относительно уровня *Actb*. Контроль: M-CSF-BMDM. В качестве положительного контроля M2 поляризации к макрофагам добавляли IL-4. В – уровень секреции IL-6 и TNF в M-CSF-BMDM и LCCM-BMDM после дифференцировки, пг/мл. Г – содержание цитокинов в LCCM, по верхней оси – средние значения в пг/мл, по нижней – соответствующие цитокины. Статистический анализ проведен при помощи t-критерия Стьюдента, **** – $p < 0,0001$.

Figure 1. Characterization of the production of TAMs *in vitro*

Note. A, scheme of the experiment. B, changes in relative mRNA expression of *Arg1* and *Mrc1* in LCCM-BMDM compared to M-CSF-BMDM after differentiation, prior to association with tumor environment. qPCR data. Expression levels were normalized relative to *Actb* levels. Control: M-CSF-BMDM. IL-4 was added to macrophages as a positive control for M2 polarization. C, IL-6 and TNF secretion levels in M-CSF-BMDM and LCCM-BMDM after differentiation, pg/mL. D, cytokine content in LCCM, upper axis means values in pg/mL, lower axis corresponding cytokines.

****, $p < 0.0001$ (Student's t-test, was used).

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

июль-август

2024, том 26

№ 4

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 Арег 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@spb.aaci.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.mimmun.ru; 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

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 21.06.2024 г. Формат 60 х 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 29,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 047

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 биопрепаратов 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 Флуминенсе, 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 «Шаритэ», 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

July-August

2024, volume 26

No. 4

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, Nord-Western 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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, 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.mimmun.ru; 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, Malyyi ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 21.06.2024. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 29.25. Circulation 2000 copies. (1st 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.

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 Lasunskaja – 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 Planning, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

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

СОДЕРЖАНИЕ

Краткие сообщения

Макимова А.А., Шевела Е.Я., Сахо Л.В.

РАСТВОРИМЫЕ ФАКТОРЫ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА СПОСОБНЫ ИНГИБИРОВАТЬ TGF- β -ИНДУЦИРОВАННУЮ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКИХ..... 649

Костенко В.В., Бойко А.А., Гречишина М.В., Овсяникова О.В., Сапожников А.М.

МЕМБРАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ HSP70 НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ОБЪЕМНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В 3D-КУЛЬТУРАХ 657

Наровлянский А.Н., Полосков В.В., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Цветнов А.В., Богданов Е.Ю., Федякина И.Т.,
Коваленко А.Л., Ершов Ф.И.

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ TLR/RLR-РЕЦЕПТОРОВ В МАКРОФАГ-ПОДОБНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ
ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ АКРИДОНУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ 663

Носарева О.Л., Степовая Е.А.

РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ И РЕАЛИЗАЦИИ КЛЕТочНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ
КРОВИ В УСЛОВИЯХ БЛОКИРОВАНИЯ СИНТЕЗА ГЛУТАТИОНА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ 671

Галямина А.Г., Коваленко И.Л., Смагин Д.А., Попова Н.А.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВОГО ОТВЕТА В ГИПОТАЛАМУСЕ ЖИВОТНЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ
ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА: ДАННЫЕ RNA-seq 677

Горшкова Е.А., Пуртова С.К., Дворянинова Е.М., Высоких М.Ю., Недоспасов С.А.

ОСОБЕННОСТИ ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ ГОЛОГО ЗЕМЛЕКОПА..... 685

Пухальская Т.В., Юракова Т.Р., Михайловская В.С., Богданова Д.А., Демидов О.Н.

СРАВНЕНИЕ *IN VITRO* МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЕНЕСЦЕНТНЫХ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ 693

Уварова А.Н., Устюгова А.С., Жеремян Э.А., Стасевич Е.М., Корнеев К.В., Купраш Д.В.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ IL-10 И TGF- β
В КЛЕТочНЫХ МОДЕЛЯХ В-ЛИМФОЦИТОВ..... 701

Нёма М.А., Муркина Р.Г., Минеев В.Н.

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА TAS2R38 В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ..... 707

Лукьянова С.О., Артемьева О.В., Насеева Е.Д., Ганковская Л.В.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА TLR2 Arg753Gln С УРОВНЕМ ЕГО ЭКСПРЕССИИ У ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ
С СИНДРОМОМ СТАРЧЕСКОЙ АСТЕНИИ 711

Павлова И.Е., Кузьмич Е.В., Хамаганова Е.Г., Рудик Д.В., Кузьминова Е.П., Абдрахимова А.Р.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ТИПИРОВАНИЯ HLA-ГЕНОВ МЕТОДОМ NGS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
РАЗЛИЧНЫХ ПЛАТФОРМ..... 717

Смольникова М.В., Афоничева К.В., Марченко И.В., Терещенко С.Ю.

АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА ФИКОЛИНА (FCN2) У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ
РАЗЛИЧНОЙ ТЯЖЕСТИ 727

Фаттахова Г.В., Макарова А.О., Коновалова М.В., Каширина Е.И., Коцарева О.Д., Окара П.С., Матушевская Е.В., Свищевская Е.В.

ТРАФИК IgE И IgG В-КЛЕТОК В НИЗКОДОЗОВОЙ МОДЕЛИ АЛЛЕРГИИ НА Gal d1, 2, 3..... 733

Бережанский П.В., Тувшинбаяр Б., Сангидорж Б., Ускова Т.Р., Татаурщикова Н.С.

АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ И ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА В МОНГОЛИИ 741

Глебездина Н.С.

РОЛЬ CD20⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА 749

Эльгухари А.С., Лазарева Н.М., Баранова О.П., Кудрявцев И.В., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолян Арег А. ДИСБАЛАНС МЕЖДУ Т-ХЕЛПЕРАМИ 17-ГО ТИПА И Т-РЕГУЛЯТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ САРКОИДОЗА	755
Герасимова Е.В., Кириллова И.Г., Шалыгина М.В., Попкова Т.В. СУБКЛИНИЧЕСКИЙ АТЕРОСКЛЕРОЗ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ МОНОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ	765
Герасимова Е.В., Богатырева А.И., Попкова Т.В., Герасимова Д.А. ЧИСЛО КОПИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В МОНОЦИТАХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ	771
Давыдова Н.В., Зиновьева Н.В., Зимин С.Б., Швеиц О.В., Галеева Е.В., Конопляникова Ю.Е., Молочникова О.В., Петрова Ю.В., Гильдеева Г.Н., Козлов И.Г. ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗВИТИИ АУТОИММУННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ДИ ДЖОРДЖИ	777
Лазаренко Л.Л., Шелипова А.А., Сесь Т.П. БОЛЕЗНЬ ГУЖЕРО-ХЕЙЛИ-ХЕЙЛИ: ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ, СОПРЯЖЕННОГО С ДИСРЕГУЛЯЦИЕЙ ИММУННОГО ОТВЕТА	787
Абакумова Т.В., Долгова Д.Р., Пирмамедова С.С., Антонеева И.И., Генинг С.О., Иванченко И.А., Генинг Т.П. IL-8 И WISP1 В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО АСЦИТА ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ	795
Баторов Е.В., Аристова Т.А., Денисова В.В., Ушакова Г.Ю. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА ЭКСПРЕССИЮ ИНГИБИТОРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-ЛИМФОЦИТАМИ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ	801
Аникаева М.С., Толстоуцкая Т.О., Сергеев В.Г. ОСОБЕННОСТИ ГИСТОТОПОГРАФИИ ЛИМФОЦИТОВ И КЛЕТОК СТРОМЫ С ВЫСОКИМ УРОВНЕМ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ПАЦИЕНТОВ С В-ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ	807
Стасевич Е.М., Симонова А.В., Уварова А.Н., Жеремян Э.А., Корнеев К.В., Богомолова Э.А., Демин Д.Э. АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ЭНХАНСЕРНОЙ РНК LINC00910, КОРРЕЛИРУЮЩЕЙ С ИММУНОРЕГУЛЯТОРОМ STAT3, В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ	813
Заботина Т.Н., Борунова А.А., Черткова А.И., Шоуа И.Б., Кадагидзе З.Г. ОЦЕНКА ЛИМФОИДНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ (TILs) ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ	819
Богданова Д.А., Шиндяпин В.В., Колосова Е.Д., Пухальская Т.В., Будкина Н.А., Шатилова А.А., Демидов О.Н. УВЕЛИЧЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО IL-4 КАК ОТВЕТ НА ТЕРАПИЮ ВЕНЕТОКЛАКСОМ В КСЕНОГРАФТНЫХ МОДЕЛЯХ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА	827
Златник Е.Ю., Сагакянц А.Б., Владимиров Л.Ю., Тишина А.В. РАЗЛИЧИЯ ЦИТОКИНОВОГО СОСТАВА СЫВОРОТКИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ МУТАЦИИ В ГЕНЕ RAS И ОТВЕТА НА ЛЕЧЕНИЕ ТАРГЕТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ АНТИТЕЛ	835
Луговая А.В., Калинина Н.М., Иванов А.М., Никитин Ю.В., Сухина И.А., Митрейкин В.Ф., Забиров С.Ш., Кирилкин Г.Э. ДИНАМИКА БИОМАРКЕРОВ АУТОФАГИИ И НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА	843
Кудряшов С.И., Карзакова Л.М. ИДЕНТИФИКАЦИЯ HLA-ГАПЛОТИПОВ В КАЧЕСТВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОВ С РЕФРАКТЕРНЫМ НЕФРОТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ	853
Безрукова Е.В., Варюшина Е.А., Афлитонов М.А., Артюшкин С.А., Симбирцев А.С. КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО IFNα-2b И IFNα-2b В СОЧЕТАНИИ С γ-D-ГЛУТАМИЛ-L-ТРИПТОФАНОМ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНСУСИТЕ С СОПУТСТВУЮЩЕЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ	861
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ	873
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	874

CONTENTS

Short communications

Maksimova A.A., Shevela E.Ya., Sakhno L.V.

SOLUBLE HUMAN MACROPHAGE FACTORS ARE ABLE TO INHIBIT TGF- β -INDUCED DIFFERENTIATION OF LUNG FIBROBLASTS649

Kostenko V.V., Boyko A.A., Grechikhina M.V., Ovsyanikova O.V., Sapozhnikov A.M.

EXPRESSION OF MEMBRANE HSP70 ON TUMOR CELLS DURING CULTIVATION IN 3D CULTURES657

Narovlyansky A.N., Poloskov V.V., Mezentseva M.V., Suetina I.A., Tsvetnov A.V., Bogdanov E.Yu., Fedyakina I.T., Kovalenko A.L., Ershov F.I.

TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF TLR/RLR RECEPTOR GENES IN MACROPHAGE-LIKE CELLS UNDER THE INFLUENCE OF DRUGS BASED ON ACRIDONEACETIC ACID663

Nosareva O.L., Stepovaya E.A.

ROLE OF OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN THE REGULATION AND REALIZATION OF CELL DEATH OF BLOOD LYMPHOCYTES UNDER THE CONDITIONS OF BLOCKING GLUTATHIONE SYNTHESIS UNDER OXIDATIVE STRESS.....671

Galyamina A.G., Kovalenko I.L., Smagin D.A., Popova N.A.

CHANGES IN THE CYTOKINE RESPONSE IN THE HYPOTHALAMUS OF ANIMALS UNDER THE INFLUENCE OF CHRONIC SOCIAL STRESS: RNA-seq DATA.....677

Gorshkova E.A., Purtova S.K., Dvorianinova E.M., Vyssokikh M.Yu., Nedospasov S.A.

NAKED MOLE-RAT MACROPHAGE POLARIZATION.....685

Pukhalskaia T.V., Yurakova T.R., Mikhailovskaya V.S., Bogdanova D.A., Demidov O.N.

COMPARISON OF *IN VITRO* MODELS FOR THE STUDY OF SENESCENCE OF MACROPHAGES ASSOCIATED WITH A TUMOR693

Uvarova A.N., Ustiugova A.S., Zheremyan E.A., Stasevich E.M., Korneev K.V., Kuprash D.V.

FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE GENE PROMOTERS OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES TGF- β AND IL-10 IN B LYMPHOCYTE CELL MODELS701

Nyoma M.A., Murkina R.G., Mineev V.N.

ROLE OF TAS2R38 POLYMORPHISM IN RESPIRATORY DISEASES PATHOGENESIS707

Lukyanova S.O., Artemieva O.V., Nasaeva E.D., Gankovskaya L.V.

ASSOCIATION OF *TLR2* Arg753Gln GENE POLYMORPHISM WITH ITS EXPRESSION LEVEL IN NONAGENARIANS WITH FRAILTY711

Pavlova I.E., Kuzmich E.V., Khamaganova E.G., Rudik D.V., Kuzminova E.P., Abdrakhimova A.R.

COMPARATIVE ANALYSES OF THE RESULTS OF HLA GENES TYPING BY NGS METHOD USING DIFFERENT PLATFORMS717

Smolnikova M.V., Afonicheva K.V., Marchenko I.V., Tereshchenko S.Yu.

ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION OF FICOLIN GENE POLYMORPHISMS (*FCN2*) IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMAS OF VARIOUS SEVERITY727

Fattakhova G.V., Makarova A.O., Kononova M.V., Kotsareva O.D., Kashirina E.I., Okara P.S., Matushevskaya E.V., Svirshchevskaya E.V.

IgE AND IgG B CELL TRAFFIC IN A LOW-DOSE Gal d1, 2, 3 ALLERGY MODEL733

Berezhansky P.V., Tuvshinbayar B., Sangidorzh B., Uskova T.R., Tataurshchikova N.S.

ANALYSIS OF THE PREVALENCE AND EXPERIENCE OF TREATMENT OF ALLERGIC DISEASES OF THE RESPIRATORY TRACT IN MONGOLIA741

Glebezdina N.S.

ROLE OF CD20⁺T LYMPHOCYTES IN THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS749

Elgouhari A.S., Lazareva N.M., Baranova O.P., Kudryavtsev I.V., Ses T.P., Ilkovich M.M., Totolian Areg A.

DYSREGULATION OF TH17 AND REGULATORY T CELLS IN CHRONIC PULMONARY SARCOIDOSIS: A POTENTIAL BIOMARKER FOR DISEASE MANAGEMENT 755

Gerasimova E.V., Kirillova I.G., Shalygina M.V., Popkova T.V.

PRO-INFLAMMATORY ACTIVATION OF MONOCYTES IN PATIENTS WITH IMMUNOINFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES 765

Gerasimova E.V., Bogatyreva A.I., Popkova T.V., Gerasimova D.A.

MITOCHONDRIAL DNA COPY NUMBER IN MONOCYTES AND PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS 771

Davydova N.V., Zinovieva N.V., Zimin S.B., Shvez O.V., Galeeva E.V., Konoplyannikova Yu.E., Molochnikova O.V., Petrova Yu.V., Gildeeva G.N., Kozlov I.G.

PROGNOSTIC CHANGES IN LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS DURING THE DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNE COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH DIGEORGE SYNDROME 777

Lazarenko L.L., Shelipova A.A., Ses T.P.

GOUGEROT-HAILEY-HAILEY DISEASE: A CASE STUDY ASSOCIATED WITH PROVEN DYSREGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE 787

Abakumova T.V., Dolgova D.R., Pirmamedova S.S., Antoneeva I.I., Gening S.O., Ivanchenko I.A., Gening T.P.

IL-8 AND WISP1 IN THE MOLECULAR CHARACTERISTICS OF MALIGNANT ASCITES IN OVARIAN CANCER 795

Batorov E.V., Aristova T.A., Denisova V.V., Ushakova G.Yu.

EVALUATION OF GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR EFFECT ON THE EXPRESSION OF INHIBITORY RECEPTORS BY T CELLS IN MULTIPLE MYELOMA 801

Anikaeva M.S., Tolstolutsкая T.O., Sergeev V.G.

HISTOTOPOGRAPHY OF HIGHLY GLYCOSYLATED LYMPHOCYTES AND STROMAL CELLS IN LYMPH NODES OF PATIENTS WITH B-CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA 807

Stasevich E.M., Simonova A.V., Uvarova A.N., Zheremyan E.A., Korneev K.V., Bogomolova E.A., Demin D.E.

ANALYSIS OF ENHANCER RNA LINC00910 EXPRESSION CORRELATING WITH THE IMMUNOREGULATOR STAT3 IN GLIOBLASTOMA CELLS 813

Zabotina T.N., Borunova A.A., Chertkova A.I., Shoua I.B., Kadagidze Z.G.

ANALYSIS OF THE LYMPHOID TUMOR MICROENVIRONMENT (TILs) IN BREAST CANCER BY FLOW CYTOMETRY 819

Bogdanova D.A., Shindyapin V.V., Kolosova E.D., Pukhalskaya T.V., Budkina N.A., Shatilova A.A., Demidov O.N.

INCREASE IN SERUM IL-4 IN RESPONSE TO VENETOCLAX THERAPY IN XENOGRAFT MODELS OF ACUTE MYELOID LEUKAEMIA 827

Zlatnik E.Yu., Sagakyants A.B., Vladimirova L.Yu., Tishina A.V.

DIFFERENCE IN SERUM CYTOKINES BETWEEN METASTATIC COLORECTAL CANCER PATIENTS WITH MUTANT AND WILD TYPE RAS IN RESPONSE TO TARGETED TREATMENT WITH MONOCLONAL ANTIBODIES 835

Lugovaya A.V., Kalinina N.M., Ivanov A.M., Nikitin Yu.V., Sukhina I.A., Mitreikin V.P., Zabiroy S.Sh., Kirilkin G.E.

THE DYNAMICS OF BIOMARKERS OF AUTOPHAGY AND NEUROINFLAMMATION IN THE ACUTE PERIOD OF ATHEROTHROMBOTIC ISCHEMIC STROKE 843

Kudryashov S.I., Karzakova L.M.

IDENTIFICATION OF HLA HAPLOTYPES AS GENETIC MARKERS OF GLOMERULONEPHRITIS WITH REFRACTORY NEPHROTIC SYNDROME 853

Bezrukova E.V., Varyushina E.A., Afritonov M.A., Artyushkin S.A., Simbirtsev A.S.

CLINICAL EFFICACY AND MECHANISM-OF-ACTION OF RECOMBINANT IFN α -2b, AND IFN α -2b IN COMBINATION WITH γ -D-GLUTAMYL-L-TRYPTOPHAN, IN CHRONIC POLYPOUS RHINOSINUSITIS WITH COMORBID BRONCHIAL ASTHMA 861

AUTHOR INDEX 873

SUBJECT INDEX 874

РАСТВОРИМЫЕ ФАКТОРЫ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА СПОСОБНЫ ИНГИБИРОВАТЬ TGF- β -ИНДУЦИРОВАННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ФИБРОБЛАСТОВ ЛЕГКИХ

Максимова А.А., Шевела Е.Я., Сахно Л.В.

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

Резюме. Макрофаги являются ключевыми клетками-регуляторами фиброгенеза и благодаря своей пластичности и гетерогенности способны оказывать как про-, так и антифиброгенное действие. В некоторых работах был продемонстрирован антифиброгенный потенциал макрофагов в отношении фибробластов дермы, однако влияние макрофагов на функции фибробластов легких остается неисследованным. Таким образом, целью данного исследования являлось изучение влияния кондиционных сред макрофагов человека, дифференцированных M-CSF/GM-CSF и далее поляризованных дексаметазоном/неполяризованных на TGF- β -индуцированную дифференцировку фибробластов легких. Макрофаги генерировали из моноцитов периферической крови условно здоровых доноров в присутствии M-CSF или GM-CSF в течение 7 дней. На 5-й день добавляли дексаметазон с целью получения поляризованных макрофагов M-M(Dex) и GM-M(Dex), которые сравнивали с непользованными M-M0 и GM-M0, к которым не добавляли дексаметазон. Далее собирали кондиционную среду макрофагов указанных подтипов, которую тестировали по способности ингибировать дифференцировку фибробластов легких (клеточная линия HLF210). Для этого к культурам фибробластов одномоментно добавляли TGF- β (индуцирующий фактор дифференцировки) и кондиционную среду макрофагов. Дифференцировку оценивали по уровню экспрессии маркера миофибробластов α -гладкомышечного актина (α -SMA) и продукции белка внеклеточного матрикса — коллагена I типа. Анализ α -SMA был выполнен при помощи проточной цитометрии. Содержание коллагена I типа определяли иммуноферментным методом. Оценку экспрессии α -SMA проводили с использованием 3D-культур фибробластов, поскольку полученные нами данные демонстрируют, что при стандартном культивировании происходит спонтанная активация фибробластов, тогда как в 3D-культурах количество α -SMA-позитивных клеток значительно меньше, что свидетельствует о более физиологичном росте клеток. Кондиционные среды дексаметазон-поляризованных макрофагов, независимо от дифференцировочного стимула, не влияли значимо на экспрессию α -SMA, а также уровень продукции коллагена I типа клетками HLF210. Напротив, растворимые факторы M-M0 оказывали выраженный

Адрес для переписки:

Максимова Александра Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
E-mail: parkinson.dses@gmail.com

Address for correspondence:

Aleksandra A. Maksimova
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 236-03-29.
E-mail: parkinson.dses@gmail.com

Образец цитирования:

А.А. Максимова, Е.Я. Шевела, Л.В. Сахно
«Растворимые факторы макрофагов человека
способны ингибировать TGF- β -индуцированную
дифференцировку фибробластов легких»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4.
С. 649-656. doi: 10.15789/1563-0625-SHM-16666
© Максимова А.А. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Maksimova, E.Ya. Shevela, L.V. Sakhno "Soluble
human macrophage factors are able to inhibit TGF- β -induced
differentiation of lung fibroblasts", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4,
pp. 649-656.
doi: 10.15789/1563-0625-SHM-16666
© Maksimova A.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-SHM-16666

ингибирующий эффект, приводя к снижению количества фибробластов, экспрессирующих маркер миофибробластов, а также к снижению содержания коллагена I типа в исследуемых культурах фибробластов. При этом GM-M0 не обладали таковым эффектом и, подобно поляризованным макрофагам, не ингибировали дифференцировку фибробластов легких. В целом, полученные результаты свидетельствуют о возможном антифиброгенном потенциале M-M0 макрофагов. При этом отсутствие такового эффекта в GM-M0 макрофагах свидетельствует о важном вкладе дифференцировочного фактора в формирование антифиброгенного фенотипа макрофагов.

Ключевые слова: макрофаги, фибробласты, кондиционные среды, антифиброгенная активность, коллаген, α -гладкомышечный актин

SOLUBLE HUMAN MACROPHAGE FACTORS ARE ABLE TO INHIBIT TGF- β -INDUCED DIFFERENTIATION OF LUNG FIBROBLASTS

Maksimova A.A., Shevela E.Ya., Sakhno L.V.

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

Abstract. Macrophages are key regulatory cells of fibrogenesis. They can have pro- or antifibrotic activity due to their plasticity and heterogeneity. Some studies have shown the antifibrotic effect of macrophages on dermal fibroblasts, but the effect of macrophages on the lung fibroblast functions remains unexplored. Therefore, the purpose of this study was to examine the influence of conditioned media of human macrophage differentiated by M-CSF/GM-CSF and further dexamethasone polarized/unpolarized on the TGF- β -induced lung fibroblast differentiation. Macrophages were derived from peripheral blood monocytes of healthy donors. Monocytes were differentiated by M-CSF or GM-CSF for 7 days. On day 5, dexamethasone was added to generation of polarized macrophages M-M(Dex) and GM-M(Dex). Polarized macrophages were compared with non-polarized M-M0 and GM-M0, to which dexamethasone was not added. Next, the conditioned medium of these macrophage subtypes was collected and tested for inhibition the lung fibroblast differentiation (HLF210 cell line). To do this, TGF- β (inducing differentiation factor) and conditioned macrophage medium were added to fibroblast cultures. Effectiveness of differentiation was estimated by the expression of the myofibroblast marker, α -smooth muscle actin (α -SMA), and the production of extracellular matrix protein, collagen I. The expression of α -SMA was determined using flow cytometry. The concentration of collagen I was measured by ELISA. Since our data indicates that spontaneous activation of fibroblasts occurs during standard cultivation, the α -SMA expression was investigated in 3D culture of fibroblasts. Notably, the content of α -SMA-positive cells in 3D cultures was significantly reduced, indicating more physiological growth cells. Regardless of the differentiation stimulus, the conditioned media of dexamethasone-polarized macrophages do not affect the level of collagen I production or the α -SMA expression. On the contrary, M-M0 showed a strong inhibitory effect that reduced the amount of collagen I in the fibroblast cultures and the expression of marker myofibroblasts by fibroblasts. Interesting, GM-M0 had no such effect and did not prevent lung fibroblast differentiation like polarized cells. Taken together, the findings suggest that M-M0 macrophages may have antifibrotic properties. Furthermore, the lack of this effect in GM-M0 macrophages indicates that the differentiation factor plays a significant role in the development of the antifibrotic macrophage phenotype.

Keywords: macrophages, fibroblasts, conditioned media, antifibrotic activity, collagen, α -smooth actin

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 23-25-00349, <https://rscf.ru/project/23-25-00349>.

Введение

Легочный фиброз представляет собой полиэтиологическую патологию, характеризующуюся разрастанием соединительной ткани в легких.

Долгое время считалось, что фиброз необратим, но некоторые эксперименты *in vivo* и известные случаи регрессии фиброза легких у людей [3, 4, 8] доказывают, что это не так. Тем не менее эффективного лекарства, которое могло бы помочь обратить процесс вспять, на данный момент не существует, а известные антифибротические пре-

параты, такие как пирфенидон и нинтеданиб, замедляют прогрессирование фиброза, а не способствуют его разрешению. Поэтому поиск терапевтических методов, которые позволили бы предотвратить развитие фиброза и восстановить нормальную структуру легочной ткани, является актуальным. Определенные надежды связывают с развитием клеточной терапии, направленной на перепрограммирование макрофагов или использование макрофагов с антифиброгенными свойствами [11].

Макрофаги являются гетерогенной и высокопластичной популяцией клеток. В рамках концепции влияния на процесс воспаления выделяют М1- и М2-макрофаги с провоспалительными и противовоспалительными свойствами соответственно. Кроме того, в настоящий момент известно, что подмножества М1- и М2-макрофагов гетерогенны и в зависимости от стимулов, которые формируют функциональный фенотип макрофагов, могут проявлять различную активность. Так, например, в отношении фибротического процесса М2-макрофаги, поляризованные IL-4 (так называемые М2а) и/или IL-13, обладают профиброгенным действием, стимулируя активность фибробластов кожи, тогда как М2-макрофаги, поляризованные IL-10 (М2с), проявляют антифиброгенные свойства [10]. Однако влияние макрофагов человека на дифференцировку легочных фибробластов остается неизученным.

Данное исследование нацелено на изучение влияния кондиционных сред макрофагов человека на способность фибробластов легких активироваться под влиянием профиброгенных стимулов, что *in vitro* модулирует раннюю стадию формирования фиброза. Миофибробласты, образующиеся из фибробластов в результате их дифференцировки, являются ключевыми клетками в фиброзном процессе [1]. Они характеризуются активной продукцией внеклеточного матрикса (ВКМ), в первую очередь — коллагена, экспрессией α -гладкомышечного актина (α -SMA) и виментина, а также способностью к сократимости [1]. Основным фактором, индуцирующим дифференцировку фибробластов в миофибробласты, является TGF- β [7]. Таким образом, для того, чтобы оценить способность макрофагов ингибировать дифференцировку фибробластов, в культуры фибробластов, наряду с TGF- β , добавляли кондиционные среды различно активированных макрофагов.

Согласно полученным нами ранее данным, макрофаги, поляризованные дексаметазоном M(Dex), характеризуются низкой TGF- β -продуцирующей активностью, что в совокупности с активной продукцией MMP и низким уровнем TIMP-1, а также минимальным влиянием на

дифференцировку и коллаген-продуцирующую активность фибробластов дермы, может указывать на их антифиброгенный потенциал. Кроме того, в некоторых исследованиях было показано, что неполяризованные макрофаги (M0) также могут обладать антифиброгенными свойствами [2, 14]. Таким образом, данное исследование было сосредоточено на макрофагах человека, дифференцированных в присутствии M-CSF и GM-CSF, и далее поляризованных дексаметазоном/неполяризованных, как клетках с потенциальной антифиброгенной активностью.

Материалы и методы

Макрофаги генерировали из моноцитов периферической крови. Моноциты выделяли с помощью RosetteSep Human Monocyte Enrichment Cocktail (STEMCELL technologies, Канада) в соответствии с инструкцией производителя. Кратко, к 15 мл цельной крови здоровых доноров добавляли ЭДТА до конечной концентрации 1 мМ, а также RosetteSep Cocktail в концентрации 50 мкл/мл, и инкубировали при комнатной температуре 20 минут. После этого кровь разбавляли эквивалентным объемом забуференного фосфатами физиологического раствора (ЗФР) и центрифугировали в градиенте плотности фиколла-верографина. Интерфазу, обогащенную моноцитами, собирали и двукратно отмывали с помощью ЗФР. Далее клеточную взвесь, обогащенную моноцитами, помещали в 12-тилуночные планшеты (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия), дополненной 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1% незаменимых аминокислот (все реагенты Sigma-Aldrich, США), 10% FBS (Gibco, Великобритания) и 50 нг/мл рекомбинантного M-CSF или GM-CSF (все производства Sigma-Aldrich, США) и культивировали в течение 7 дней при 37 °C, 5% CO₂, 95% влажности. На 5-й день в среду добавляли дексаметазон в концентрации 50 нг/мл (KRKA, Словения); полученные макрофаги были обозначены как M-M(Dex) и GM-M(Dex) в соответствии с дифференцировочным фактором. Неполяризованные клетки (M-M0 и GM-M0) генерировали без добавления дексаметазона. По окончании срока культивирования макрофаги получали при помощи механической диссоциации, подсчитывали количество клеток и определяли их жизнеспособность (по исключению трипанового синего). Супернатанты собирали, центрифугировали, подвергали стерилизующей фильтрации, криоконсервировали и хранили при температуре -80 °C.

Источником фибробластов служила линия легочных фибробластов взрослого HLF210, которая была любезно предоставлена Институтом ре-

генеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова.

Стандартное культивирование фибробластов (2D) осуществляли в 24-луночной планшете (TPP, Швейцария) в количестве 150×10^3 клеток/лунку в среде DMEM/F12 (ООО «БиолоТ», Россия) и 5% FBS (Gibco, США) или кондиционной среде макрофагов в течение 5 дней.

3D-культивирование фибробластов производили в коллагеновом геле плотностью 2 мг/мл (Институт Цитологии, Россия), используя аналогичную концентрацию клеток, в 24-луночной планшете (TPP, Швейцария) в среде DMEM/F12 (ООО «БиолоТ», Россия) и 5% FBS (Gibco, США) или кондиционной среде макрофагов.

Дифференцировку фибробластов в 2D/3D-культурах индуцировали с помощью 20 нг/мл TGF- β (PeproTech, Великобритания), который вносили в 1-й день культивирования одновременно с кондиционной средой макрофагов/стандартной средой; в качестве контроля использовали культуры фибробластов без TGF- β . Внутриклеточную экспрессию α -гладкомышечного актина (α -SMA) в 3D-культурах оценивали после расщепления коллагеновой матрицы с помощью коллагеназы (Sigma-Aldrich, США), используя APC-конъюгированные антитела к α -SMA (R&D Systems, США). Уровень экспрессии α -SMA анализировали методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) с использованием ПО Cell Quest (Becton Dickinson, США).

Уровень продукции коллагена I типа клетками линии HLF210 определяли с помощью Human Collagen Type I Alpha 1 ELISA Kit (Wuhan Fine Biotech Co., Китай) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистическую обработку полученных результатов производили с помощью программного обеспечения STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде индивидуальных значений и медиан с указанием интерквартильных диапазонов — Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Значимость различий сравниваемых групп оценивали с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок; различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Настоящее исследование было направлено на изучение влияния кондиционных сред макрофагов на дифференцировку фибробластов легких. Первой задачей являлась оценка уровня экспрессии фибробластами легких α -SMA, важного маркера, отражающего переход клеток к миофибробластному фенотипу. Учитывая известные ранее данные о частичной активации фибробластов сердца при взаимодействии с

пластиком [5], нами было решено сравнить экспрессию α -SMA фибробластами легких HLF210 в 2D- и 3D-культурах. Как видно из рисунка 1Г и Д, содержание α -SMA-экспрессирующих клеток при культивировании фибробластов в виде 3D-структур было значительно ниже по сравнению с 2D-культурами (20–35% vs 60–65%). Более того, в двухмерных культурах фибробласты были более отростчатыми (рис. 1А), что характерно для активированных клеток, тогда как в коллагеновом геле клетки имели более естественную веретеновидную форму (рис. 1Б). Однако под влиянием TGF- β клетки HLF210 в трехмерных культурах приобретали характерный миофибробластный фенотип (рис. 1Д и Е). Данные результаты согласуются с наблюдением Machahua С. и соавт., которые показали, что 3D-культивирование фибробластов легких может являться удобной моделью для изучения фиброза легких [6]. Таким образом, по-видимому, культивирование фибробластов в трехмерных культурах более физиологически релевантно по отношению к ситуации *in vivo*, поэтому анализ влияния макрофагов на экспрессию α -SMA был проведен в 3D-культурах фибробластов.

Рисунок 2 демонстрирует влияние кондиционных сред исследуемых макрофагов на экспрессию α -SMA. Видно, что добавление TGF- β стимулировало экспрессию α -SMA фибробластами легких, что отражено в значительном увеличении доли α -SMA-экспрессирующих клеток (с 20% в контрольных культурах до 70–80% в присутствии TGF- β). При добавлении TGF- β вместе с кондиционными средами макрофагов, поляризованных дексаметазоном, уровень α -SMA⁺ клеток не отличался от такового при добавлении одного только TGF- β . Содержание α -SMA-экспрессирующих клеток в присутствии кондиционных сред М-М(Dex) и GM-М(Dex) составляло, соответственно, 76,2 (73–77) % и 73 (63,5–80) % по сравнению с 77,5 (72,5–81) % в присутствии TGF- β . Напротив, кондиционные среды М-М0 продемонстрировали способность к подавлению интенсивности TGF- β -индуцированной дифференцировки фибробластов, о чем свидетельствовало практически двукратное снижение процента α -SMA-позитивных клеток ($p_w < 0,05$ по сравнению с TGF- β -индуцированным контролем). Более того, хотя медианное значение и не достигало уровня нестимулированного контроля (20 (18–34) %), значимых различий содержания α -SMA⁺ клеток в присутствии кондиционных сред М-М0 обнаружено не было ($p_w > 0,05$). Интересно, что GM-М0 в отличие от М-М0 не демонстрировали ингибирующий эффект. Доля α -SMA-экспрессирующих (мио)фибробластов

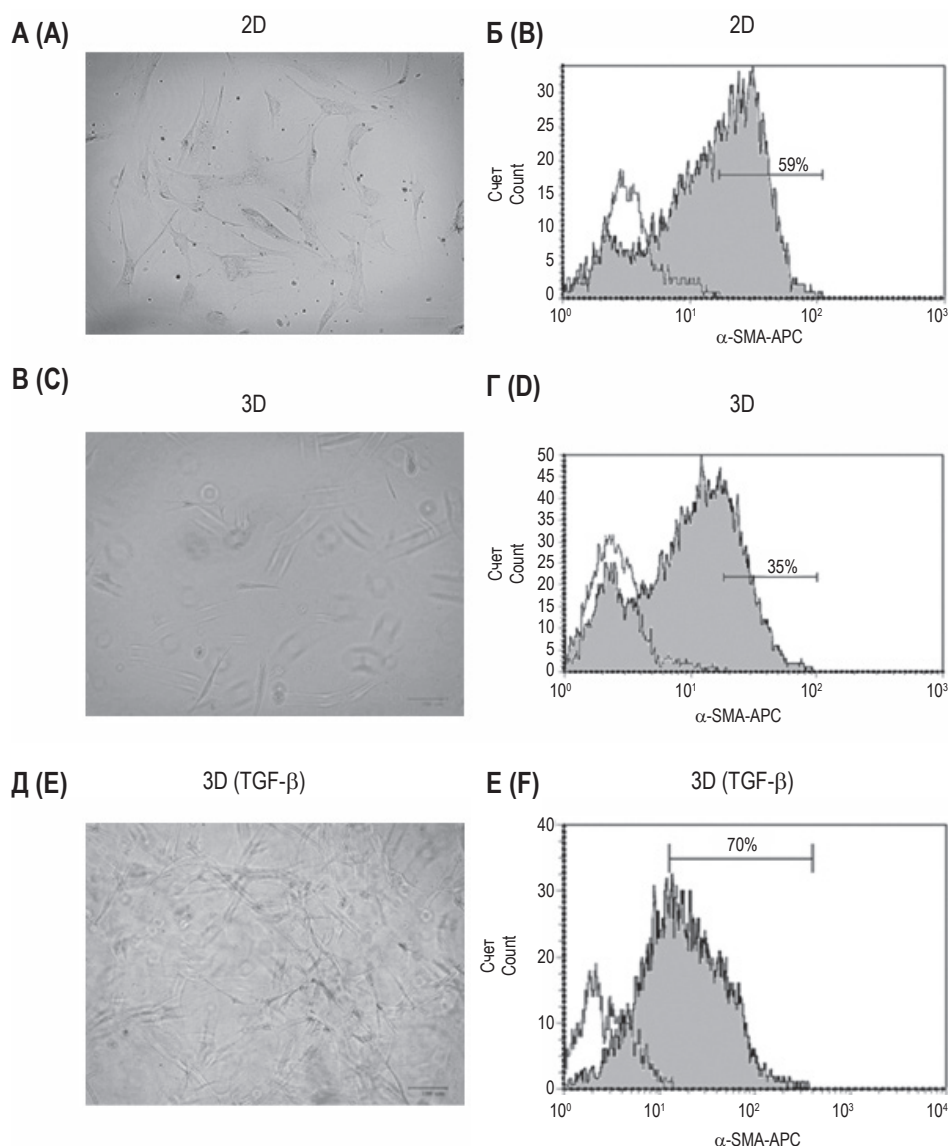


Рисунок 1. Сравнение культивирования клеток HLF210 в 2D- и 3D-культурах

Примечание. А, В, Д – морфологическая картина культуры HLF210 при стандартном культивировании в виде 2D-монослоя и в виде 3D-структур в коллагеновом геле без/с добавлением в среду TGF-β. Б, Г, Е – данные проточной цитометрии по экспрессии α-SMA клетками HLF210 в 2D- и 3D-культурах без/с добавлением в среду TGF-β (репрезентативный эксперимент); серым обозначен эксперимент, черной линией – внутренний контроль (автофлуоресценция).

Figure 1. 2D and 3D cultures of HLF210 cells comparison

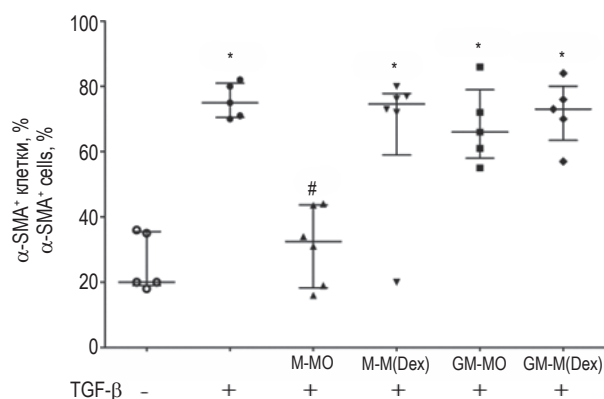
Note. A, B, C, HLF210 culture morphology in standard 2D monolayer and in the 3D structures in a collagen gel with or without TGF-β addition. D, E, F, flow cytometry data of the α-SMA expression by HLF210 cells in 2D and 3D cultures with or without TGF-β addition (representative experiment); the gray histogram indicates the experiment; the black line indicates the internal control (autofluorescence).

составляла 66,5 (58-79) %, что не отличалось значительно от TGF-β-индуцированных культур.

Функциональная активность миофибробластов определяется их способностью активно продуцировать компоненты внеклеточного матрикса [1], поэтому следующей задачей исследования являлась оценка продукции коллагена I типа клетками HLF210. Поскольку извлечение фибробластов из коллагеновой матрицы вклю-

чает этап обработки коллагеназой, что могло повлиять на содержание коллагена в супернатантах, анализ продукции коллагена проводился только в двухмерных культурах фибробластов. Подобно тому, как это было показано ранее в отношении α-SMA, TGF-β-индуцированная продукция коллагена клетками HLF210 в присутствии кондиционных сред М-М0 была ниже по сравнению с TGF-β-индуцированным контролем (54 (41,2-

А (А)



Б (В)

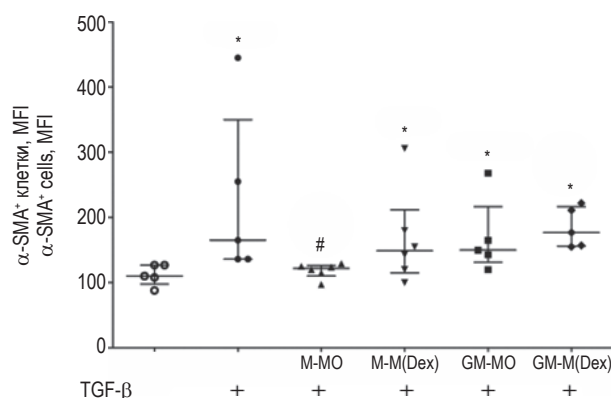


Рисунок 2. Эффект влияния кондиционных сред макрофагов на экспрессию α-SMA клетками HLF210

Примечание. А – доля α-SMA-экспрессирующих клеток в культурах фибробластов (в %), n = 5-6; Б – значение средней интенсивности флюоресценции α-SMA, n = 5-6; * – статистически значимые различия с контролем ($p_w < 0,05$); # – статистически значимые различия с TGF-β-индуцированным контролем ($p_w < 0,05$).

Figure 2. Effect of macrophage conditioned media on the α-SMA expression by HLF210 cells

Note. A, the content of α-SMA-expressing cells in fibroblast cultures (%), n = 5-6; B, the mean fluorescence intensity of α-SMA, n = 5-6; *, statistically significant difference compared to control ($p_w < 0.05$); #, statistically significant difference compared to TGF-β-induced cultures ($p_w < 0.05$).

87,6) нг/мл vs 63,8 (54,8-150) нг/мл ($p_w = 0,07$) (рис. 3). В присутствии других кондиционных сред макрофагов значимых различий с TGF-β-индуцированными фибробластами не наблюдалось (70 (34,8-70,1) нг/мл, 71 (36-135,2) нг/мл и 76,8 (49,6-105,6) нг/мл при добавлении конди-

ционных сред GM-MO, M-M(Dex) и GM-M(Dex) соответственно).

Таким образом, в совокупности полученные данные указывают на то, что растворимые факторы M-MO макрофагов, в отличие от других исследуемых подтипов, способны подавлять TGF-β-индуцированную дифференцировку легочных фибробластов.

В литературе имеются единичные работы, характеризующие влияние макрофагов, генерируемых из моноцитов, на фибробласты легких. Так, Song и соавт. продемонстрировали, что различно активированные макрофаги способны оказывать разнонаправленное влияние на функциональную активность фибробластов [12]. Авторы показали, что макрофаги, поляризованные дексаметазоном, стимулируют пролиферацию и продукцию коллагена недифференцированными легочными фибробластами. Наше исследование дополняет эти данные, демонстрируя, что дексаметазон-поляризованные макрофаги, независимо от дифференцировочного стимула (M-CSF или GM-CSF), не способны ингибировать TGF-β-индуцированную дифференцировку фибробластов легких.

Ранее было показано, что макрофаги с M2c-фенотипом обладают антифиброгенными свойствами в отношении фибробластов дермы, по крайней мере, клетки, индуцированные IL-10 [10]. При этом M2c фенотип может быть также индуцирован глюкокортикоидами или TGF-β. Однако согласно полученным нами результатам, дексаметазон не направляет макрофаги в клетки с вы-

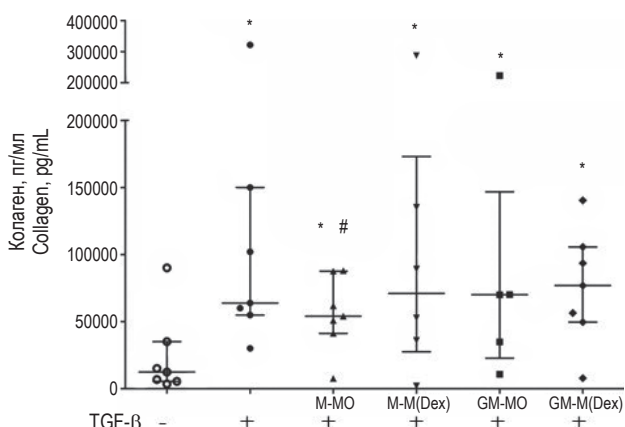


Рисунок 3. Влияние кондиционных сред макрофагов на TGF-β-индуцированную продукцию коллагена клетками HLF210, n = 5-7

Примечание. * – статистически значимые различия с контролем ($p_w < 0,05$), # – различия с TGF-β-индуцированным контролем на уровне тренда ($p_w = 0,07$).

Figure 3. Effect of macrophage conditioned media on TGF-β-induced collagen production by HLF210 cells, n = 5-7

Note. *, statistically significant difference compared to control ($p_w < 0.05$); #, difference compared to TGF-β-induced cultures at the trend level ($p_w = 0.07$).

раженным антифиброгенным потенциалом. Это согласуется с идеей гетерогенности макрофагов, отраженной в руководстве Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines, в котором рекомендовано указывать поляризирующий стимул генерируемых макрофагов в скобках [9], а не использовать аббревиатуру M2a, M2b, M2c и т. д.

Заключение

Полученные в данном исследовании данные, демонстрирующие ингибирование дифференцировки фибробластов растворимыми факторами макрофагов, дифференцированных в присутствии М-CSF, но не GM-CSF, свидетельствует о важной роли дифференцировочного фактора в

формировании функционального фенотипа макрофагов с антифиброгенными свойствами. Действительно, дифференцировочные факторы вносят значительный вклад в формирующийся фенотип макрофагов, что было отражено во многих исследованиях, сравнивающих макрофаги, генерируемые под влиянием М-CSF или GM-CSF [13, 15]. Механизмы антифиброгенной активности М-M0 макрофагов еще предстоит выяснить.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Институту регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, за предоставление клеточной линии HLF210.

Список литературы / References

1. Bagalad B.S., Mohan Kumar K.P., Puneeth H.K. Myofibroblasts: Master of disguise. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, 2017, Vol. 21, no. 3, pp. 462-463.
2. Brennan P.N., MacMillan M., Manship T., Moroni F., Glover A., Graham C., Semple S., Morris D.M., Fraser A.R., Pass C., McGowan N.W.A., Turner M.L., Lachlan N., Dillon J.F., Campbell J.D.M., Fallowfield J.A., Forbes S.J. Study protocol: a multicentre, open-label, parallel-group, phase 2, randomised controlled trial of autologous macrophage therapy for liver cirrhosis (MATCH). *BMJ Open*, 2021, Vol. 11, no. 11, e053190. doi: 10.1136/bmjopen-2021-053190.
3. Chang C.H., Juan Y.H., Hu H.C., Kao K.C., Lee C.S. Reversal of lung fibrosis: an unexpected finding in survivor of acute respiratory distress syndrome. *QJM*, 2018, Vol. 111, no. 1, pp. 47-48.
4. Koudelka A., Cechova V., Rojas M., Mitash N., Bondonese A., St Croix C., Ross M.A., Freeman B.A. Fatty acid nitroalkene reversal of established lung fibrosis. *Redox Biology*, 2022, Vol. 50, 102226. doi: 10.1016/j.redox.2021.102226.
5. Landry N.M., Rattan S.G., Dixon I.M.C. An improved method of maintaining primary murine cardiac fibroblasts in two-dimensional cell culture. *Sci. Rep.*, 2019, no. 9, 12889. doi: 10.1038/s41598-019-49285-9.
6. Machahua C., Vicens-Zygmunt V., Ríos-Martín J., Llatjós R., Escobar-Campuzano I., Molina-Molina M., Montes-Worboys A. Collagen 3D matrices as a model for the study of cell behavior in pulmonary fibrosis. *Exp. Lung Res.*, 2022, Vol. 48, no. 3, pp. 126-136.
7. Meng X.M., Nikolic-Paterson D.J., Lan H.Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2016, Vol. 12, no. 6, pp. 325-338.
8. Mikkelsen L.F., Rubak S. Reversible lung fibrosis in a 6-year-old girl after long term nitrofurantoin treatment. *BMC Pulm. Med.*, 2020, Vol. 20, 313. doi: 10.1186/s12890-020-01353-x.
9. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerdt S., Gordon S., Hamilton J.A., Ivashkiv L.B., Lawrence T., Locati M., Mantovani A., Martinez F.O., Mege J.L., Mosser D.M., Natoli G., Saeij J.P., Schultze J.L., Shirey K.A., Sica A., Suttles J., Udalova I., van Ginderachter J.A., Vogel S.N., Wynn T.A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 2014, Vol. 41, no. 1, pp. 14-20.
10. Sapudom J., Karaman S., Mohamed W.K.E., Garcia-Sabaté A., Quartey B.C., Teo J.C.M. 3D in vitro M2 macrophage model to mimic modulation of tissue repair. *NPJ Regen. Med.*, 2021, no. 6, 83. doi: 10.1038/s41536-021-00193-5.
11. Sari E., He C., Margaroli C. Plasticity towards rigidity: a macrophage conundrum in pulmonary fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 19, 11443. doi: 10.3390/ijms231911443.
12. Song E., Ouyang N., Hörbelt M., Antus B., Wang M., Exton M.S. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell. Immunol.*, 2000, Vol. 204, no. 1, pp. 19-28.
13. Tarique A.A., Logan J., Thomas E., Holt P.G., Sly P.D., Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2015, Vol. 53, no. 5, pp. 676-688.

14. Ullm F, Riedl P, Machado de Amorim A., Patzschke A., Weiß R., Hauschildt S., Franke K., Anderegg U., Pompe T. 3D scaffold-based macrophage fibroblast coculture model reveals IL-10 dependence of wound resolution phase. *Adv. Biosyst.*, 2020, Vol. 4, no. 1, e1900220. doi: 10.1002/adbi.201900220.
15. Xue J., Schmidt S.V., Sander J., Draffehn A., Krebs W., Quester I., de Nardo D., Gohel T.D., Emde M., Schmidleithner L., Ganesan H., Nino-Castro A., Mallmann M.R., Labzin L., Theis H., Kraut M., Beyer M., Latz E., Freeman T.C., Ulas T., Schultze J.L. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*, 2014, Vol. 40, no. 2, pp. 274-288.

Авторы:

Максимова А.А. — к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Шевела Е.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сахно Л.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Maksimova A.A., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shevela E.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sakhno L.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 27.03.2024
Отправлена на доработку 30.03.2024
Принята к печати 01.04.2024

Received 27.03.2024
Revision received 30.03.2024
Accepted 01.04.2024

МЕМБРАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ Hsp70 НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ОБЪЕМНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В 3D-КУЛЬТУРАХ

Костенко В.В.^{1,2}, Бойко А.А.¹, Гречихина М.В.¹, Овсяникова О.В.^{1,2},
Сапожников А.М.¹

¹ ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. Белки теплового шока семейства 70 кДа (HSP70) относятся к внутриклеточным шаперонам, необходимым клетке для поддержания белкового гомеостаза. В цитозоле в нормальных условиях эти белки помогают правильному сворачиванию белков, предотвращая их агрегацию, участвуют в транспорте белков, выживании клеток. Среди HSP70 выделяют пул стресс-индуцируемых белков Hsp70, который заметно увеличивается в ответ на ряд стресс-факторов и способствует восстановлению клеток после стресса. Опухолевые клетки, в отличие от нормальных, характеризуются способностью представлять Hsp70 на поверхности клеточной мембраны. Мембраносвязанные Hsp70 могут выступать как сигналы опасности и способны усиливать или ингибировать иммунные реакции. Трехмерная модель клеточных культур в виде сфероидов в разной степени может имитировать структурную организацию солидных опухолей. В культурах многоклеточных сфероидов (3D) формируется гипоксия внутри сфероидов, градиенты питательных веществ, что может влиять на транслокацию Hsp70 на мембрану клеток. Целью данной работы был сравнительный анализ экспрессии Hsp70 на опухолевых клетках различного происхождения при культивировании в монослойном состоянии (2D) и 3D-культурах. Анализ экспрессии провели на линиях рака молочной и поджелудочной желез, карцином толстой кишки и простаты, лимфомах методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Культивирование в 3D-культурах проводили с использованием антиадгезивной подложки PolyHEMA. Показали, что карциномы различного происхождения не все экспрессируют Hsp70 как в 2D, так и в 3D-культурах. Для некоторых опухолевых линий характерна экспрессия Hsp70 только в 3D-культурах. Экспрессия Hsp70 была выявлена на клетках рака молочных желез BT20; карциномы толстой кишки SW837; поджелудочной железы PANC1 и простаты PC-3. Анализ Hsp70-положительных карцином различной локализации в 2D- и 3D-моделях может быть полезен для использования антител против Hsp70 в качестве вектора для доставки противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: Hsp70, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, карцинома толстой кишки, карцинома простаты, 2D-культуры, 3D-культуры, флуоресцентная визуализация, конфокальная микроскопия

Адрес для переписки:

Бойко Анна Александровна
ФГБУН «Институт биоорганической химии
имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук
117997, Россия, Москва, ГСП-7,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: 8 (916) 303-73-02.
E-mail: boyko_anna@mail.ru

Address for correspondence:

Anna A. Boyko
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Science
16/10 Miklukho-Maklay St
Moscow, GSP-7
117997 Russian Federation
Phone: +7 (916) 303-73-02.
E-mail: boyko_anna@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Костенко, А.А. Бойко, М.В. Гречихина,
О.В. Овсяникова, А.М. Сапожников «Мембранная
экспрессия Hsp70 на опухолевых клетках при объемном
культивировании в 3D-культурах» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 657-662.
doi: 10.15789/1563-0625-EOM-16750

© Костенко В.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.V. Kostenko, A.A. Boyko, M.V. Grechikhina,
O.V. Ovsyanikova, A.M. Sapozhnikov "Expression
of membrane HSP70 on tumor cells during cultivation
in 3D cultures", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 657-662.
doi: 10.15789/1563-0625-EOM-16750

© Kostenko V.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EOM-16750

EXPRESSION OF MEMBRANE HSP70 ON TUMOR CELLS DURING CULTIVATION IN 3D CULTURES

Kostenko V.V.^{a,b}, Boyko A.A.^a, Grechikhina M.V.^a, Ovryanikova O.V.^{a,b}, Sapozhnikov A.M.^a

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Heat shock proteins of the 70 kDa family (HSP70) are intracellular chaperones necessary for the cell to maintain protein homeostasis. In the cytosol, under normal conditions, these proteins promote the correct folding of proteins, preventing their aggregation, and are involved in protein transport and cell survival. Among the HSP70, there is a pool of stress-inducible proteins Hsp70, which significantly increases in response to a number of stress factors and facilitates cell recovery after stress. Tumor cells, unlike normal, are characterized by the ability to present Hsp70 on the surface of the cell membrane. Membrane-bound Hsp70 can be considered as a danger signal and enhance or inhibit immune responses. A three-dimensional model of cells in the spheroids in varying degrees simulates the structural organization of solid tumors. In cultures of multicellular spheroids (3D), hypoxia and nutrient gradients are formed within the spheroids, which can affect the translocation of Hsp70 to the cell membrane. The purpose of this work was a comparative analysis of Hsp70 expression on tumor cells of various origins when cultivated in a monolayer state (2D) and 3D cultures. Analysis was carried out on breast and pancreatic tumor cell lines, colon and prostate carcinomas, and lymphomas using flow cytometry and confocal microscopy methods. Cultivation in 3D cultures was performed using the anti-adhesive PolyHEMA substrate. The results showed that not all carcinomas from our panel express Hsp70 in both 2D and 3D cultures. Some tumor lines have membrane Hsp70 only in 3D cultures. Hsp70 expression was detected on: BT20 breast cancer cells; colon carcinoma SW837; pancreas PANC1; and prostate PC-3. Analysis of Hsp70-positive carcinomas of various localizations in 2D and 3D models may be useful for the application of antibodies against Hsp70 as a vector for the delivery of anticancer drugs.

Keywords: Hsp70, breast cancer, pancreatic cancer, colon carcinomas, prostate carcinomas, 2D cultures, 3D cultures, fluorescence imaging, confocal microscopy

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-15-00472).

Введение

Белки теплового шока (HSP) относятся к внутриклеточным шаперонам, необходимым клетке для поддержания белкового гомеостаза: они способствуют поддержанию нормальной конформации белков, предотвращают их агрегацию, они вовлечены в процессы транспорта и утилизации неправильно свернутых белков в нормальных условиях и при стрессе. Одну из групп HSP формирует семейство белков с молекулярной массой 70 кДа. Это семейство включает в себя конститутивно экспрессируемые белки (Hsc70, митохондриальный Hsp70), а также несколько стресс-индуцируемых белков (Hsp70), инициация накопления которых в клетке происходит в условиях гипертермии, окислительного стресса, токсического воздействия и др. [5]. Индуциру-

емые Hsp70, помимо внутриклеточной локализации, экспрессируются на поверхности клеток различных злокачественных опухолей, для нормальных/нетрансформированных клеток поверхностная экспрессия Hsp70 не характерна [7]. Такой локализации способствуют специфическими изменения в липидных компонентах мембран опухолевых клеток, связанных с присутствием глоботриаозилцерамида (Gb3) и фосфатидил серина [4]. Появление мембрано-ассоциированных Hsp70 на поверхности клетки можно рассматривать как сигнал опасности, стимулирующего распознавание опухолевых клеток иммуннокомпетентными клетками [1, 2, 3, 10]. С другой стороны, показано, что повышенная экспрессия Hsp70 на мембране опухолевых клеток ассоциирована с плохим прогнозом для пациентов [8]. Таким образом, опухоль-ассоциированную мембранную экспрессию Hsp70 можно рассматривать как мишень для доставки терапевтических препаратов к опухолевым клеткам.

Материалы и методы

В работе использовали линии клеток рака молочных желез BT20, BT474, HCC1395, MDA-MD-231; толстой кишки HCT116, HT29; аденокарцинома прямой кишки SW837; карциномы поджелудочной железы PANC1, AsPC1, COLO357; простаты Du145, PC-3; а также лимфом Raji, Daudi и лейкемии K562 (все линии из коллекции ИБХ РАН). Клетки инкубировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10%-ной фетальной телячьей сыворотки (FCS), L-глутамина, антибиотиков (все от НПП «ПанЭко», России) в инкубаторе с 5% CO₂ при температуре 37 °С. Клетки пассировали путем трипсинизации с использованием раствора трипсин/ЭДТА (НПП «ПанЭко», Россия) два раза в неделю.

Для получения 3D-культур на дно стерильных 12-луночных планшетов (Costar, США) вносили 700 мкл поли(2-гидроксиэтилметакрилата) (PolyHEMA) (5 мг/мл в 100% этаноле). Планшеты оставляли до полного испарения спирта. После промывки фосфатно-солевым буфером (ФБ) в лунки вносили клетки и оставляли инкубировать 24–36 ч.

Для анализа методом проточной цитометрии клетки из 2D-культур снимали трипсином, отмывали фосфатно-солевым буфером ФБ, переводили в ФБ с 1% бычьего альбумина и 0,05% азида натрия (ФБА). Клетки из 3D-культур разбивали на мелкие сфероиды интенсивным пипетированием и далее обрабатывали аналогично. Клетки разносили по 96-луночным круглодонным планшетам, добавляли антитела к Hsp70 (клон REA349, Miltenyi Biotec, Германия), меченные FITC или фикоэритрином (PE), инкубировали планшеты при +4 °С 1–2 ч, отмывали в ФБА и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (BD, США). Результаты обработаны в программе FlowJo v.10 (BD, США).

Для получения 2D-культур клетки высевали на стерильные покровные стекла, помещенные в 6-луночные планшеты (Costar, США) и инкубировали в течение ночи. Затем клетки промывали в ФБ и инкубировали с антителом к Hsp70 (клон REA349, HSP70-PE, Miltenyi Biotec, Германия), меченным FITC или PE. Для анализа клеток в 3D-культурах сфероиды переносили в лунки 96-луночных круглодонных планшетов и окрашивали антителами к Hsp70. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США) 10–15 мин. Инкубацию проводили 1–2 ч, отмывали ФБА, фиксировали 2%-ным параформальдегидом и полимеризовали средой Mowiol 4.88 (Calbiochem, Германия). Слайды анализировали с помощью конфокального микроскопа Eclipse TE2000 (Nikon, Япония). Для обработки результатов использовалось программное обеспечение EZ-C1 FreeViewer (Nikon, Япония).

Графики были созданы с использованием программного обеспечения MS Excel. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM, по крайней мере для трех независимых экспериментов или как один репрезентативный эксперимент из трех. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента. Уровни значимости $p < 0,05$ считались статистически достоверными.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ экспрессии Hsp70 методом проточной цитометрии на поверхности опухолевых клеточных линий различного происхождения после культивирования в стандартных условиях в монослое (2D-культуры) показал, что не все клетки экспрессируют этот белок (рис. 1, 2). Клетки линий рака молочной железы BT-20 и HCC1395 характеризовались наличием мембрано-ассоциированных Hsp70, тогда как MDA-MB-231 и BT474 были негативными (рис. 1А). Среди анализируемых линий, выделенных из опухолей колоректального происхождения HCT116, SW837 и HT29 не было выявлено Hsp70-позитивных (рис. 1Г).

В условиях формирования сфероидов (3D-культуры) регистрировалось усиление представленности на поверхности мембраны Hsp70 для линии BT-20 (рис. 1А, стрелка); уровень экспрессии Hsp70 на мембранах HCC1395 не менялся, а линии MDA-MB-231 и BT474 оставались негативными в 3D-культурах, как в 2D-состоянии (рис. 1А).

Среди линий колоректального рака клеток усиление экспрессии Hsp70 в 3D-культурах наблюдалось на линиях HT29 и SW837 (рис. 1Г). Мембранная экспрессия Hsp70 в клетках HCT116 не появлялась в 3D-культурах (рис. 1Г).

Анализ поверхностной экспрессии Hsp70 методом конфокальной микроскопии показал, что усиление транслокации Hsp70 на мембрану клеток линии BT-20 наблюдается по поверхности сфероидов (рис. 1Б), тогда как в центре сфероида красное свечение отсутствовало (рис. 1Б, стрелка). Экспрессию Hsp70 на клетках MDA-MD-231 не наблюдали в 3D-культуре (рис. 1В), что согласуется с данными проточной цитометрии.

Аналогичные результаты были получены и на клетках колоректальных карцином. Экспрессия Hsp70 на положительных линиях HT29 и SW837 локализовалась по поверхности сфероидов (рис. 1Д, Ж) и отсутствовала на сфероидах HCT116 (рис. 1Е).

Данные анализа экспрессии Hsp70 на линиях рака поджелудочной железы PANC1, AsPC1 и COLO357 приведены только для 3D-культур. Показали, что все линии, на которых проводилось тестирование, положительно по мембранной

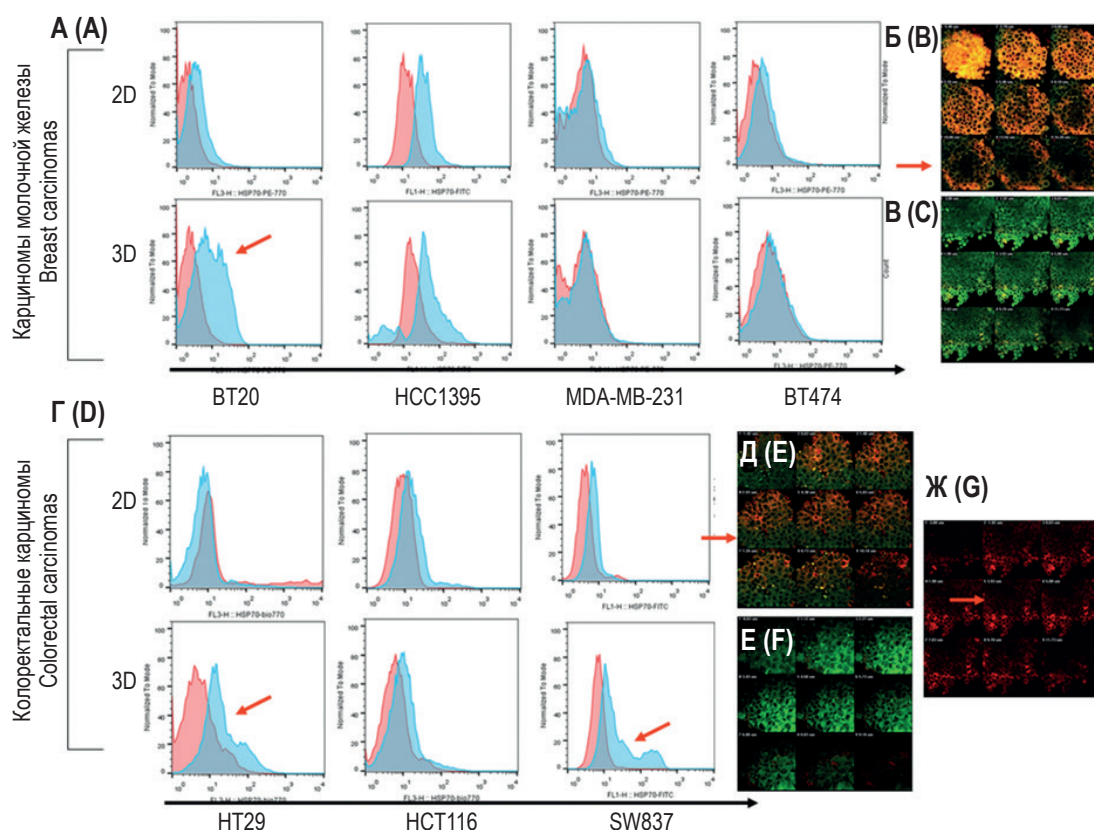


Рисунок 1. Экспрессия Hsp70 на клетках рака молочной железы BT20, BT474, HCC1395, MDA-MD-231 (А) и рака толстой кишки HT29, HCT116, SW837 (Г), культивируемых в 2D- и 3D-культурах, оцененная методами проточной цитометрии. Экспрессия (Z-срезы) Hsp70 (красный) на сфероиде BT20 (Б), MDA-MD-231 (В), HT29 (Д), HCT116 (Е) и SW837 (Ж)

Примечание. Окраска мембран Cer-BODIPY (зеленый). Шкала 15-20 мкм.

Figure 1. Expression of Hsp70 on breast cancer cells BT20, BT474, HCC1395, MDA-MD-231 (A) and colon cancer HT 29, HCT116, SW837 (D) cultured in 2D and 3D cultures assessed by flow cytometry. Expression of Hsp70 (red) on BT20 (B), MDA-MD-231 (C), HT29 (E), HCT116 (F) and SW837 (G) spheroids

Note. The membranes are stained with Cer-BODIPY (green). The scale bar 15-20 μ m.

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ Hsp70 НА КЛЕТКАХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КАРЦИНОМ И ЛИМФОМАХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК В 2D- И 3D-УСЛОВИЯХ

TABLE 1. EXPRESSION OF Hsp70 ON EPITHELIAL CARCINOMA AND LYMPHOMA CELLS UNDER 2D AND 3D CONDITIONS

Линии клеток Cell lines	2D	3D	Линии клеток Cell lines	2D	3D
			Карциномы поджелудочной железы Pancreatic carcinomas		
Карциномы молочных желез Breast carcinomas			PANC1	+	+
BT20	+	++	AsPC1	–	±
BT474	–	–	COLO357	–	±
HCC1395			Карциномы простаты Prostate carcinomas		
MDA-MD-231	–	–	Du145	–	–
			PC-3	+	++
Карциномы толстой кишки Colon carcinomas			Лимфомы, лейкомия Lymphomas, leukemia		
HT29	–	+	Raji	–	–
HCT116	–	–	Daudi	–	–
SW837	–	+	K562	–	–

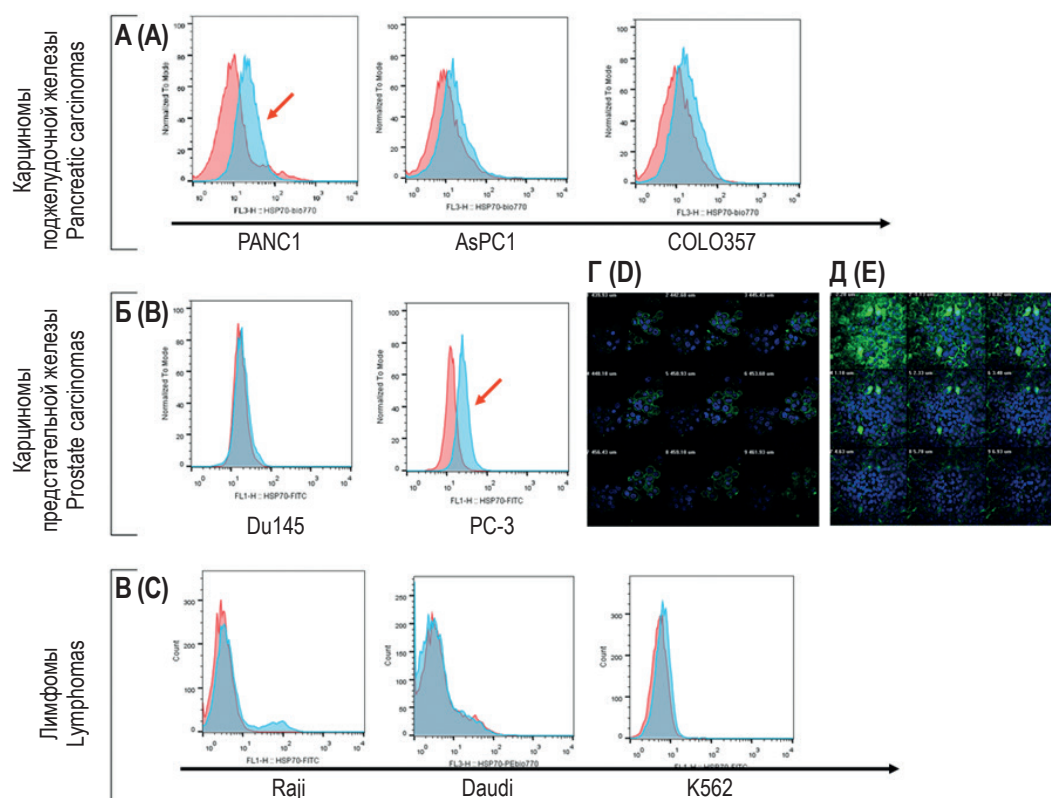


Рисунок 2. Экспрессия Hsp70 на клетках рака поджелудочной железы PANC1, AsPC1, COLO357 (А), карциномы простаты Du145, PC-3 (Б), лимфом Raji, Daudi и лейкомии K562 (В), культивируемых в 3D-культурах в проточной цитометрии. Конфокальная микроскопия экспрессии Hsp70 (зеленый) на сфероиде Du145 (Г) и PC-3 (Д)

Примечание. Ядра окрашены Hoechst 33258 (синий). Шкала 15-20 мкм.

Figure 2. Expression of Hsp70 on pancreatic cancer cells PANC 1, AsPC1, COLO357 (A), prostate carcinoma Du145, PC-3 (B), Raji, Daudi, K562 lymphomas (C) cultured in 3D conditions by flow cytometry method. Confocal microscopy of Hsp70 expression (green) on Du145 (D) and PC-3 (E) spheroids

Note. The nuclei are stained with Hoechst 33258 (blue). The scale bar 15-20 μm.

экспрессии Hsp70 (рис. 2А); на клетках PANC1 экспрессия была выше. На клетках карциномы простаты PC-3 экспрессия была очень высокой, а на клетках Du145 экспрессия отсутствовала или была очень низкой (рис. 2Б, В, Г, Д). Распределение повышенной экспрессии на линии PC-3 также наблюдалось в верхних слоях клеток сфероиде (рис. 2Д). Нельзя исключить, что различия в представленности Hsp70 на мембране клеток линий простаты связаны с потенциалом их метастазирования, поскольку прослежена связь между выживаемостью и путями метастазирования среди пациентов с разным фенотипом мембрано-ассоциированных Hsp70 на опухолях [9]. Известно, что клетки PC-3 обладают высоким метастатическим потенциалом по сравнению с клетками DU145, имеющими умеренный метастатический потенциал [6].

Суспензионные культуры лимфом и лейкомии также культивировали на антиадгезивной подложке. Клетки собирались в сферические

культуры, легко разбиваемые пипетированием. На клетках линий Daudi и K562 в 3D-культурах экспрессия Hsp70 полностью отсутствовала, а на клетках Raji регистрировалась отдельная популяция, возможно, апоптотических клеток (рис. 2В).

Суммарные данные по экспрессии Hsp70 на опухолевых клетках различного происхождения, культивируемых в 2D- и 3D-условиях, приведены в таблице 1.

Заключение

Таким образом, в модели многоклеточных сфероидов (3D-культуры), которая ближе воспроизводит функциональное состояние опухолевых клеток *in vivo*, показали, что в некоторых линиях стимулируется транслокация Hsp70, которая отсутствует в 2D-культурах. Маркирование опухолевых клеток Hsp70 можно использовать для направленной доставки противоопухолевых препаратов с помощью антител к Hsp70.

Список литературы / References

1. Albakova Z., Armeev G.A., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. HSP70 multi-functionality in cancer. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 3, 587. doi: 10.3390/cells9030587.
2. Alekseeva L.G., Ovsyanikova O.V., Schulga A.A., Grechikhina M.V., Shustova O.A., Kovalenko E.I., Svirshchevskaya E.V., Deyev S.M., Sapozhnikov A.M. Targeted delivery of HSP70 to tumor cells via supramolecular complex based on HER2-specific DARPIn9_29 and the barnase:barstar pair. *Cells*, 2024, Vol. 13, 317. doi: 10.3390/cells13040317.
3. Gastpar R., Gehrman M., Bausero M.A., Asea A., Gross C., Schroeder J.A., Multhoff G. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res.*, 2005, Vol. 65, no. 2, pp. 5238-5247.
4. Gehrman M., Liebisch G., Schmitz G., Anderson R., Steinem C., de Maio A., Pockley G., Multhoff G. Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PLoS One*, 2008, Vol. 3, no. 4, e1925. doi: 10.1371/journal.pone.0001925.
5. Mayer M.P., Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci.*, 2005, Vol. 62, no. 6, pp. 670-684.
6. Molter C.W., Muszynski E.F., Tao Y., Trivedi T., Clouvel A., Ehrlicher A.J. Prostate cancer cells of increasing metastatic potential exhibit diverse contractile forces, cell stiffness, and motility in a microenvironment stiffness-dependent manner. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2022, Vol. 10, 932510. doi: 10.3389/fcell.2022.932510.
7. Multhoff G., Botzler C., Wiesnet M., Müller E., Meier T., Wilmanns W., Issels R.D. A Stress-inducible 72-kda heat-shock protein (Hsp72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int. J. Cancer*, 1995, Vol. 61, no. 2, pp. 272-279.
8. Murphy M.E. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 2013, Vol. 34, no. 6, pp. 1181-1188.
9. Pfister K., Radons J., Busch R., Tidball J.G., Pfeifer M., Freitag L., Feldmann H.-J., Milani V., Issels R., Multhoff G. Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *J. Cancer*, 2007, Vol. 110, pp. 926-935.
10. Shevtsov M.A., Komarova E.Y., Meshalkina D.A., Bychkova N.V., Aksenov N.D., Abkin S.V., Margulis B.A., Guzhova I.V. Exogenously delivered heat shock protein 70 displaces its endogenous analogue and sensitizes cancer cells to lymphocytes-mediated cytotoxicity. *Oncotarget*, 2014, Vol. 5, pp. 3101-3114.

Авторы:

Костенко В.В. — студентка бакалавриата ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; инженер-исследователь отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Бойко А.А. — к.б.н., научный сотрудник, ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Гречихина М.В. — младший научный сотрудник, ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Овсяникова О.В. — аспирант ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; инженер-исследователь отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Сопозников А.М. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории Клеточных взаимодействий, ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Kostenko V.V., Undergraduate Student, Lomonosov Moscow State University; Research Engineer, Department of Immunology, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Boyko A.A., PhD (Biology), Research Associate, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Grechikhina M.V., Junior Research Associate, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Ovsyanikova O.V., Postgraduate Student, Lomonosov Moscow State University; Research Engineer, Department of Immunology, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Sapozhnikov A.M., PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.03.2024

Отправлена на доработку 01.04.2024

Принята к печати 08.04.2024

Received 29.03.2024

Revision received 01.04.2024

Accepted 08.04.2024

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ TLR/RLR-РЕЦЕПТОРОВ В МАКРОФАГ-ПОДОБНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ АКРИДОНУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Наровлянский А.Н.¹, Полосков В.В.¹, Мезенцева М.В.¹,
Суетина И.А.¹, Цветнов А.В.¹, Богданов Е.Ю.¹, Федякина И.Т.¹,
Коваленко А.Л.², Ершов Ф.И.¹

¹ ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБУ «Научно-консультативный центр токсикологии имени С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Активация Toll-подобных рецепторов (TLR) является одним из самых ранних показателей функционального включения врожденного иммунитета. Поэтому разработка препаратов-стимуляторов транскрипции TLR/RLR-генов и одновременно являющимися «мультитаргетными» препаратами является одной из основных задач современной иммунофармакологии. В связи с этим большой интерес представляют противовирусные препараты, которые сочетают свойства интерферогенов и иммуномодуляторов, к которым также принадлежит Циклоферон® и его аналоги. Цель настоящего исследования заключалась в оценке экспрессии генов, определяющих сигнальные TLR/RLR-реакции врожденного иммунитета при действии иммуномодулирующих противовирусных препаратов на основе акридонуксусной кислоты (Циклоферон® и Циклоферон L). Исследование проведено с использованием модели иммунокомпетентных клеток — THP-1, дифференцированных форболовым эфиром в макрофаг-подобные клетки. Анализ генной экспрессии выполнен с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени. Изучен уровень экспрессии генов, кодирующих TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 и RIG-I, при действии препаратов Циклоферон® и Циклоферон L в трех концентрациях 156, 312 и 625 мкг/мл при трех сроках экспозиции — 1 час, 4 часа и 24 часа. Показано, что в культуре клеток макрофагов препарат Циклоферон® в концентрации 156 мкг/мл, 312 мкг/мл и 625 мкг/мл на 24 часа экспозиции в двух сериях экспериментов дозозависимо стимулировал экспрессию генов рецепторов TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8. Обнаружена стабильная сти-

Адрес для переписки:

Наровлянский Александр Наумович
ФГБУ «Национальный исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии имени почетного
академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства
здравоохранения РФ
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел./факс: 8 (499) 193-43-06, 8 (985) 226-28-95.
E-mail: narovl@yandex.ru

Address for correspondence:

Alexander N. Narovlyansky
N. Gamaleya National Research Centre
for Epidemiology and Microbiology
18 Gamaleya St
Moscow
123098 Russian Federation
Phone/fax: +7 (499) 193-43-06, +7 (985) 226-28-95.
E-mail: narovl@yandex.ru

Образец цитирования:

А.Н. Наровлянский, В.В. Полосков, М.В. Мезенцева,
И.А. Суетина, А.В. Цветнов, Е.Ю. Богданов,
И.Т. Федякина, А.Л. Коваленко, Ф.И. Ершов
«Транскрипционная активность генов TLR/RLR-
рецепторов в макрофаг-подобных клетках при
действии препаратов на основе акридонуксусной
кислоты» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 4. С. 663-670. doi: 10.15789/1563-0625-TAO-16722
© Наровлянский А.Н. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.N. Narovlyansky, V.V. Poloskov, M.V. Mezentseva,
I.A. Suetina, A.V. Tsvetnov, E.Yu. Bogdanov, I.T. Fedyakina,
A.L. Kovalenko, F.I. Ershov "Transcriptional activity
of TLR/RLR receptor genes in macrophage-like cells under
the influence of drugs based on acridoneacetic acid", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 4, pp. 663-670.
doi: 10.15789/1563-0625-TAO-16722
© Narovlyansky A.N. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-TAO-16722

муляция экспрессии генов RIG1 рецепторов при экспозиции с препаратом во всех исследованных концентрациях на сроке 4 часа в двух сериях экспериментов. При изучении транскрипционной активности генов *TLR/RLR*-рецепторов в культуре клеток макрофагов при действии препарата Циклоферон L было впервые выявлено в двух сериях экспериментов стабильное возрастание экспрессии генов *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8* только на сроке экспозиции 24 час при одной концентрации препарата Циклоферон L (312 мкг/мл). Обобщая данные, полученные при исследовании препаратов Циклоферон® и Циклоферон L, можно говорить об их способности стимулировать экспрессию генов *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8* (и RIG1 для препарата Циклоферон), которые отвечают за синтез рецепторов врожденного иммунитета. Таким образом, подтвержден факт, что Циклоферон® и аналоги являются регуляторами генной экспрессии *TLR/RLR*-рецепторов врожденного иммунитета.

Ключевые слова: экспрессия генов *TLR/RLR*, полимеразная цепная реакция в реальном времени, индукторы интерферона, Циклоферон, макрофаг-подобные клетки

TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF TLR/RLR RECEPTOR GENES IN MACROPHAGE-LIKE CELLS UNDER THE INFLUENCE OF DRUGS BASED ON ACRIDONEACETIC ACID

Narovlyansky A.N.^a, Poloskov V.V.^a, Mezentseva M.V.^a, Suetina I.A.^a,
Tsvetnov A.V.^a, Bogdanov E.Yu.^a, Fedyakina I.T.^a, Kovalenko A.L.^b,
Ershov F.I.^a

^a N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b S. Golikov Scientific Advisory Center of Toxicology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Activation of Toll-like receptors (TLRs) is one of the earliest indicators of functional activation of the innate immune system. Therefore, the development of drugs that stimulate the transcription of *TLR/RLR* genes and at the same time are “multi-target” drugs is an important task of modern immunopharmacology. In this regard, antiviral drugs that combine the properties of interferonogens and immunomodulators, which also include Cycloferon® and its analogues, are of great interest. The purpose of this study was to assess the expression of genes that determine the *TLR/RLR* signalling reactions of the innate immune system under the influence of immunomodulatory antiviral drugs based on acridoneacetic acid (Cycloferon® and Cycloferon L). The study was conducted using a model of immunocompetent cells: THP-1, differentiated by phorbol ester into macrophage-like cells. Gene expression analysis was performed using real-time polymerase chain reaction. The expression level of genes encoding *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* and RIG-I was studied under the influence of the drugs Cycloferon® and Cycloferon L in three concentrations (156 µg/mL, 312 µg/mL and 625 µg/mL) on 1 hour, 4 hours and 24 hours. It was shown that the drug Cycloferon® at concentrations of 156, 312 and 625 µg/mL at 24 hours of exposure dose-dependently stimulated the expression of *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8* receptor genes. A stable stimulation of the expression of RIG1 receptor genes was found upon exposure 4 hours to the drug in all studied concentrations. For the first time, it was revealed that the drug Cycloferon L stimulated a stable increase in the expression of *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8* genes at an exposure period of 24 hours. Hereby, it was shown that the drugs Cycloferon® and Cycloferon L stimulated the expression of the *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8* genes (and RIG1 for the drug Cycloferon), which are responsible for the synthesis of innate immune receptors.

Keywords: *TLR/RLR* gene expression, real-time polymerase chain reaction, interferon inducers, Cycloferon, macrophage-like cells

Введение

Фармацевтические препараты, разработанные на основе действующего вещества меглюмина акриданонацетата (Циклоферон) и лизина акридонацетата (Циклоферон L), как известно,

являются производными акридонуксусной кислоты и индукторами интерферона (IFN). Кроме того, они обладают противовирусной и иммуномодулирующей активностями [1, 11]. При клиническом применении Циклоферона было вы-

явлено, что его IFN-индуцирующая активность в организме человека в отличие от исследований на мышиных моделях была незначительной [6]. Были проведены многочисленные исследования, однако до сих пор молекулярные механизмы действия препаратов Циклоферона нуждаются в изучении [14].

Активация Toll-подобных рецепторов (TLR) является одним из самых ранних показателей функционального включения врожденного иммунитета [8]. Fitzgerald and Kagan (2020) считают, что «фундаментальные особенности биологии TLR включают: (1) опосредованную патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP) димеризацию TLR, (2) опосредованную димерами TLR сборку супрамолекулярных организующих центров (SMOC) и (3) SMOC-опосредованную активацию киназ, которые управляют транскрипцией и гликолизом [9]. Все эти события приводят к активации массивных изменений в клеточной активности, которые включают изменения в транскрипции генов, сплайсинге, эффективности трансляции, аутофагии, гликолизе и окислительном фосфорилировании.

Ранее Т.М. Соколова и соавт. показали, что Циклоферон в мононуклеарах периферической крови усиливает экспрессию генов *TLR9*, *TLR3* и генов *IFN β 1* и *IFN γ* [4, 5]. Также была обнаружена стимуляция экспрессии генов IFN-регулируемых факторов транскрипции (IRF) *IRF3*, *IRF7*, и генов IFN-зависимых ферментов [2, 5].

Цель настоящего исследования заключалась в оценке экспрессии генов TLR/RLR-рецепторов, свидетельствующих о запуске сигнальных реакций врожденного иммунитета при действии иммуномодулирующих противовирусных препаратов на основе акридонуксусной кислоты (Циклоферон® и Циклоферон L). Были проведены исследования транскрипционной активности генов TLR/RLR-рецепторов (*TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* и *RIG-I*) в модели дифференцированных форболовым эфиром моноцитарной линии клеток THP-1 при действии препаратов Циклоферон® и Циклоферон L.

Материалы и методы

Клеточная линия THP-1 (острый моноцитарный лейкоз, ATCC catalog No TIB 202) получена из РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с глутамином и 10% ЭТС и антибиотиками. Получение THP-1 макрофагов (THP-PMA Мф) осуществляли с реагентом форбол 12-миристанат 13-ацетат (PMA; Cat. No. S-79346-0,005, Sigma-Aldrich, США) согласно известной процедуре PMA [7]. Для проведения экспериментов при определении цитотоксичности использовали 96-луночные планшеты,

для определения генной экспрессии использовали 6-луночные планшеты.

Препараты: лекарственные препараты Циклоферон® (125 мг/мл; серия 010220) и Циклоферон L (Поливиран) (125 мг/мл; серия B011021) были предоставлены ООО «НТФФ «Полисан». При проведении экспериментов в культуре клеток макрофагов THP-PMA Мф препараты Циклоферон® и Циклоферон L использовали в концентрациях — 156 мкг/мл, 312 мкг/мл и 625 мкг/мл. Время экспозиции клеток с препаратами составляло 1 час, 4 час и 24 час. Всего было проведено 2 серии экспериментов.

Количественная оценка цитотоксичности препаратов выполнялась с использованием МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) [13]. Жизнеспособность клеток, измеряя оптическую плотность при длине волны 545 нм фотометра Immunochem 2100 (США). Эксперименты проводились с тремя повторами. Выживаемость клеток в присутствии исследуемого соединения рассчитывалась по формуле: ОП опытных лунок / ОП контр. лунок $\times 100\%$, где ОП — оптическая плотность. Концентрацию раствора соединения XXV, вызывающую уменьшение значения оптической плотности при длине волны 545 нм на 50% по сравнению с контролем клеток, принимали за 50% цитотоксическую дозу (CC50).

Выделение РНК

Суммарную РНК выделяли с использованием HiPure Total RNA Plus Kit, Magen Cat. No. R411102 (Китай), согласно прилагаемой инструкции к набору.

Реакция обратной транскрипции (ОТ)

Реакцию ОТ ставили с универсальным праймером random 6 на матрицах суммарной клеточной РНК согласно прилагаемой инструкции к «Набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ)», кат. № ОТ-01, ООО «НПФ Синтол» (Россия). Полученные кДНК хранили при -70°C .

ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ)

Проводили на амплификаторе CFX Opus 96 с готовой 2-кратной смесью SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix Cat. No. 1725271 (Bio-Rad, США) в микропробирках с оптически-прозрачными крышками на 0,2 мл (SSibio, США). В ПЦР-боксе смешивали 2 мкл специфических пар праймеров (прямой и обратный) с 3 мкл кДНК (разведение 2-100 раз) и 5 мкл 2-кратной смеси SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix. Каждая проба исследовалась в 2 повторях. Программа ПЦР: 50°C 2 мин (1 цикл), 95°C 10 мин (1 цикл), 95°C 15 сек (1 цикл), далее 45 циклов 95°C 15 сек, 60°C 30 сек, 72°C 30 сек. Программа плавления в конечной точке

65–95 °С, шаг 0,5 °С 10 сек. На экране компьютера (в реальном времени) регистрировались уровни флуоресценции, интеркалирующего в ДНК красителя SYBR Green в виде кривых накопления ДНК-амплификатов. Количество оценивалось по пороговым циклам (Cq) начала логарифмической фазы синтеза. Негативный контроль (проба, не содержащая кДНК) не давал специфических ПЦР-продуктов.

Олигонуклеотидные ПЦР-праймеры

Структуры олигонуклеотидных праймеров, использованные в работе, были взяты из PrimerBank. Синтез олигонуклеотидов осуществлен фирмой ЗАО «Евроген» (Россия).

Расчеты уровней экспрессии генов и статистическая обработка

Расчет значений 50% цитотоксической концентрации (CC₅₀) выполняли общепринятыми для биологических исследований методами при помощи пакета программ Microsoft Excel 5.0 и GraphPad Prism 6.01. За рабочую модель для анализа CC₅₀ принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты меню «Нелинейная регрессия» — Sigmoidal doseresponse (variable slope)).

Обработка данных амплификации выполнена в программе CFX Maestro (Bio-rad, США) в автоматическом режиме. Определены стандартные отклонения величин Cq±SD логарифмической фазы и изменения уровней в опытных пробах (дельта Cq±SD). Ген 18S рибосомальная РНК использовался как стабильный референс-нормализатор генной экспрессии. Специфичность ДНК-продуктов устанавливали по Т-плавления.

Изменения активности генов (2deltaCq) в опытных образцах клеток определяли относительно контрольных, принятых равными 1.

Результаты и обсуждение

Оценка цитотоксичности препаратов Циклоферон® и Циклоферон L

После обработки результатов исследования цитотоксического действия препаратов Циклоферон® и Циклоферон L на культуру клеток ТНР-РМА Мф с использованием красителя МТТ с помощью программы GraphPad Prism 6.01 была построена аналитическая кривая, из которой определено значение CC₅₀. Концентрация, уменьшающая значение оптической плотности на 50% по сравнению с контролем, составила 2,028 мг/мл для препарата Циклоферон® (рис. 1А) и 1,877 мг/мл для Циклоферона L (рис. 1Б).

Таким образом при проведении экспериментов в культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф препараты Циклоферон® и Циклоферон L использовали в нетоксичных концентрациях.

Транскрипционная активность генов TLR/RLR-рецепторов (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 и RIG-I) в культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф при действии препаратов Циклоферон® и Циклоферон L

Суммарные данные двух серий экспериментов, в которых изучалось влияние препаратов Циклоферон® и Циклоферон L на уровни генной экспрессии TLR/RLR-рецепторов (2deltaCq) в опытных образцах клеток относительно контрольных значений, принятых равными 1, позволили выявить следующие изменения актив-

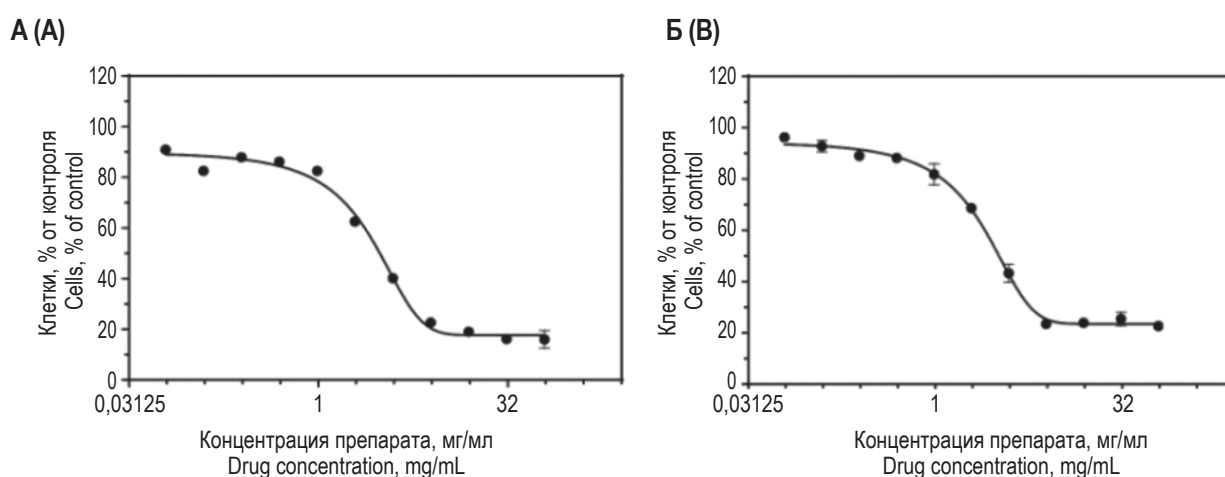


Рисунок 1. Определение цитотоксического действия препарата Циклоферон® (А – CC₅₀ = 2,028 мг/мл) и Циклоферон L (Б – CC₅₀ = 1,877 мг/мл) через 48 ч после добавления к культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф (с использованием красителя МТТ)

Figure 1. Determination of the cytotoxic effect of the drug Cycloferon® (A, CC₅₀ = 2.028 mg/mL) and Cycloferon L (B, CC₅₀ = 1.877 mg/mL) 48 hours after adding THP-RMA Mφ to the macrophage cell culture (using MTT dye)

ности (в скобках представлены данные кратности максимальной стимуляции активности генов в двух сериях экспериментов). В культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф препарат Циклоферон® в концентрации 156 мкг/мл, 312 мкг/мл и 625 мкг/мл на 24 часа экспозиции в двух сериях экспериментов стабильно дозо-зависимо стимулировал экспрессию генов рецепторов TLR2 (59,08 и 18,9), TLR3 (381,63 и 950,22), TLR4 (165,74 и 78,14), TLR7 (110,19 и 13,11), TLR8 (18,51 и 88,72) (рис. 2). Обращает на себя внимание кратность стимуляции экспрессии генов TLR3 на сроке 24 часа, которая значительно возрастает (дозовая зависимость) с увеличением концентрации препарата Циклоферон® (156 мкг/мл – 40,9 и 118,35; 312 мкг/мл – 164,11 и 270,13; 625 мкг/мл – 381,63 и 950,22). Стимуляция экспрессии TLR9 в 5,16 и 3,04 раз выявлена только в одном эксперименте на 1 и 24 часа соответственно экспозиции с препаратом Циклоферон® в концентрации 156 мкг/мл. Обнаружена также стабильная стимуляция (максимально в 8,7 раза) экспрессии генов RIG1 рецепторов при экспозиции с препаратом Циклоферон® практически почти во всех исследованных концентрациях на сроке 4 час в двух сериях экспериментов.

При изучении экспрессии генов TLR/RLR-рецепторов в культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф при действии препарата Циклоферон L было выявлено в двух сериях экспериментов стабильное возрастание экспрессии генов TLR2 (21,35 и 8,43), TLR3 (86,62 и 386,26), TLR4 (39,48 и 21,55), TLR7 (54,50 и 6,21), TLR8 (7,94 и 34,73) только на сроке экспозиции 24 часа при одной концентрации препарата Циклоферон L (312 мкг/мл) (рис. 3). Экспрессия гена TLR9 (кратность стимуляции 4,25) обнаружена только в одном эксперименте. Не обнаружено экспрессии генов RIG1 при действии препарата Циклоферон L.

Обобщая данные, полученные при исследовании индукторов ИФН препаратов Циклоферон® и Циклоферон L, можно говорить об их способности стимулировать экспрессию генов TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 (и RIG1 для препарата Циклоферон®) и синтез мРНК этих рецепторов, которые и определяют синтез непосредственно рецепторов врожденного иммунитета. Наши исследования в культуре макрофагов ТНР-РМА Мф подтвердили ранее полученные в клетках крови данные Т.М. Соколовой и соавт. [3, 4] об активации генной экспрессии TLR3 и TLR9 и дополнительно выявили экспрессию генов TLR2,

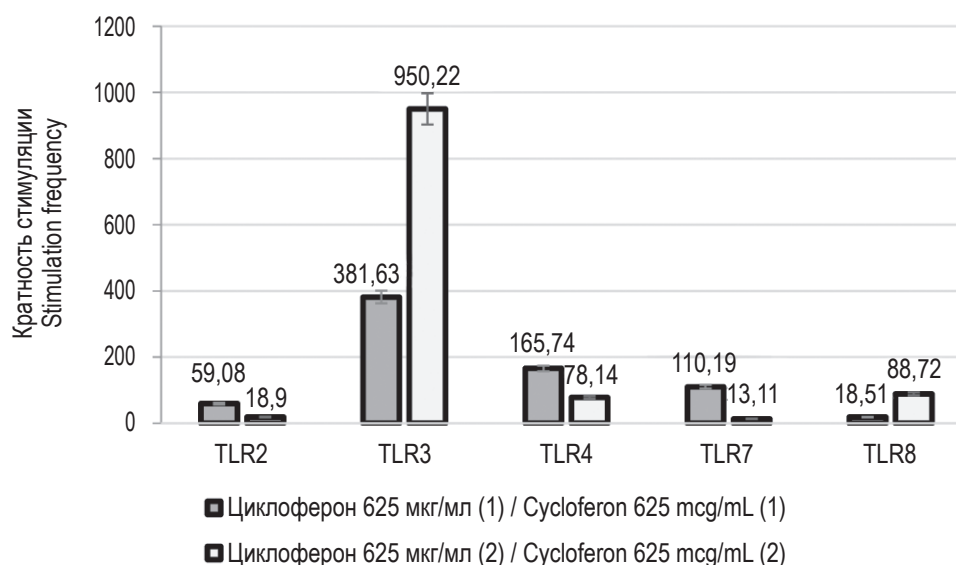


Рисунок 2. Экспрессия генов TLRs при экспозиции 24 часа с Циклофероном® в концентрации 625 мкг/мл в культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф

Примечание. По оси ординат – кратность стимуляции генной экспрессии. По оси абсцисс – название препарата и концентрация. В скобках обозначен номер эксперимента.

Figure 2. Expression of TLRs genes upon exposure for 24 hours to Cycloferon® at a concentration of 625 µg/mL in a culture of macrophage cells THP-RMA Mf

Note. The y-axis is the frequency of stimulation of gene expression. The x-axis is the drug name and concentration. The experiment number is indicated in parentheses.

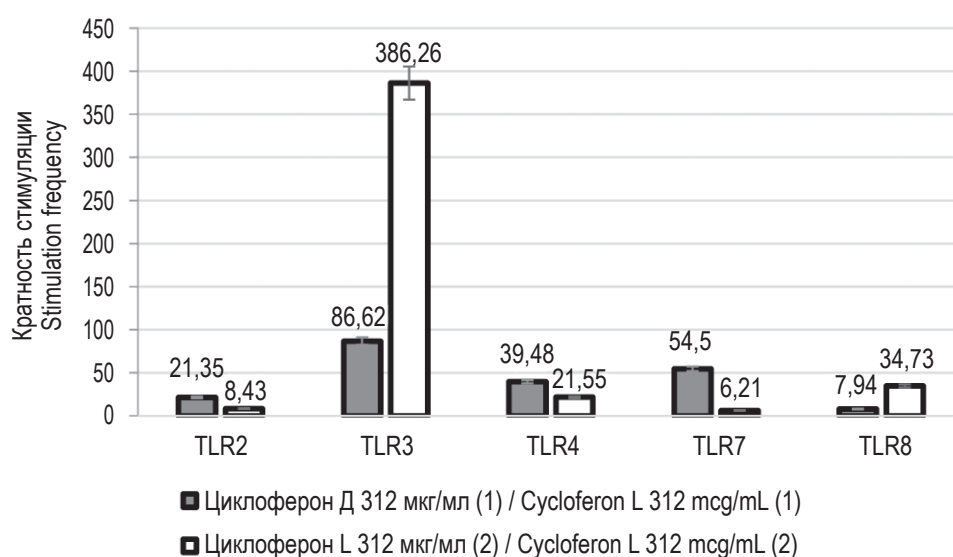


Рисунок 3. Экспрессия генов TLRs при экспозиции 24 часа с Циклофероном Л в концентрации 312 мкг/мл в культуре клеток макрофагов ТНР-РМА Мф

Примечание. См. примечание к рисунку 2.

Figure 3. Expression of TLRs genes upon exposure for 24 hours to Cycloferon L at a concentration of 312 µg/mL in the THP-RMA Mf macrophage cell culture

Note. As for Figure 2.

TLR4, *TLR7*, *TLR8* и *RIG1* для препарата Циклоферон®.

Известно, что рецепторы TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и IL1R, расположенные на клеточной плазматической мембране, запускают каскад сигналов через MyD88-регулируемый путь, который не связан с индукцией генов *IFN*. Исключение составляет только рецептор TLR4, который задействует TRIF-зависимый механизм индукции синтеза *IFN*. Эндосомальные рецепторы TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 с использованием MyD88 and TRIF адапторов также формируют сигнальный механизм активации *IFN*-регулируемых факторов транскрипции IRF3, IRF5 и IRF7, который приводит к индукции генов *IFN* [10, 12]. Интересно, что в клетках цельной крови Циклоферон® также стимулировал экспрессию генов *IRF3* и *IRF7*, *IFNβ1* и *IFNγ*. [4, 5].

Заключение

Разработка препаратов, активирующих экспрессию *TLR/RLR*-генов, является важной задачей иммунофармакологии [15]. Кроме того, такие препараты довольно часто одновременно являются «мультицелевыми» препаратами, что представляет исключительный интерес для современного здравоохранения. В связи с этим обращают на себя внимание противовирусные препараты, которые сочетают свойства интерферогенов и иммуномодуляторов, к которым также принадлежит Циклоферон® и его аналоги. Таким образом, Циклоферон® и его аналог Циклоферон Л являются регуляторами генной экспрессии *TLR/RLR*-рецепторов врожденного иммунитета, и стимулируют экспрессию генов *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR8* и *RIG1* в модели макрофаг-подобных клеток.

Список литературы / References

1. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. 368 с. [Ershov F.I., Kiselev O.I. Interferons and their inducers (from molecules to drugs). Moscow: GEOTAR-Media, 2005. 368 p.]
2. Соколова Т.М., Кособокова Е.Н., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Косоруков В.С., Ершов Ф.И. Активность генов системы интерферона в клетках аденокарциномы толстого кишечника HCT-116: регуляция рекомбинантными интерферонами альфа-2 из бактериальных и растительных продуцентов // Российский биотерапевтический журнал, 2013. № 3. С. 39-44. [Sokolova T.M., Kosobkova E.N., Shuvalov A.N., Shapoval I.M., Kosorukov V.S., Ershov F.I. of Interferon system gene activity in colon adenocarcinoma cells HCT-116: regulation by interferon-alpha-2B from bacteria or plants. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2013, no. 3, pp. 39-44. (In Russ.)]

3. Соколова Т.М., Полосков В.В., Бурова О.С., Шувалов А.Н., Соколова З.А., Иншаков А.Н., Шишкин Ю.В., Ершов Ф.И. Действие интерферонов и индукторов интерферонов на экспрессию генов рецепторов TLR/RLR и дифференцировку опухолевых линий клеток ТНР-1 и НСТ-116 // Российский биотерапевтический журнал, 2016. Т. 15, № 3. С. 28-33. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Burova O.S., Shuvalov A.N., Sokolova Z.A., Inshakov A.N., Shishkin Yu.V., Ershov F.I. Action of interferons and IFN-inducers on TLR/RLRs genes expression and differentiation of tumor cell lines THP-1 and HCT-116. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2016, Vol. 15, no. 3, pp. 28-33. (In Russ.)]
4. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Ершов Ф.И. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами Ридостин, Циклоферон и Ингавирин // Цитокины и воспаление, 2015. № 2. С. 26-34. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signal transduction genes with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospaleniye = Cytokines and Inflammation*, 2015, no. 2, pp. 26-34. (In Russ.)]
5. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Соколова З.А., Ершов Ф.И. Активация генов сигнальных путей иммунитета: различная индивидуальная чувствительность клеток крови человека к препаратам интерферонов и индукторов IFN // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 7-18. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Shapoval I.M., Sokolova Z.A., Ershov F.I. Activation of genes controlling the immune signaling pathways: differential individual sensitivity of human blood cells for interferon preparations and IFN inducers. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-7-18.
6. Суханов Д.С., Романцов М.Г., Смагина Ф.И., Коваленко А.Л., Локтева О.М. Доза зависимая интерферон индуцирующая активность и фармакокинетика циклоферона у здоровых лиц // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2012. № 75. С. 23-26. [Sukhanov, D.S., Romantsov M.G., Smagina F.I., Kovalenko A.L., Lokteva O.M. Dose-dependent interferon-inducing activity and pharmacokinetics of cycloferon in healthy individuals. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2012, no. 75, pp. 23-26. (In Russ.)]
7. Assay Guidance Manuel. Available at: <http://www.ncgc.nih.gov/guidance/section2.html>.
8. El-Zayat S.R., Sibai H., Mannaa F.A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull. Natl Res. Cent.*, 2019, Vol. 43, 187. doi: 10.1186/s42269-019-0227-2.
9. Fitzgerald K.A., Kagan J.C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, 2020, Vol. 180, no. 6, pp. 1044-1066.
10. Kawai T., Akira S. Signaling to NF-kappaB by toll-like receptors. *Trends Mol. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 11, pp. 460-569.
11. Kramer M.J., Cleeland R., Grunberg E. Antiviral Activity of 10-Carboxymethyl-9-Acridanone. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1976, Vol. 9, no. 2, pp. 233-238.
12. Mancino A., Lawrence T. Nuclear factor-κB and tumor-associated macrophages. *Clin. Cancer Res.*, 2010, Vol. 16, pp. 784-789.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, Vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63.
14. Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Kiselev A.A., Gorshkov A.N., Shurygina A.-P.S., Vasilyev K.A., Uciechowska-Kaczmarzyk U., Samsonov S.A., Kovalenko A.L., Vasin A.V. Meglumine acridone acetate, the ionic salt of CMA and N-methylglucamine, induces apoptosis in human PBMCs via the mitochondrial pathway. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, 18240. doi: 10.1038/s41598-019-54208-9.
15. Tarte S., Takeuchi O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *Int. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 6, pp. 1-17.

Авторы:

Наровлянский А.Н. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитокинов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Полосков В.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории цитокинов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Мезенцева М.В. — д.б.н., руководитель лаборатории культур тканей ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Narovlyansky A.N., PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, Cytokine Laboratory, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Poloskov V.V., PhD (Medicine), Research Associate, Cytokine Laboratory, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Mezentseva M.V., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Tissue Cultures, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Суетина И.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории культур тканей ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Цветнов А.В. — младший научный сотрудник лаборатории цитокинов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Богданов Е.Ю. — лаборант-исследователь лаборатории цитокинов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Федякина И.Т. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории экологии вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Коваленко А.Л. — д.б.н., ведущий научный сотрудник химико-аналитического отдела ФГБУ «Научно-консультативный центр токсикологии имени С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Ершов Ф.И. — д.м.н., академик РАН, главный научный сотрудник отдела интерферонов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Suetina I.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Tissue Cultures, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Tsvetnov A.V., Junior Research Associate, Cytokine Laboratory, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Bogdanov E.Yu., Research Assistant, Cytokine Laboratory, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Fedyakina I.T., PhD (Biology), Leading Research Associate, Head of the Laboratory of Virus Ecology, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Kovalenko A.L., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Chemical-Analytical Department, S. Golikov Scientific Advisory Center of Toxicology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, St. Petersburg, Russian Federation

Ershov F.I., PhD, MD (Medicine), Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief Research Associate, Interferon Department, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.03.2024
Отправлена на доработку 30.03.2024
Принята к печати 04.04.2024

Received 29.03.2024
Revision received 30.03.2024
Accepted 04.04.2024

РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ И РЕАЛИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В УСЛОВИЯХ БЛОКИРОВАНИЯ СИНТЕЗА ГЛУТАТИОНА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Носарева О.Л., Степовая Е.А.

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Томск, Россия

Резюме. Лимфоциты являются одними из ключевых клеток воспаления. Реализация воспаления, сопровождающаяся развитием окислительного стресса, зависит от метаболических процессов, протекающих в лимфоцитах крови. Экспериментальные исследования молекулярного управления редокс-статусом и апоптотической гибелью лимфоцитов крови являются актуальными для изучения роли лимфоцитов в патогенезе воспаления. Ведущую роль в поддержании редокс-статуса и окислительной модификации белков лимфоцитов крови играет система глутатиона. Изучение молекулярных механизмов участия окислительной модификации белков в условиях блокирования синтеза глутатиона лежит в основе таргетного управления апоптозом лимфоцитов. Одним из молекулярных подходов экспериментальной науки для изучения клеточного метаболизма является ингибиторный анализ, который позволяет оказывать воздействие на определенные этапы биохимических процессов. Целью исследования явилось установление роли окислительной модификации белков в редокс-регуляции и реализации клеточной гибели лимфоцитов крови в условиях блокирования синтеза глутатиона при окислительном стрессе. В эксперименте изучен эффект воздействия ингибитора синтеза глутатиона *de novo* бутионинсульфоксимида в конечной концентрации 1 мМ на состояние системы глутатиона: содержание восстановленного и окисленного глутатиона, активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы; на параметры окислительного стресса: концентрация гидроксильного радикала, активных форм кислорода, свободных SH-групп белков; на обратимую и необратимую окислительную модификацию белков: содержание глутатиона, связанного с белками, карбонильных производных белков, окисленного триптофана и битирозина; на реализацию и регуляцию апоптотического типа гибели: количество аннексин V⁺ клеток и активность каспазы-3 в лимфоцитах крови. Блокирование синтеза глутатиона *de novo* в лимфоцитах крови сопровождалось формированием окислительного стресса, дисбалансом системы глутатиона, изменением окислительной модификации белков, сопряженным с активацией реализации и завершенности апоптоза. Полученные результаты свидетельствуют

Адрес для переписки:

Носарева Ольга Леонидовна
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (923) 411-19-51.
E-mail: olnosareva@yandex.ru

Address for correspondence:

Olga L. Nosareva
Siberian State Medical University
2 Moskovsky Trakt
Tomsk
634050 Russian Federation
Phone: +7 (923) 411-19-51.
E-mail: olnosareva@yandex.ru

Образец цитирования:

О.Л. Носарева, Е.А. Степовая «Роль окислительной модификации белков в регуляции и реализации клеточной гибели лимфоцитов крови в условиях блокирования синтеза глутатиона при окислительном стрессе» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 671-676. doi: 10.15789/1563-0625-ROO-16615

© Носарева О.Л., Степовая Е.А., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.L. Nosareva, E.A. Stepovaya "Role of oxidative modification of proteins in the regulation and realization of cell death of blood lymphocytes under the conditions of blocking glutathione synthesis under oxidative stress", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 671-676.
doi: 10.15789/1563-0625-ROO-16615

© Nosareva O.L., Stepovaya E.A., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ROO-16615

ют об участии компонентов системы глутатиона в обратимой и необратимой окислительной модификации протеинов, редокс-регуляции и реализации апоптоза лимфоцитов крови. Таким образом, изменение редокс-гомеостаза с помощью глутатионилирования и карбонилирования белков клеток представляет собой один из персонафицированных механизмов управления апоптозом.

Ключевые слова: лимфоциты крови, редокс-статус клетки, апоптоз, система глутатиона, окислительная модификация белков, буютионинсульфоксимин

ROLE OF OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS IN THE REGULATION AND REALIZATION OF CELL DEATH OF BLOOD LYMPHOCYTES UNDER THE CONDITIONS OF BLOCKING GLUTATHIONE SYNTHESIS UNDER OXIDATIVE STRESS

Nosareva O.L., Stepovaya E.A.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Lymphocytes are key cells in inflammation. The realization of inflammation accompanied by the development of oxidative stress depends on metabolic processes occurring in blood lymphocytes. Experimental studies of molecular control of the redox status and apoptotic death of blood lymphocytes are relevant to study the role of lymphocytes in the pathogenesis of inflammation. The glutathione system plays a leading role in maintaining the redox status and oxidative modification of blood lymphocyte proteins. The study of molecular mechanisms of oxidative modification of proteins under the conditions of blocking glutathione synthesis is the basis for the targeting control of lymphocyte apoptosis. Inhibitory analysis is a molecular approach in experimental science used to study cellular metabolism by targeting specific stages of biochemical processes. The aim of the research was to determine the role of oxidative protein modification in redox regulation and cell death of blood lymphocytes when glutathione synthesis is inhibited during oxidative stress. The effect of exposure to the *de novo* glutathione synthesis inhibitor buthionine sulfoximine at a final concentration of 1 mM on the state of the glutathione system was studied in the experiment: content of reduced and oxidized glutathione, activity of glutathione reductase and glutathione peroxidase; on oxidative stress parameters: concentration of hydroxyl radical, reactive oxygen species, free SH-groups of proteins; on reversible and irreversible oxidative modification of proteins: content of glutathione bound to proteins, carbonyl derivatives of proteins, oxidized tryptophan and bityrosine; on realization and regulation of apoptotic death type: the number of annexin V⁺ cells and caspase-3 activity in blood lymphocytes. Blocking of *de novo* glutathione synthesis in blood lymphocytes was accompanied by the formation of oxidative stress, imbalance of glutathione system, changes in oxidative modification of proteins associated with the activation of apoptosis realization and completion. The obtained results indicate the participation of glutathione system components in reversible and irreversible oxidative modification of proteins, redox regulation and realization of apoptosis of blood lymphocytes. Therefore, modifying redox homeostasis through glutathionylation and carbonylation of cell proteins is a personalized apoptosis control mechanism.

Keywords: blood lymphocytes, cell redox-status, apoptosis, glutathione system, oxidative protein modification, buthionine sulfoximine

Введение

Лимфоциты крови являются ключевыми клетками в реализации срабатывания иммунной защиты и процессов воспаления в организме. Нарушение метаболизма иммунно-компетентных клеток способствует не только снижению защитной функции всего организма, но и дисрегуляции процессов гибели клеток. Все это может приводить к формированию ряда заболеваний, например: онкологических, сердечно-сосудистых, аутоиммунных, дегенеративных забо-

леваний нервной и соединительной ткани, сопряженных с развитием воспаления [12, 14, 15]. Важное значение в реализации функций лимфоцитов имеет редокс-статус клеток [3, 14]. Изменение окислительно-восстановительного профиля белков лимфоцитов крови способствует их вовлечению в процесс инициации и реализации воспаления. Все большую актуальность приобретают исследования, посвященные участию окислительной модификации белков в реализации ключевых процессов в клетках, в том числе

апоптоза. Таким образом, целью исследования явилось установление роли окислительной модификации белков в редокс-регуляции и реализации клеточной гибели лимфоцитов крови в условиях блокирования синтеза глутатиона при окислительном стрессе.

Материалы и методы

Для постановки эксперимента использовали лимфоциты, выделенные из фракции мононуклеарных лейкоцитов крови у здоровых лиц (11 мужчин и 12 женщин в возрасте от 20 до 45 лет, исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России протокол № 4267 от 21.09.2015 г.). Для процедуры взятия крови были использованы вакутейнеры Becton Dickinson Vacutainer™ (США) с антикоагулянтом гепарином натрия (25 Ед/мл). Выделение мононуклеарных лейкоцитов из венозной крови проводилось с соблюдением стерильных условий методом центрифугирования на градиенте плотности Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich, США) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) с последующим отделением лимфоцитов на градиенте плотности Перколл (Sigma-Aldrich, США) ($\rho = 1,130 \text{ г/см}^3$). Для постановки эксперимента использовали клетки, среди которых было не менее 95% жизнеспособных. Жизнеспособность лимфоцитов крови определяли с использованием красителя 0,4%-ного раствора трипанового синего (Serva, США).

Для оценки влияния бутионинсульфоксими на на систему глутатиона, окислительную модификацию белков, регуляцию и реализацию клеточной гибели лимфоциты крови инкубировали в полной питательной среде, включающую: 90% RPMI-1640 (АО «Вектор-Бест», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), подвергнутой инаktivации в течение 30 минут при температуре 56 °С, 2 мМ Нерес (Flow, Великобритания), гентамицина (100 мкг/мл) (KRKA, Словения), L-глутамина (0,3 мг/мл) (АО «Вектор-Бест», Россия); в 5%-й влажной атмосфере CO₂ в течение 18 ч при 37 °С при добавлении ингибитора ключевого фермента синтеза глутатиона — γ -глутамилцистеинсинтетазы — бутионинсульфоксими (BSO) (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 1 мМ [9].

По окончании времени инкубации лимфоциты подвергали процедуре отмывания от среды инкубирования посредством 0,01 М раствора натрий-фосфатного буфера (рН = 7,4) (Amresco, США). Оценка состояния системы глутатиона, содержания свободных SH-групп белков и глутатиона, связанного с белками, проводилась после предварительной депротенинизации лизата лимфоцитов с помощью 5%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Для определения

содержания карбонильных производных белков, битирозина, окисленного триптофана и активности каспазы-3 лимфоциты лизировали с помощью 1%-ного раствора тритона X-100 (PanReac, Испания) при 0 °С.

Методом проточной цитометрии (цитометр (FACS Canto™ II, Becton Dickinson, США) и программное обеспечение FACSDiva Version 6.1.3 (Becton Dickinson, США)) определяли: содержание активных форм кислорода (АФК) по способности взаимодействия 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата (Sigma-Aldrich, США) с липидными пероксидами и H₂O₂ [7]; число апоптотных лимфоцитов оценивали с использованием FITC-меченного аннексина V и пропидия йодида (PI) согласно протоколу фирмы-производителя (ANNEXIN V FITC Kit, TREVIGEN, США).

Спектрофотометрическим методом (спектрофотометр СФ-2000-02 (ООО «ОКБ Спектр», Россия)) определяли: внутриклеточную концентрацию ОН-радикала по его способности в опсонизированных клетках зимозаном (Sigma-Aldrich, США) разрушать модельный субстрат — 2-дезоксид-рибозу (Sigma-Aldrich, США) [11]; содержание восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) — посредством каталитической рециркуляции и блокирования SH-групп трипептида 2-винилпиридином (Wako, Япония) с последующим взаимодействием GSH с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой (Sigma-Aldrich, США) и образованием продукта реакции с максимумом поглощения при 412 нм [8], далее рассчитывали величину редокс-статуса клетки путем вычисления отношения GSH к GSSG; концентрацию свободных SH-групп белков — по способности их реагирования с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой [4]; содержание глутатиона, связанного с протеинами — после предварительного его высвобождения из соединения с белками с помощью 1%-ного раствора NaBH₄ (Sigma-Aldrich, США) [4]; активность глутатионредуктазы (EC 1.8.1.7) — по НАДФН-зависимому восстановлению GSSG (Sigma-Aldrich, США) и последующем взаимодействии GSH с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой [13]; активность глутатионпероксидазы (EC 1.11.1.9) — по способности взаимодействия субстрата GSH (Sigma-Aldrich, США) с гидропероксидом трет-бутила (Sigma-Aldrich, США) [2].

Спектрофлуориметрическим методом (спектрофлуориметр CM 2203 (ЗАО «СОЛАР», Беларусь)) определяли: содержание окисленного триптофана — при длине волны возбуждения 295 нм и длине волны испускания 325 нм, а флуоресценцию битирозина — при длине волны возбуждения 325 нм и длине волны испускания 415 нм [1, 6]; активность каспазы-3 (EC 3.4.22.56) пу-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА, ПАРАМЕТРЫ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА, ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ И АПОПТОЗА В УСЛОВИЯХ БЛОКИРОВАНИЯ СИНТЕЗА ГЛУТАТИОНА БУТИОНИНСУЛЬФОКСИМИНОМ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CONTENT OF REACTIVE OXYGEN FORMS, PARAMETERS OF GLUTATHIONE SYSTEM, OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS AND APOPTOSIS UNDER THE CONDITIONS OF BLOCKING GLUTATHIONE SYNTHESIS BY BUTHIONINE SULFOXIMINE IN BLOOD LYMPHOCYTES, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Условия инкубирования лимфоцитов крови Conditions of incubation of blood lymphocytes	
	Лимфоциты интактные Intact lymphocytes	Лимфоциты + BSO Lymphocytes + BSO
ОН-радикал, нмоль/мг белка OH-radical, nmol/mg protein	46,165 (36,305-55,040)	161,610 (148,720-184,620) p < 0,000379
АФК, у. е. ROS, c. u.	0,105 (0,099-0,122)	0,194 (0,167-0,203) p < 0,003948
GSH, нмоль/мг белка GSH, nmol/mg protein	0,747 (0,741-0,880)	0,238 (0,194-0,315) p < 0,001946
GSSG, нмоль/мг белка GSSG, nmol/mg protein	0,110 (0,099-0,114)	0,175 (0,069-0,223) p = 0,438579
GSH/GSSG	7,165 (6,520-8,000)	1,645 (1,275-3,035) p < 0,001946
Глутатионредуктаза, нмоль/мин × мг белка Glutathione reductase, nmol/min × mg protein	312,80 (287,08-321,70)	76,30 (69,79-79,45) p < 0,001745
Глутатионпероксидаза, мкмоль/мин × мг белка Glutathione peroxidase, μmol/min × mg protein	5,680 (5,055-6,995)	5,585 (4,065-6,970) p = 0,599511
Свободные SH-групп белков, нмоль/мг белка Free SH-group proteins, nmol/mg protein	2,843 (1,792-2,940)	0,243 (0,197-0,365) p < 0,003948
Глутатион, связанный с белками, нмоль/мг белка Glutathione bound to proteins, nmol/mg protein	0,050 (0,040-0,062)	0,075 (0,062-0,092) p < 0,030640
Карбонилированные производные белков, нмоль/мг белка Protein carbonyl derivatives, nmol/mg protein	0,149 (0,142-0,151)	0,326 (0,309-0,332) p < 0,003948
Окисленный триптофан, у. е./мг белка Oxidized tryptophan c. u./mg protein	2,307 (2,155-2,339)	1,823 (1,792-2,710) p = 0,194852
Битирозин, у. е./мг белка Bityrosine, c. u. /mg protein	0,132 (0,127-0,198)	0,152 (0,132-0,169) p = 0,953011
Аннексин-V⁺ клетки, % Annexin V ⁺ cells, %	23,115 (21,900-24,500)	42,200 (29,600-45,000) p < 0,006170
Каспаза-3, пмоль/мин × мг белка Caspase-3, pmol/min × mg protein	108,440 (103,482-112,662)	133,870 (130,544-150,230) p < 0,003948

Примечание. АФК – активные формы кислорода; GSH – восстановленный глутатион; GSSG – окисленный глутатион; BSO – бутионинсульфоксимин; p – уровень значимости различий по сравнению с группой «лимфоциты интактные».

Note. ROS, reactive oxygen species; GSH, Reduced glutathione; GSSG, Oxidized glutathione; BSO, buthionine sulfoximine; p, significance level of the differences as compared to the intact lymphocytes group.

тем гидролиза субстрата N-ацетил-(Асп-Глу-Вал-Асп)-7-амино-4-метилкумарина (Sigma-Aldrich, США) с образованием флюоресцирующего продукта — амино-4-метилкумарина при длине волны возбуждения 380 нм и длине волны испускания 430–460 нм [5, 10].

Спектрофотометрически на микропланшетном ридере Multiscan EX (Thermo LabSystems, Финляндия) при длине волны 450 нм определяли содержание карбонильных производных белков по реакции взаимодействия с 2,4-динитрофенилгидразином методом иммунно-ферментного анализа согласно протоколу фирмы-производителя (Immundiagnostik AG, Германия) набором Carbonyl Proteine ELISA Kit.

Полученные результаты подвергали статистической обработке с помощью программы Statistica 13.0. Используя критерий Шапиро–Уилка, проверяли нормальность распределения показателей. Полученные данные выражали в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для оценки значимости различий независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, для определения взаимосвязей между показателями вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В лимфоцитах крови воздействие BSO сопровождалось значимым снижением содержания GSH в 3,14 раза ($p < 0,05$) относительно показателя в интактных клетках (табл. 1). Снижение восстановленной формы тиола в лимфоцитах крови в условиях воздействия ингибитора ключевого фермента синтеза GSH — γ -глутамилцистеинсинтетазы вызвало формирование окислительного стресса, который характеризовался значимым увеличением концентрации ОН-радикала в 3,50 раза ($p < 0,05$), АФК в 1,85 раза ($p < 0,05$), а также снижением величины отношения GSH/GSSG в 4,34 раза ($p < 0,05$), на фоне сопоставимого значения содержания GSSG относительно показателей в интактных клетках (табл. 1). При этом активность глутатионредуктазы в лимфоцитах крови в условиях воздействия BSO была значимо снижена в 4,10 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимой активности глутатионпероксидазы относительно результатов в интактных клетках (табл. 1). Таким образом, со стороны системы глутатиона в условиях блокирования синтеза GSH *de novo* возникал дисбаланс. Это, в свою очередь, способствовало повреждающему действию свободных радикалов кислорода на молекулы клеток, вызывая в том числе окислительную модификацию белков. В условиях проведенного эксперимента (блокирование синтеза GSH сопровождающееся сниженной активно-

стью глутатионредуктазы) содержание восстановленной формы тиола в клетке было недостаточным для выполнения функции антиоксидантной защиты. В этом случае зафиксированное нами значимое снижение концентрации свободных SH-групп протеинов в 11,87 раза ($p < 0,05$) относительно показателя интактных клеток свидетельствует об участии белковых остатков цистеина в качестве акцепторов токсичных свободных радикалов кислорода (табл. 1). В этих условиях происходила активация как обратимой, так и необратимой окислительной модификации белков, которая выражалась в значимом увеличении концентрации глутатиона, связанного с белками, в 1,6 раза ($p < 0,05$) и карбонилированных производных белков в 2,19 раза ($p < 0,05$) на фоне сопоставимого значения содержания битирозина и окисленного триптофана относительно показателей в интактных клетках (табл. 1). При оценке выживаемости лимфоцитов крови в условиях блокирования синтеза GSH *de novo* было установлено значимое увеличение числа аннексин V⁺ клеток в 1,83 раза ($p < 0,05$) и активности каспазы-3 в 1,23 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателями в интактных клетках (табл. 1).

Выполненный нами корреляционный анализ полученных результатов в лимфоцитах крови в условиях воздействия ингибитора ключевого фермента синтеза GSH позволил установить положительные взаимосвязи между концентрацией АФК и активностью каспазы-3 ($r = +0,829$; $p < 0,05$), содержанием битирозина и числом аннексин V⁺ клеток ($r = +0,900$; $p < 0,05$), активностью глутатионредуктазы и содержанием АФК ($r = +0,829$; $p < 0,05$). Это указывает на вклад низкой активности глутатионредуктазы в формирование окислительного стресса, редокс-зависимую природу срабатывания эффекторной каспазы-3 и участие окислительно-модифицированных белков в реализации апоптоза лимфоцитов крови в условиях блокирования синтеза GSH *de novo*.

Заключение

Резюмируя вышеизложенное: окислительно-модифицированные белки выступают потенциальными мишенями для молекулярного редокс-управления клеточной гибелью лимфоцитов крови в условиях окислительного стресса, в том числе при развитии процесса воспаления. Компоненты системы глутатиона представляют собой молекулярные инструменты для управления процессом гибели лимфоцитов крови при формировании патологических процессов.

Финансирование

Публикация размещена при участии Балтийского федерального университета им. И. Канта.

Список литературы / References

1. Бекман Э.М., Баранова О.А., Губарева Е.В., Шуленина Л.В., Москвина С.Н., Данилогорская Ю.А., Азизова О.А. Оценка устойчивости к окислительному стрессу плазмы крови по уровню окисляемости белков и липидов при метаталлизированном окислении // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2006. Т. 142, № 9. С. 268-272. [Bekman E.M., Baranova O.A., Gubareva E.V., Shuleniina L.V., Moskvina S.N., Danilogorskaja Ju.A., Azizova O.A. Assessment of stability to an oksidativny stress of plasma of blood on level of oxidability of proteins and lipids at metallkataliziruyemy oxidation. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2006, Vol. 142, no. 9, pp. 268-272. (In Russ.)]
2. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. СПб.: Интермедика, 1998. Т. 2. 656 с. [Karpishchenko A.I. Medical laboratory techniques]. St. Petersburg: Intermedika, 1998, Vol. 2. 656 p.
3. Носарева О.Л., Степовая Е.А., Шахристов Е.В., Алексеева О.Н., Кузьменко Д.И., Садыкова А.А., Новицкий В.В. Роль редокс-статуса и окислительной модификации белков в реализации апоптоза лимфоцитов крови человека в норме и при экспериментальном окислительном стрессе // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2019. Т. 105, № 3. С. 327-338. [Nosareva O.L., Stepovaya E.A., Shakhristova E.V., Alekseeva O.N., Kuzmenko D.I., Sadykova A.A., Novitsky V.V. The Role of redox status and oxidative modification of proteins in implementing apoptosis in human blood lymphocytes in norm and under experimental oxidative stress. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova* = *Russian Journal of Physiology*, 2019, Vol. 105, no. 3, pp. 327-338. (In Russ.)] doi: 10.1134/S0869813919030063.
4. Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B., Leinbach E.D., Berlin R.D. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.*, 1978, Vol. 76, no. 2, pp. 439-447.
5. Cohen G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, 1997, Vol. 326, pp. 1-16.
6. Davies K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. 1. General aspects. *J. Biol. Chem.*, 1987, Vol. 262, pp. 9895-9901.
7. Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, 2004, Vol. 142, no. 2, pp. 231-255.
8. Kojima S., Nakayama K., Ishida H. Low dose gamma-rays activate immune functions via induction of glutathione and delay tumor growth. *J. Radiat. Res.*, 2004, Vol. 45, no. 1, pp. 33-39.
9. Laragione T., Bonetto V., Casoni F., Massignan T., Bianchi G., Gianazza E., Ghezzi P. Redox regulation of surface protein thiols: identification of integrin-4 as a molecular target by using redox proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, Vol. 100, no. 25, pp. 14737-14741. doi: 10.1073/pnas.2434516100.
10. Nicholson D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differ.*, 1999, Vol. 6, pp. 1028-1042.
11. Thom S.R., Elbuen M.E. Oxygen-dependent antagonism of lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 1991, Vol. 10, no. 6, pp. 413-426.
12. Todosenko N., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., Yurova K., Bograya M., Beletskaya M., Vulf M., Mikhailova L., Minchenko A., Soroko I., Khlusov I., Litvinova L. Adipocyte- and monocyte-mediated vicious circle of inflammation and obesity (review of cellular and molecular mechanisms). *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 15, 12259. doi: 10.3390/ijms241512259.
13. Worthington D.J., Rosemeyer M.A. Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation. *Eur. J. Biochem.*, 1976, Vol. 67, no. 1, pp. 231-238.
14. Zhang Z., Zhao L., Zhou X., Meng X., Zhou X. Role of inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension: New insights and potential therapeutic targets. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 13, 1098725. doi: 10.3389/fimmu.2022.1098725.
15. Zhou J., Zhu Z., Bai C., Sun H., Wang X. Proteomic profiling of lymphocytes in autoimmunity, inflammation and cancer. *J. Transl. Med.*, 2014, Vol. 12, 6. doi: 10.1186/1479-5876-12-6.

Авторы:

Носарева О.Л. — д.м.н., доцент, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Степовая Е.А. — д.м.н., профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Authors:

Nosareva O.L., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of Department of Biochemistry and Molecular Biology with Course of Clinical Laboratory Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Stepovaya E.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of Department of Biochemistry and Molecular Biology with Course of Clinical Laboratory Diagnostics, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 21.03.2024

Отправлена на доработку 23.03.2024

Принята к печати 26.03.2024

Received 21.03.2024

Revision received 23.03.2024

Accepted 26.03.2024

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВОГО ОТВЕТА В ГИПОТАЛАМУСЕ ЖИВОТНЫХ ПОД ВЛИЯНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА: ДАННЫЕ RNA-seq

Галямина А.Г.¹, Коваленко И.Л.¹, Смагин Д.А.¹, Попова Н.А.^{1,2}

¹ ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Известно, что хронический социальный стресс приводит к нарушению иммунитета у человека и экспериментальных животных, например, он приводит к усилению роста и метастазирования опухолей у экспериментальных животных и снижает выживаемость. Кроме того, нами было показано, что действие стресса проявляется также в изменении уровня экспрессии генов, вовлеченных в функционирование различных физиологических систем и, как нами показано, в головном мозге мышей, в частности в гипоталамусе. В частности было отмечено, что у стрессированных животных изменяют свою экспрессию гены, вовлеченные в процессы канцерогенеза и апоптоза, причем у животных без признаков развития злокачественного процесса, но в условиях, способствующих росту опухоли. В связи с этим методом RNA-seq была исследована экспрессия генов цитокинового ответа в гипоталамусе животных, под влиянием хронического социального стресса, вызванного повторным опытом поражений в межсамцовых конфронтациях, по сравнению с контрольными особями. Было обнаружено разнонаправленное изменение экспрессии генов цитокинов, их рецепторов и генов, выполняющих регуляторную функцию, при этом экспрессия генов *IL17D*, *IL18*, *IL33*, *IL11ra1*, *IL2ra*, *IL5ra*, *Lifr*, *Jak2*, *TLR3* была снижена, в то время как экспрессия *Csf1r*, *Csf2ra*, *IL13ra1*, *IL3ra*, *Cish*, *IL4i1*, *Irf1*, *Irf5*, *Irf9*, *Socs3*, *Stat3*, *Tgfb1* была повышена. В результате работы было показано, что нарушение цитокинового ответа в мозге под влиянием стресса происходит на уровне изменения экспрессии генов. При этом следует говорить не об активации системы или снижении ее активности, а о нарушении ее функционирования. Был проведен анализ корреляций между уровнем экспрессии генов цитокиновой системы и основных генов канцерогенеза и апоптоза, исследованных нами ранее (*Akt1*, *Bag6*, *FoxP4*, *Mapk3*, *Mapk8*, *Nol3*, *Pdcd10*, *Xiap*). В результате были выделены гены *Akt1*, *Jak2*, *Stat3*, для которых было обнаружено максимальное количество корреляций, притом для *Jak2* наиболее характерны отрицательные корреляции, а для *Stat3* и *Akt1* – положительные. Были проанализированы бе-

Адрес для переписки:

Галямина Анна Георгиевна
ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского
отделения Российской академии наук
630090, Россия, г. Новосибирск, пр. Академика
Лаврентьева, 10.
Тел.: 8 (383) 363-49-65 (доб. 5240).
E-mail: galyamina@bionet.nsc.ru

Address for correspondence:

Anna G. Galyamina
Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences
10 Acad. Lavrentiev St
Novosibirsk
630090 Russian Federation
Phone: +7 (383) 363-49-65 (acc. 5240).
E-mail: galyamina@bionet.nsc.ru

Образец цитирования:

А.Г. Галямина, И.Л. Коваленко, Д.А. Смагин, Н.А. Попова «Изменение экспрессии генов цитокинового ответа в гипоталамусе животных под влиянием хронического социального стресса: данные RNA-seq» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 677-684. doi: 10.15789/1563-0625-CIT-16769

© Галямина А.Г. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.G. Galyamina, I.L. Kovalenko, D.A. Smagin, N.A. Popova
“Changes in the cytokine response in the hypothalamus of
animals under the influence of chronic social stress: RNA-
seq data”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 677-684.
doi: 10.15789/1563-0625-CIT-16769

© Galyamina A.G. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-CIT-16769

лок-белковые взаимодействия при помощи базы данных String, что тоже подтвердило ключевую роль указанных генов в развитии нарушения функционирования цитокинов в мозге, вызванных влиянием хронического социального стресса и обеспечивающих взаимодействие между генами канцерогенеза и апоптоза и генами цитокиновой системы.

Ключевые слова: хронический социальный стресс, гипоталамус, цитокины, RNA-seq, экспрессия генов, канцерогенез, апоптоз, гены, мыши, *Jak2*, *Stat3*, *Akt1*

CHANGES IN THE CYTOKINE RESPONSE IN THE HYPOTHALAMUS OF ANIMALS UNDER THE INFLUENCE OF CHRONIC SOCIAL STRESS: RNA-seq DATA

Galyamina A.G.^a, Kovalenko I.L.^a, Smagin D.A.^a, Popova N.A.^{a, b}

^a Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. It is known that chronic social stress leads to immunity disorders in humans and experimental animals. It has been shown that the effect of stress is also manifested in changes in the level of expression of genes involved in the functioning of various physiological systems in the brain of mice, in particular, in the hypothalamus. It was noted that in stressed animals, genes involved in the processes of carcinogenesis and apoptosis change their expression, and in animals without signs of developing a malignant process, but under conditions conducive to tumor growth. In this regard, we used the RNA-seq method to study the expression of cytokine response genes in the hypothalamus of male mice under the influence of chronic social stress caused by repeated experience of defeats in intermale confrontations, compared with control individuals. Multidirectional changes in the expression of cytokine genes, their receptors and genes performing a regulatory function were detected (*IL17d*, *IL18*, *IL33*, *Csf1r*, *Csf2ra*, *IL11ra1*, *IL13ra1*, *IL2ra*, *IL3ra*, *IL5ra*, *Lifr*, *Cish*, *IL4i1*, *Irf1*, *Irf5*, *Irf9*, *Jak2*, *Socs3*, *Stat3*, *Tgfb1*, *Tlr3*). Thus, it has been shown that changes in the cytokine response in the brain under the influence of stress occur at the level of changes in gene expression. In this case, we should not talk about the activation of the system or a decrease in its activity, but about the disruption of its functioning. Next, we analyzed the correlations between the level of expression of genes of the cytokine system and the main genes of carcinogenesis and apoptosis that we studied earlier (*Akt1*, *Bag6*, *Foxp4*, *Mapk3*, *Mapk8*, *Nol3*, *Pdcd10*, *Xiap*). The *Akt1*, *Jak2*, *Stat3* genes were identified, for which the maximum number of correlations was found, moreover, negative correlations were most characteristic of *Jak2*, and positive correlations were most characteristic of *Stat3* and *Akt1*. In addition, protein-protein interactions between genes of carcinogenesis and apoptosis and genes of the cytokine system were analyzed using the String database in mice under chronic social stress. It was confirmed the key role of these genes in the development of dysfunction of cytokines in the brain.

Keywords: chronic social stress, hypothalamus, cytokines, RNA-seq, gene expression, carcinogenesis, apoptosis, genes, mice, *Jak2*, *Stat3*, *Akt1*

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-10095).

Введение

Хорошо известно, что хронический социальный стресс вызывает многочисленные нарушения в организме на уровне поведения и соматических изменений у человека и лабораторных животных. Например, он приводит к усилению роста и метастазирования опухолей у эксперименталь-

ных животных и снижает их выживаемость [11]. Под действием социального стресса происходит изменение иммунного ответа, при этом исследователи обнаруживают, как правило, активацию иммунитета и увеличение уровня провоспалительных цитокинов [3]. Причем в сходных экспериментальных условиях под воздействием хронического социального стресса наблюдались как иммунные изменения, так и усиленный рост опухолей. Кроме того, показано, что нарушения иммунитета на фоне хронического социального

стресса могут сопровождаться не только изменением общего тонуса иммунной системы, но и развитием воспалительных процессов в конкретных органах. Так, хронический стресс может вызывать развитие нейровоспаления в мозге [13], что может в дальнейшем привести к серьезным поведенческим последствиям. Известно, что существенную роль в развитии нейровоспаления и депрессии может играть повышение уровня провоспалительных цитокинов [7], являющихся сигнальными белками, отвечающими за иммунный ответ в организме.

Так как в основном процессы нейровоспаления, развиваются в гипоталамусе, отделе мозга, участвующем в гуморальной и нервной регуляции физиологических процессов, а также вовлеченном в иммунные процессы, что делает актуальным изучение изменения цитокинового ответа именно в этом отделе. В наших предыдущих работах было показано, что под влиянием стресса в гипоталамусе изменяется экспрессия многих генов [4]. В частности, было отмечено, что у стрессированных животных изменяют свою экспрессию гены, вовлеченные в процессы канцерогенеза и апоптоза [1], причем у животных без признаков развития злокачественного процесса, но в условиях, способствующих росту опухоли. Это может свидетельствовать о том, что вызванные стрессом нарушения физиологических процессов могут проявляться первоначально на уровне экспрессии генов в мозге, а не в периферических органах. Таким образом, возникал вопрос, может ли данный феномен наблюдаться для генов цитокинового ответа.

В связи с этим **целью нашего исследования** было изучить изменение экспрессии генов цитокинов в гипоталамусе самцов мышей под влиянием хронического социального стресса и установить взаимосвязь с генами белков, вовлеченных в процессы канцерогенеза и апоптоза, которые были изучены ранее [1].

Материалы и методы

Животные

Эксперименты проводили на самцах мышей линии C57BL/6 в возрасте 2,5 мес. и массой тела 26–28 г, полученных из Питомника лабораторных животных Института биоорганической химии РАН (Пушино, Московская область). Эксперимент проводили в конвенциональном виварии Института цитологии и генетики СО РАН. Все процедуры осуществляли в соответствии с международными правилами проведения экспериментов с животными (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes). Применяемые методики для

изучения поведения у мышей были одобрены Научной комиссией № 9 Института цитологии и генетики СО РАН (Март, 24, 2010, № 613).

Хронический социальный стресс

Хронический социальный стресс вызывался повторным опытом социальных поражений в ежедневных межсамцовых конфронтациях, как это подробно описано в наших предыдущих публикациях [10]. Животных попарно помещали в экспериментальные клетки, разделенные по полам прозрачной перегородкой с отверстиями. Ежедневно убирали перегородку на 10 минут, что приводило к агонистическим взаимодействиям. Во время первых 2–3 дней тестов выявляли победителей и особей, терпящих поражения при взаимодействии с одним и тем же партнером. В дальнейшем ежедневно после теста побежденного самца пересаживали в новую клетку к незнакомому агрессивному партнеру, сидящему за перегородкой. Подобные манипуляции продолжали в течение трех недель.

Экспериментальные животные были декапированы на следующий день после последней конфронтации одновременно с контрольными особями. Гипоталамус извлекался одним исследователем в соответствии с анатомическим атласом мозга (Allen Mouse Brain Atlas; <http://mouse.brainmap.org/static/atlas>). Все образцы помещались в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, США) и хранились при температуре -70°C до секвенирования. В эксперименте были исследованы две группы животных: 1) самцы, находившиеся под влиянием хронического социального стресса; 2) контрольные животные — особи без последовательного опыта агонистических взаимодействий.

Выбор генов для анализа

Мы выбрали для анализа гены, вовлеченные в работу цитокиновой системы и кодирующие цитокины, цитокиновые рецепторы и регуляторные белки по результатам анализа базы данных Gene Card <https://www.genecards.org>. Кроме того, мы исследовали корреляционные взаимодействия между впервые исследованным уровнем экспрессии генов цитокиновой системы и генов, которые были выделены в качестве ключевых для развития процессов канцерогенеза и апоптоза под влиянием хронического стресса согласно [1] (табл. 1).

RNA-seq анализ

Анализ RNA-seq был выполнен в ООО «Гено-аналитика» (<http://genoanalytica.ru>, Москва). Пакет программ Cufflinks/Cuffdiff был использован для оценки уровня экспрессии транскриптов в единицах FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) и выявления дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), уро-

ТАБЛИЦА 1. КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВОГО ОТВЕТА И КЛЮЧЕВЫХ ГЕНОВ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И АПОПТОЗА ПОД ВЛИЯНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА

TABLE 1. CORRELATIONS BETWEEN THE EXPRESSION OF CYTOKINE RESPONSE GENES AND KEY GENES OF CARCINOGENESIS AND APOPTOSIS UNDER THE INFLUENCE OF CHRONIC SOCIAL STRESS

	<i>Jak2</i>	<i>Stat3</i>	<i>Akt1</i>	<i>Bag6</i>	<i>Foxp4</i>	<i>Mapk3</i>	<i>Mapk8</i>	<i>Nol3</i>	<i>Pdcd10</i>	<i>Xiap</i>
<i>IL17d</i>	0,65	-0,58	-0,41	-0,36	-0,37	-0,46	0,50	-0,41	0,38	0,61
<i>IL18</i>	0,65	-0,61	-0,48	-0,56	-0,54	-0,54	0,51	-0,60	0,57	0,51
<i>IL33</i>	-0,13	0,19	0,25	0,25	0,49	0,31	-0,47	0,50	-0,33	-0,47
<i>Csf1r</i>	-0,74	0,76	0,81	0,72	0,66	0,73	-0,63	0,65	-0,65	-0,72
<i>Csf2ra</i>	-0,82	0,88	0,89	0,93	0,90	0,93	-0,92	0,88	-0,96	-0,86
<i>IL11ra1</i>	-0,92	0,93	0,94	0,88	0,82	0,89	-0,78	0,82	-0,83	-0,86
<i>IL13ra1</i>	0,97	-0,98	-0,97	-0,97	-0,92	-0,97	0,88	-0,94	0,95	0,90
<i>IL2ra</i>	0,73	-0,67	-0,58	-0,57	-0,35	-0,53	0,33	-0,38	0,48	0,39
<i>IL3ra</i>	-0,86	0,87	0,90	0,84	0,77	0,83	-0,70	0,78	-0,77	-0,78
<i>IL5ra</i>	0,92	-0,90	-0,85	-0,79	-0,65	-0,81	0,67	-0,65	0,73	0,75
<i>Lifr</i>	0,81	-0,85	-0,91	-0,86	-0,77	-0,87	0,78	-0,73	0,83	0,80
<i>Cish</i>	-0,86	0,81	0,75	0,69	0,54	0,68	-0,49	0,57	-0,59	-0,61
<i>IL4i1</i>	-0,88	0,93	0,97	0,99	0,92	0,96	-0,87	0,91	-0,97	-0,84
<i>lif1</i>	-0,81	0,80	0,79	0,79	0,77	0,76	-0,65	0,83	-0,73	-0,71
<i>Irf5</i>	-0,89	0,94	0,96	0,95	0,95	0,98	-0,97	0,92	-0,97	-0,96
<i>Irf9</i>	-0,87	0,92	0,98	0,95	0,90	0,94	-0,85	0,87	-0,92	-0,86
<i>Jak2</i>	1,00	-0,99	-0,94	-0,92	-0,85	-0,93	0,85	-0,87	0,88	0,90
<i>Socs3</i>	-0,84	0,86	0,82	0,82	0,75	0,86	-0,84	0,72	-0,84	-0,82
<i>Stat3</i>	-0,99	1,00	0,97	0,96	0,91	0,97	-0,90	0,91	-0,94	-0,94
<i>Tgfb1</i>	-0,74	0,82	0,85	0,87	0,90	0,91	-0,95	0,85	-0,93	-0,89
<i>TLR3</i>	0,92	-0,94	-0,95	-0,96	-0,93	-0,94	0,85	-0,95	0,92	0,87
<i>Akt1</i>	-0,94	0,97	1,00	0,99	0,94	0,99	-0,92	0,93	-0,97	-0,93
<i>Bag6</i>	-0,92	0,96	0,99	1,00	0,96	0,99	-0,93	0,96	-0,99	-0,91
<i>Foxp4</i>	-0,85	0,91	0,94	0,96	1,00	0,97	-0,97	0,99	-0,98	-0,95
<i>Mapk3</i>	-0,93	0,97	0,99	0,99	0,97	1,00	-0,96	0,96	-0,99	-0,96
<i>Mapk8</i>	0,85	-0,90	-0,92	-0,93	-0,97	-0,96	1,00	-0,96	0,97	0,98
<i>Nol3</i>	-0,87	0,91	0,93	0,96	0,99	0,96	-0,96	1,00	-0,97	-0,95
<i>Pdcd10</i>	0,88	-0,94	-0,97	-0,99	-0,98	-0,99	0,97	-0,97	1,00	0,94
<i>Xiap</i>	0,90	-0,94	-0,93	-0,91	-0,95	-0,96	0,98	-0,95	0,94	1,00

Примечание. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые корреляции. Темно-серым выделены гены канцерогенеза и апоптоза. Светло-серым выделены гены с максимальным числом статистически значимых корреляций (более 20).

Note. Statistically significant correlations are highlighted in bold. Carcinogenesis and apoptosis genes are highlighted in dark gray. Genes with the maximum number of statistically significant correlations (more than 20) are highlighted in light gray.

вень экспрессии которых статистически значимо различался у контрольных и депрессивных мышей ($p < 0,05$). Достоверность корреляционных взаимодействий оценивали в программе XLStat с использованием критерия Пирсона. Для исследования взаимодействия продуктов генов использовали базу данных STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins.)

Результаты и обсуждение

Было показано, что под влиянием хронического социального стресса в гипоталамусе изменилась экспрессия 21 гена (рис. 1). Была повышена экспрессия 12 генов: генов рецепторов цитокинов: *Csf1r* ($p < 0,038$), *Csf2ra* ($p < 0,001$), *IL11ra1* ($p < 0,020$), *IL3ra* ($p < 0,016$), кодирующих рецептор колониостимулирующего факто-

ра-1, α -субъединицу колониестимулирующего фактора-2, α -субъединицу рецептора IL-11, α -субъединицу рецептора IL-3 соответственно; генов регуляторов цитокинового ответа: *Cish* ($p < 0,014$), *Irf1* ($p < 0,026$), *Irf5* ($p < 0,017$), *Irf9* ($p < 0,004$), *Socs3* ($p < 0,001$), кодирующих цитокин индуцируемый SH2-пептид, интерферон регулирующие факторы 1, 5 и 9 и супрессор цитокинового сигналинга 3, соответственно; генов белков, регулируемых цитокинами: *IL4i1* ($p < 0,032$), *Stat3* ($p < 0,001$), *Tgfb1* ($p < 0,028$), кодирующих интерлейкин индуцируемый белок-1, трансдуктор и активатор сигнала транскрипции 3, TGF- β 1 соответственно. Снижена

была экспрессия 9 генов: генов цитокинов *IL17d* ($p < 0,021$), *IL18* ($p < 0,000$), *IL33* ($p < 0,017$), кодирующих IL-17D, IL-18 и IL-33 соответственно; генов рецепторов цитокинов *IL13ra1* ($p < 0,002$), *IL2ra* ($p < 0,003$), *IL5ra* ($p < 0,001$), *Lifr* ($p < 0,049$), кодирующих α 1 субъединицу рецептора IL-13, α -субъединицу рецептора IL-2, α -субъединицу рецептора фактора ингибитора лейкемии соответственно; генов регуляторов цитокинового ответа *Jak2* ($p < 0,009$) и *TLR3* ($p < 0,004$), кодирующих JAK-киназу и toll-like рецептор 3 соответственно.

Далее мы исследовали корреляции между уровнем экспрессии генов цитокинов и генов

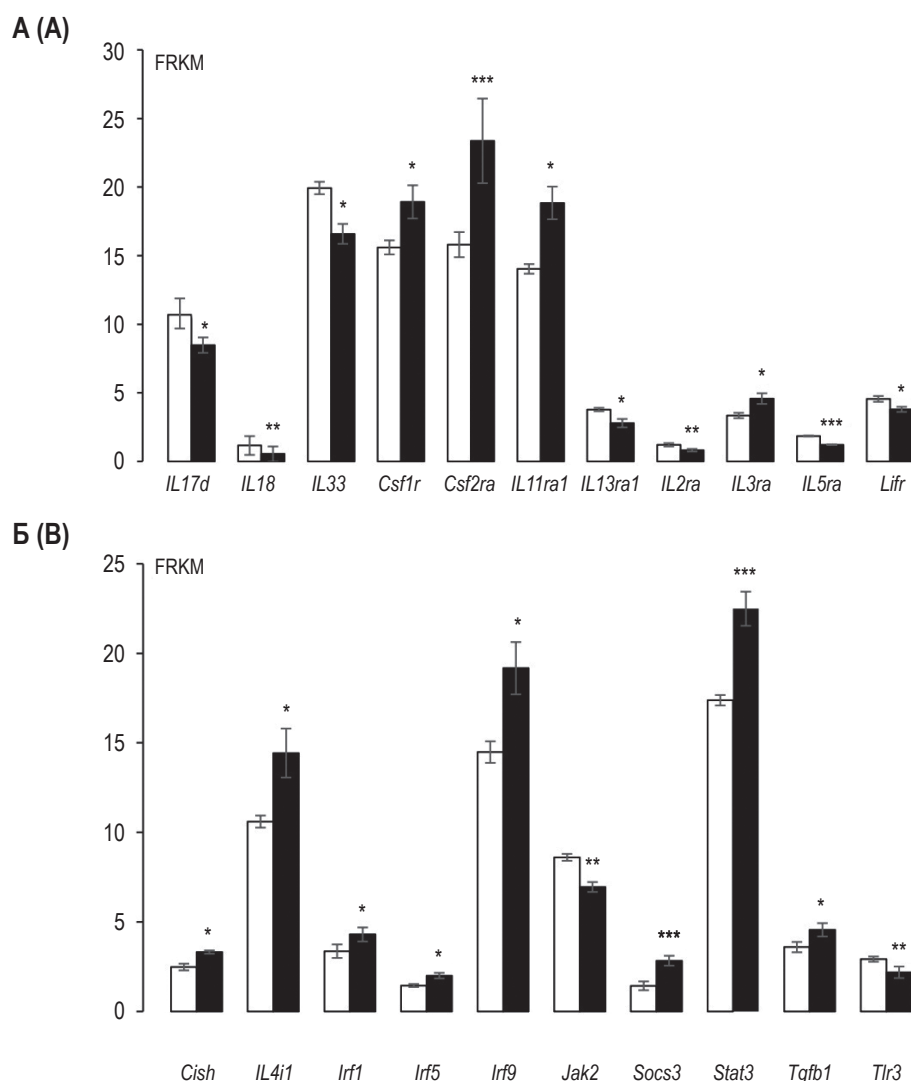


Рисунок 1. Дифференциальная экспрессия генов цитокинового ответа у животных с депрессивноподобным состоянием

Примечание. Белые столбы – контроль, черные столбы – животные под влиянием хронического социального стресса.

Достоверное отличие от контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с контролем. А – гены цитокинов; Б – гены цитокиновых рецепторов и гены регуляторных белков.

Figure 1. Differential expression of cytokine response genes in animals with a depressive-like state

Note. White columns, control; black columns, animals under the influence of chronic social stress. Significant difference from control: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared to control. A, cytokine genes; B, cytokine receptor genes and regulatory protein genes.

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ И ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КОРРЕЛЯЦИЙ ДЛЯ ГЕНОВ *Jak2*, *Stat3*, *Akt1*

TABLE 2. NUMBER OF NEGATIVE AND POSITIVE CORRELATIONS FOR THE GENES *JAK2*, *STAT3*, *AKT1*

	Всего All	«+»	«-»
<i>Jak2</i>	21	6	15
<i>Stat3</i>	21	13	8
<i>Akt1</i>	22	14	8

канцерогенеза и апоптоза. Для анализа мы выбрали гены *Akt1*, *Bag6*, *Mapk3*, *Mapk8*, *Foxp4*, *Nol3*, *Pdcd10*, *Xiap*, которые были выделены в нашей предыдущей работе [1] (табл. 1, 2) как возможные ключевые гены, обеспечивающие скоординированность патологических изменений в гипоталамусе под влиянием хронического социального стресса. Для их экспрессии был показан наиболее высокий уровень корреляции с экспрессией других исследованных нами генов, вовлеченных в механизмы канцерогенеза и апоптоза, а также наибольшее количество белок-белковых взаимодействий согласно базе данных STRING [1]. В настоящем исследовании было показано, что

наибольшее количество корреляций с экспрессией других генов цитокинового ответа и канцерогенеза и апоптоза (более 20) обнаружено для генов *Jak2*, *Stat3*, а также для гена *Akt1*, вовлеченного в процессы канцерогенеза и апоптоза. При этом для генов *Stat3* и *Akt1* преобладают положительные корреляции, в то время как для гена *Jak2* – отрицательные (табл. 2).

Далее при помощи инструмента STRING (<https://string-db.org/>) была построена генная сеть, отражающая взаимодействия ключевых генов канцерогенеза и апоптоза и отобранных нами цитокинов (рис. 2). Были выбраны гены, для продуктов которых показано максимальное число связей с белковыми продуктами других генов в базе STRING. Этот анализ также подтвердил ключевую роль генов *Stat3*, *Jak2*, *Akt1*.

Мы обнаружили существенное изменение экспрессии многих генов, вовлеченных в иммунные процессы в гипоталамусе животных под влиянием хронического социального стресса. Нами показано, что изменение цитокинового ответа в мозге обнаруживается на уровне изменения генной экспрессии. Однако нельзя однозначно говорить, что обнаруженные нами изменения свидетельствуют о развитии нейровоспаления. В частности, в нашем исследовании снижена

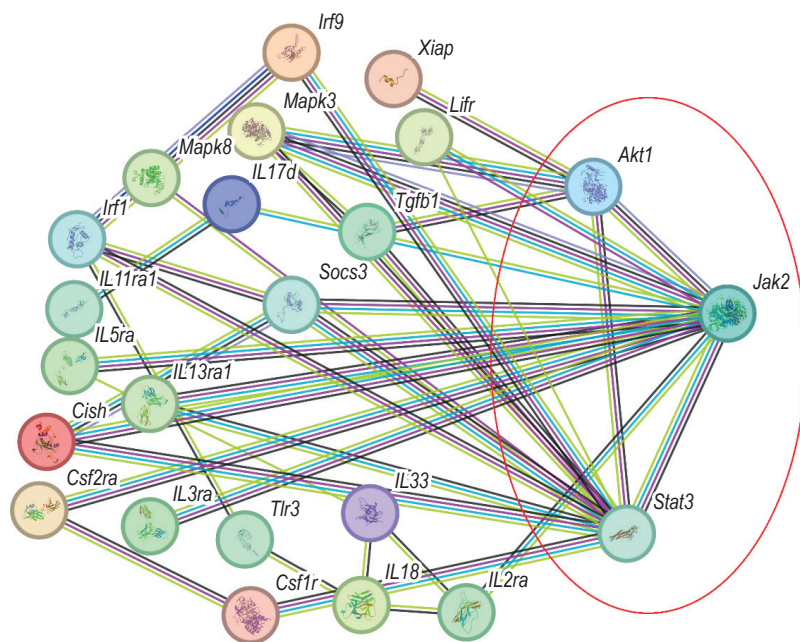


Рисунок 2. Функциональные взаимосвязи ДЭГ цитокиновой системы и ключевых ДЭГ, связанных с процессами канцерогенеза и апоптоза, установленные согласно базе данных STRING (<http://string-db.org/>) у мышей, находившихся под влиянием хронического социального стресса (high confidence, score = 0,700)

Примечание. Каждый узел представляет все белки, продуцируемые одним геном, кодирующим белок. Линии представляют собой белок-белковые ассоциации.

Figure 2. Functional relationships between DEGs of the cytokine system and key DEGs associated with the processes of carcinogenesis and apoptosis, established according to the STRING database (<http://string-db.org/>) in mice under the influence of chronic social stress (high confidence, score = 0.700)

Note. Each node represents all proteins produced by a single protein-coding gene. The lines represent protein-protein associations.

экспрессия генов *IL17d*, *IL18*, *IL33*, для продуктов которых — белков-интерлейкинов — показана активация при воспалительных процессах в мозге [2]. Аналогичным образом снижена экспрессия не только цитокинов, но и цитокиновых рецепторов. Тем не менее экспрессия генов *IL3ra*, *Csf1r*, *Csf2ra*, *IL11ra* у экспериментальных животных повышена. Это гены рецепторов цитокинов — колониестимулирующего фактора-1, колониестимулирующего фактора-2 и гены субъединиц рецепторов IL-3 и IL-11. Существуют данные, свидетельствующие о том, что главные агонисты этих рецепторов — соответствующие интерлейкины и колониестимулирующие факторы — участвуют в процессе затухания воспаления, препятствуют его переходу в хроническую форму [8]. Таким образом, можно сделать вывод, что у наших животных под действием хронического стресса не происходит развития нейровоспаления, но в то же время нельзя говорить и о снижении цитокинового ответа. Скорее следует говорить о нарушении его работы, проявляющемся в разнонаправленном изменении активности разных его элементов.

Также мы обнаружили изменение экспрессии некоторых генов, продукты которых являются регуляторами функции цитокинов. Была увеличена экспрессия генов регуляторов интерферона 1, 5 и 9, для белков которых показан провоспалительный эффект [15]. В то же время экспрессия гена супрессора передачи цитокинового сигнала 3 *Socs3*, снижающего воспалительный ответ [6], возрастала. Разнонаправленное изменение экспрессии генов, продукты которых обладают как провоспалительным, так и противовоспалительным эффектом подтверждает высказанное нами предположение о нарушении функционирования цитокиновой системы.

Далее мы выделили гены *Jak2*, *Stat3* и *Akt1* в качестве генов, которые потенциально могут играть ключевую роль в развитии нарушения функционирования цитокинов в мозге под влиянием хронического социального стресса. При этом было обнаружено, что для *Jak2* наиболее характерны отрицательные корреляции с экспрессией цитокиновых генов и генов канцерогенеза и апоптоза. В то же время для *Stat3* и *Akt1* характерны наоборот положительные корреляции. Кроме того, для этих последних генов выявлена положительная корреляция друг с другом и отрицательная с *Jak2*.

Известно, что продукты генов *Jak2* и *Stat3* являются ключевыми элементами JAK/STAT — сигнального пути, который участвует в развитии злокачественного процесса и может также взаимодействовать с PI3K/PTEN/AKT1/mTOR-сигнальным путем [14]. В данном случае PTEN действует на фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3), который является продуктом действия фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K).

Ингибирование функции PTEN вызывает увеличение концентрации фосфатидилинозитола, который активирует многие мишени, в частности AKT1, фосфорилирующие в дальнейшем белки и липиды, что в свою очередь усиливает клеточные деления и миграцию, участвуя таким образом в развитии злокачественного процесса [5]. Хотя неизвестны точные механизмы пересечения и взаимодействия этих сигнальных путей, можно предположить, что именно через продукты этих генов осуществляется взаимодействие между сигнальными системами, вовлеченными в иммунные и канцерогенные процессы.

Ген *Jak2* кодирует нерецепторную тирозин киназу, которая является активатором продукта гена *Stat3*, который в фосфорилированном состоянии является транскрипционным фактором, инициирующим транскрипцию многих генов, вовлеченных в иммунные и канцерогенные процессы. Кроме того, показано вовлечение этого сигнального пути в развитие опухолей головного мозга — глиобластомы, в то время как ингибирование STAT3 может представлять из себя интерес для лечения этого заболевания [9]. Характерно, что в нашем исследовании изменение экспрессии этих генов разнонаправлено. Можно предположить, что это связано с истощением JAK2, активированного ранее, в то время как включающийся в работу позднее STAT3 не успевает достигнуть максимальных значений. Косвенным подтверждением этого может служить снижение экспрессии гена *IL17d*, кодирующего одну из субъединиц IL-17, для которого показано усиление иммунного ответа и канцерогенеза через активацию JAK/STAT-пути [12]. Снижение его экспрессии может свидетельствовать об ослаблении реакции на вызывающий воспаление фактор, что приведет в дальнейшем и к снижению экспрессии *Stat3*, но в исследованный нами момент патологический процесс еще не достиг этой стадии.

Заключение

Таким образом, было показано, что под влиянием хронического социального стресса происходит разнонаправленное изменение экспрессии генов цитокинового ответа в гипоталамусе. Гены *Jak2*, *Stat3*, *Akt1* выделены в качестве ключевых, обеспечивающих взаимодействие между генами цитокинов и генами, вовлеченными в процессы канцерогенеза и апоптоза. Полученные данные могут быть полезны для более глубокого понимания механизмов развития иммунных нарушений и злокачественных заболеваний на фоне хронического стресса и могут в дальнейшем помочь при поиске потенциальных мишеней для фармакологической коррекции рака и иммунных нарушений.

Список литературы / References

1. Галямина А.Г., Смагин Д.А., Коваленко И.Л., Редина О.Е., Бабенко В.Н., Кудрявцева Н.Н. Дисфункция генов, ассоциируемых с канцерогенезом и апоптозом, развивающаяся в гипоталамусе самцов мышей под влиянием хронического социального стресса // Биохимия, 2022. Т. 87, № 9. С. 1318-1333. [Galyamina A.G., Smagin D.A., Kovalenko I.L., Redina O.E., Babenko V.N., Kudryavtseva N.N. The dysfunction of carcinogenesis- and apoptosis-associated genes that develops in the hypothalamus under chronic social defeat stress in male mice. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2022, Vol. 87, no. 9, pp. 1318-1333. (In Russ.)]
2. Alboni S., Cervia D., Sugama S., Conti B. Interleukin 18 in the CNS. *J. Neuroinflammation*, 2010, no. 7, 9. doi: 10.1186/1742-2094-7-9.
3. Audet M.C., McQuaid R.J., Merali Z., Anisman H. Cytokine variations and mood disorders: influence of social stressors and social support. *Front. Neurosci.*, 2014, no. 8, 416. doi: 10.3389/fnins.2014.00416.
4. Babenko V.N., Smagin D.A., Galyamina A.G., Kovalenko I.L., Kudryavtseva N.N. Altered Slc25 family gene expression as markers of mitochondrial dysfunction in brain regions under experimental mixed anxiety/depression-like disorder. *BMC Neurosci.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 79. doi: 10.1186/s12868-018-0480-6.
5. Carnero A., Blanco-Aparicio C., Renner O., Link W., Leal J.F. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2008, Vol. 8, no. 3, pp. 187-198.
6. Carow B., Rottenberg M.E. SOCS3, a major regulator of infection and inflammation. *Front Immunol.*, 2014, Vol. 5, 58. doi: 10.3389/fimmu.2014.00058.
7. Dey A., Hankey Giblin P.A. Insights into macrophage heterogeneity and cytokine-induced neuroinflammation in major depressive disorder. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2018, Vol. 11, no. 3, 64. doi: 10.3390/ph11030064.
8. Dougan M., Dranoff G., Dougan S.K. GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of cytokines: regulators of inflammation. *Immunity*, 2019, Vol. 50, no. 4, pp. 796-811.
9. Iwamaru A., Szymanski S., Iwado E., Aoki H., Yokoyama T., Fokt I., Hess K., Conrad C., Madden T., Sawaya R., Kondo S., Priebe W., Kondo Y. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. *Oncogene*, 2007, Vol. 26, no. 17, pp. 2435-2444.
10. Kudryavtseva N.N., Smagin D.A., Kovalenko I.L., Vishnivetskaya G.B. Repeated positive fighting experience in male inbred mice. *Nat. Protoc.*, 2014, Vol. 9, no. 11, pp. 2705-2717.
11. Kudryavtseva N.N., Tenditnik M.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Kaledin V.I. The influence of psychoemotional status on metastasis of Lewis lung carcinoma and hepatocarcinoma-29 in mice of C57Bl/6J and CBA/LAC strains. *Exp. Oncol.*, 2007, Vol. 29, no. 1, pp. 35-38.
12. Liu T., Zong S., Jiang Y., Zhao R., Wang J., Hua Q. Neutrophils promote larynx squamous cell carcinoma progression via activating the IL-17/JAK/STAT3 pathway. *J. Immunol. Res.*, 2021, Vol. 2021, 8078646. doi: 10.1155/2021/8078646.
13. Munhoz C.D., García-Bueno B., Madrigal J.L., Lepsch L.B., Scavone C., Leza J.C. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2008, Vol. 41, no. 12, pp. 1037-1046.
14. Steelman L.S., Abrams S.L., Whelan J., Bertrand F.E., Ludwig D.E., Bäsecke J., Libra M., Stivala F., Milella M., Tafuri A., Lunghi P., Bonati A., Martelli A.M., McCubrey J.A. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia*, 2008, Vol. 22, no. 4, pp. 686-707.
15. van der Vorst E.P.C., Theodorou K., Wu Y., Hoeksema M.A., Goossens P., Bursill C.A., Aliyev T., Huitema L.F.A., Tas S.W., Wolfs I.M.J., Kuijpers M.J.E., Gijbels M.J., Schalkwijk C.G., Koonen D.P.Y., Abdollahi-Roodsaz S., McDaniels K., Wang C.-C., Leitges M., Lawrence T., Plat J., van Eck M., Rye K.-A., Touqui L., de Winther M.P.J., Biessen E.A.L., Donners M.M.P.C. High-density lipoproteins exert pro-inflammatory effects on macrophages via passive cholesterol depletion and PKC-NF-κB/STAT1-IRF1 signaling. *Cell Metab.*, 2017, Vol. 25, no. 1, pp. 197-207.

Авторы:

Галямина А.Г. — к.б.н., научный сотрудник ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Коваленко И.Л. — к.б.н., старший научный сотрудник ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Смагин Д.А. — к.б.н., старший научный сотрудник ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Попова Н.А. — д.б.н., старший научный сотрудник ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; старший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Galyamina A.G., PhD (Biology), Research Associate, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Kovalenko I.L., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Smagin D.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Popova N.A., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 30.03.2024

Отправлена на доработку 12.04.2024

Принята к печати 15.04.2024

Received 30.03.2024

Revision received 12.04.2024

Accepted 15.04.2024

ОСОБЕННОСТИ ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ ГОЛОГО ЗЕМЛЕКОПА

Горшкова Е.А.^{1,2}, Пуртова С.К.¹, Дворянинова Е.М.¹,
Высоких М.Ю.^{2,3}, Недоспасов С.А.^{1,2,4}

¹ ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Резюме. Голый землекоп обладает множеством уникальных черт физиологии, самые известные из которых — высокая продолжительность жизни и устойчивость к развитию опухолей. Понимание молекулярных механизмов, предопределяющих эти особенности вида, важно для расширения теоретического знания о возникших в ходе эволюции способах контроля рака и процессов старения организма, что в дальнейшем может быть использовано в биомедицине.

На сегодняшний день не подвергается сомнению решающая роль иммунной системы в контроле опухолей у животных, однако иммунная система голого землекопа слабо изучена, и о противоопухолевом иммунном ответе этих животных ничего не известно. В иммунной системе этого удивительного вида наблюдается преобладание миелопоэза, в связи с чем можно предположить, что именно особенности клеток врожденного иммунитета у голого землекопа влияют на успешный контроль возникновения и роста опухолей.

В настоящем кратком сообщении представлен обзор продолжающихся исследований свойств макрофагов голого землекопа. Ранее было показано, что перитонеальные макрофаги голого землекопа способны приобретать воспалительный фенотип (M1), но не отвечают на стандартный стимул, используемый для поляризации макрофагов в противовоспалительный фенотип (M2). Более глубокое исследование с применением методов секвенирования транскриптома и иммунометаболического профилирования в новой *in vitro* модели макрофагов костного мозга голого землекопа, предложенной нашей группой, обнаружило интересные особенности как M1, так и M2-фенотипа макрофагов голого землекопа, потенциально связанные с эволюционной адаптацией вида. Продолжение изучения различных условий поляризации макрофагов голого землекопа важно для определения видовых особенностей противоопухолевого иммунитета.

Ключевые слова: голый землекоп, поляризация макрофагов, макрофаги костного мозга, NO-синтаза, аргиназа-1, IL-4

Адрес для переписки:

Горшкова Екатерина Александровна
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.
Тел.: 8 (499) 135-23-11.
Факс: 8 (499) 135-14-05.
E-mail: gorshsama@gmail.com

Address for correspondence:

Ekaterina A. Gorshkova
Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences
32 Vavilov St
Phone: +7 (499) 135-23-11.
Fax: +7 (499) 135-14-05.
E-mail: gorshsama@gmail.com

Образец цитирования:

Е.А. Горшкова, С.К. Пуртова, Е.М. Дворянинова,
М.Ю. Высоких, С.А. Недоспасов «Особенности
поляризации макрофагов голого землекопа»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4.
С. 685-692. doi: 10.15789/1563-0625-NMR-16913

© Горшкова Е.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Gorshkova, S.K. Purtova, E.M. Dvorianinova,
M.Yu. Vyssokikh, S.A. Nedospasov "Naked mole-rat
macrophage polarization", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4,
pp. 685-692. doi: 10.15789/1563-0625-NMR-16913

© Gorshkova E.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-NMR-16913

NAKED MOLE-RAT MACROPHAGE POLARIZATION

Gorshkova E.A.^{a, b}, Purtova S.K.^a, Dvorianinova E.M.^a,
Vyssokikh M.Yu.^{b, c}, Nedospasov S.A.^{a, b, d}

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

^d Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Krasnodar Region, Russian Federation

Abstract. The naked mole-rat (NMR) is a unique long-lived rodent with low cancer incidence. Understanding the molecular mechanisms that NMR evolved to control aging and tumorigenesis is important for biomedicine. It is commonly accepted that the immune system has essential functions in the tumor growth control in animals. In-depth study of the NMR immune system has recently begun, thus peculiarities of antitumor response in these animals remain undiscovered. However, it was shown that myelopoiesis predominates in NMR, therefore it can be assumed that the innate immune cells in the naked mole rat contribute to the successful control of the cancer incidence and tumor growth. This brief provides an overview of ongoing research into the properties of naked mole rat macrophages. Recent study shown that naked mole rat peritoneal macrophages are capable of acquiring an inflammatory phenotype (M1) but polarization into an anti-inflammatory phenotype (M2) under standard stimulus is limited. A more in-depth study using transcriptome sequencing and immunometabolic profiling in novel *in vitro* model of naked mole rat bone marrow macrophages suggested by our group revealed non-canonical features of M1 as well as M2 phenotypes of naked mole rat macrophages, which can be associated with the evolutionary adaptation of the species. Continued study of the different polarization conditions of naked mole rat macrophages is important to determine unique adaptations in NMR antitumor immunity.

Keywords: naked mole-rat, macrophage, polarization, NO synthase, arginase, IL-4

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 22-24-00708).

Введение

Голый землекоп — новая модель в иммунологии, и на сегодняшний день комплексного представления о механизмах иммунной защиты у этих животных не сформировано. Для голого землекопа характерны физиологические особенности, связанные с адаптацией к подземной среде обитания, отличающие их от других грызунов, а также уникальные среди млекопитающих. Поиск и описание молекулярных механизмов, обуславливающих низкую встречаемость злокачественных опухолей и высокую продолжительность жизни голых землекопов, остаются интригующими задачами современной биологии.

Представление о том, что иммунитет принимает непосредственное участие в контроле развития опухолей, в том числе в контексте старения организма, сформировано на основании исследований животных моделей и анализа клинических данных. Так, миелоидные клетки в

опухолевом микроокружении могут способствовать как усилению естественного противоопухолевого ответа, так и его торможению. Считается, что воспалительные макрофаги (M1) опухолевого микроокружения способны подавлять рост опухолей и привлекать активированные клетки адаптивного иммунитета, в свою очередь противовоспалительные макрофаги (M2) создают толерогенное окружение, помогая опухоли уходить от иммунного надзора [5]. Недавно было показано, что для голых землекопов характерно преобладание миелоидной ветви кроветворения [3], в связи с чем можно предположить, что именно клетки врожденного иммунитета играют особую роль в защите от неоплазий у голого землекопа.

Способность приобретать провоспалительный или противовоспалительный фенотип макрофагами может быть изучена в модели классической и альтернативной поляризации *in vitro*. Впервые такие исследования были проведены на клеточной линии перитонеальных макрофагов голого землекопа [6], а также на первичных культурах макрофагов костного мозга голого землекопа в работе нашей группы [2]. Было показано, что как перитонеальные, так и макрофаги костного

мозга голого землекопа поддаются поляризации в сторону M1 в присутствии липополисахарида и рекомбинантного IFN γ , приобретая характерные экспрессионные и цитокиновые профили, при этом демонстрируя видоспецифичные особенности в регуляции метаболизма азота, включая ограниченную продукцию оксида азота. С другой стороны, способность макрофагов голого землекопа поляризоваться в каноничный фенотип M2 *in vitro* не была достоверно показана. В настоящем сообщении мы суммировали ранее обнаруженные особенности поляризации, а также проверили дополнительные варианты условий альтернативной (M2) поляризации макрофагов голого землекопа.

Материалы и методы

Получение макрофагов костного мозга

Для получения первичной культуры макрофагов голого землекопа костный мозг стерильно вымывали из костей конечностей. Клетки костного мозга затем подсчитывали и рассаживали в среде DMEM (DMEM с 4,5 г/л глюкозы, 2 ммоль L-глутамина и 1 ммоль пирувата натрия (Capricorn Scientific, Германия), а также смесью антибиотиков (Pen Strep, Gibco, США), 10% FBS (Capricorn Scientific, Германия) в присутствии 40 нг/мл рекомбинантного M-CSF мыши (Miltenyi Biotec, Германия). Клетки костного мозга голого землекопа выращивали в CO $_2$ -инкубаторе в течение 21 суток при температуре 32 °C с добавлением све-

жей среды на 8-й, 14-й и 18-й дни. Для получения макрофагов костного мозга мыши применялся аналогичный протокол, однако клетки выращивали в течение семи суток при температуре 37 °C.

Поляризация в противовоспалительных условиях

Макрофаги голого землекопа собирали на день 21 и рассаживали из расчета 5 × 10 5 клеток/мл в среде DMEM, 10% FBS, без добавления фактора роста макрофагов. Макрофаги мыши рассаживали на день 7. Для индукции M2-поляризации были использованы различные условия: добавление 20 нг/мл рекомбинантного интерлейкина-4 мыши (mIL-4, Miltenyi Biotec, Германия), 20 нг/мл рекомбинантного интерлейкина-4 человека (hIL-4, PeproTech, США), в среде DMEM со стандартным содержанием L-аргинина (0,4 ммоль), либо в среде с повышенным содержанием L-аргинина (4 ммоль). В некоторых опытах для поляризации M2 был использован дибутирил цАМФ (0,5 мг/мл, N6, 2'-о-дибутириладенозина 3', 5'-цикло-монофосфата натриевая соль, Sigma). Агенты M2-поляризации добавляли к клеткам на 24 часа, после чего клетки гомогенизировали для выделения РНК.

Анализ экспрессии характеристических генов

РНК выделяли твердофазным методом при помощи набора EasyPure RNA Kit (Transgene, Китай), после чего синтезировали кДНК с помощью набора RevertAid First Strand (Thermo Scientific, США). Экспрессию характеристических генов,

ТАБЛИЦА 1. ГЕНЫ ГОЛОГО ЗЕМЛЕКОПА И МЫШИ, ОТНОСИТЕЛЬНУЮ ЭКСПРЕССИЮ КОТОРЫХ ИССЛЕДОВАЛИ В НАСТОЯЩЕЙ РАБОТЕ, И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ПРИ ПОСТАНОВКЕ qRT-PCR

TABLE 1. NAKED MOLE RAT AND MOUSE GENES, THE RELATIVE EXPRESSION OF WHICH WAS STUDIED IN THIS WORK, AND SEQUENCES OF PRIMERS USED IN qRT-PCR

Ген Gene	Вид Species	Последовательность (5'->3') F F primer sequence	Последовательность (5'->3') R R primer sequence
Actb	<i>H.gl</i>	GCGCTCTTTCAGCCTTCTTT	TTGGCATAGAGGTCCTTGCG
Arg1		CATCGGAGCCCCTTTCTCAA	ACCAGCATATCTCAACGCCG
Egr2		AATCTGCCCCCTTCTTTCGG	CCACTCCGTTCATCTGGTCA
Mrc1		AGCTTTGACTGCCTCGACTG	GTGGTCTTGTGTATTCACCTTTTGT
Actb	<i>M.mu</i>	CTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTG	TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
Arg1		TGAGGAAAGCTGGTCTGCTG	GGCCAGAGATGCTTCCAAC
Egr2		ATCCTAGGCTCAGTTCAACC	ATCATGCCATCTCCCGC
Mrc1		TACTTGGACGGATAGATGGAGG	CATAGAAAGGAATCCACGCAG

ассоциированных с M2-поляризацией, определяли при помощи метода количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Для этого использовали готовую смесь для qPCR с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR (qPCRmix-HS SYBR+LowROX, ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкм смеси 10 мкмоль праймеров (табл. 1), 7 мкл воды (DEPC) и 4 мкл матрицы кДНК. ПЦР осуществляли на платформе Quant Studio 6 (Applied Biosystems, США). Расчет относительной экспрессии генов проводили с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Параметр $\Delta\Delta Ct$ находили путем нормирования рассчитанного для опытных проб значения ΔCt на среднее значение ΔCt контрольных образцов. Ct — цикл амплификации, на котором содержание в реакционной смеси продукта достигает порогового значения, ΔCt — разница между Ct референсного гена (*Actb*) и Ct гена интереса (табл. 1).

Результаты и обсуждение

В ходе работы с уникальной моделью долгоживущего грызуна — голого землекопа, нами был предложен способ получения первичной культуры макрофагов костного мозга. Отличительной

чертой данного метода является длительное культивирование предшественников костного мозга в течение 21 суток при пониженной температуре (32 °C) — близкой к температуре тела, наблюдаемой у голых землекопов *in vivo* (рис. 1).

РНК-секвенирование макрофагов голого землекопа при поляризации в M1 под действием LPS и $IFN\gamma$ показало повышение экспрессии сигнатурных генов, характерных для данного типа ответа у наиболее хорошо изученного в данной модели организма — мыши [1], таких как *CD38*, *Acod1*, *Tnf* [2]. Вместе с этим, были обнаружены отличные от мыши тенденции в дифференциальной экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом аргинина (табл. 2). Так, в транскриптомах M0-, M1- и M2-макрофагов голого землекопа не детектировались транскрипты гена *Nos2*, кодирующего индуцибельную NO-синтазу (iNOS), в то время как у мыши этот ген сверхэкспрессирован в M1-макрофагах. Интересно, что у голых землекопов не изменялась экспрессия гена *Slc7a2*, кодирующего переносчик аргинина CAT2. Аргинин является конкурентным субстратом для iNOS и аргиназы-1, в связи с чем достаточное присутствие внутриклеточного аргинина важно для поляризации [8]. У мышей

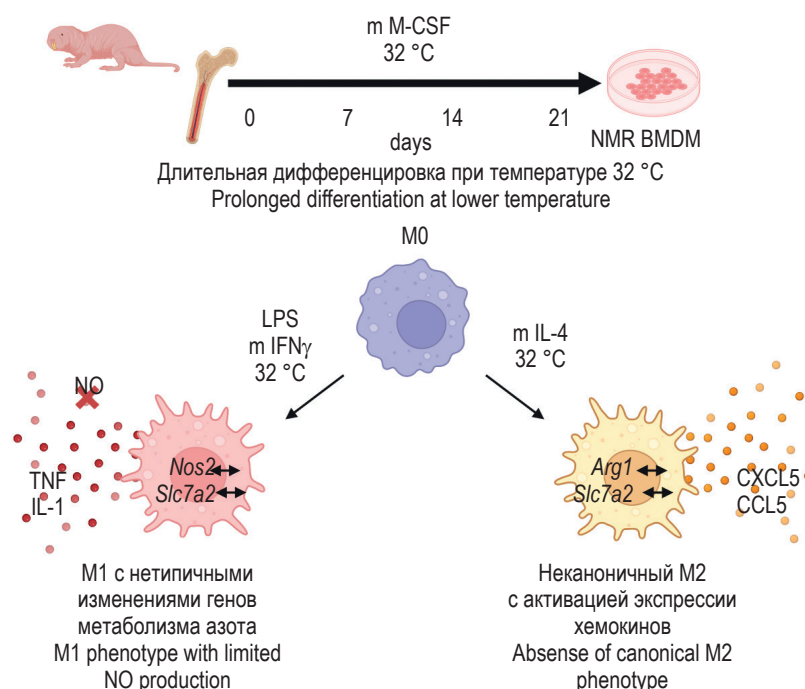


Рисунок 1. Особенности дифференцировки и поляризации макрофагов голого землекопа

Figure 1. Naked mole-rat macrophage differentiation and polarization

ТАБЛИЦА 2. ЗНАЧЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ (LogFC) НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В МЕТАБОЛИЗМ АРГИНИНА, В ПОЛЯРИЗОВАННЫХ МАКРОФАГАХ ГОЛОГО ЗЕМЛЕКОПА И МЫШИ

TABLE 2. RELATIVE EXPRESSION (LogFC) OF SOME GENES INVOLVED IN ARGININE METABOLISM IN POLARIZED MACROPHAGES OF NAKED MOLE-RAT AND MOUSE

<i>H. glaber</i>				
	M1 vs M0		M2 vs M0	
	LogFC	FDR	LogFC	FDR
<i>Nos2</i>	n. d.		n. d.	
<i>Arg1</i>	-3,3	3,04281E-06	0,23	n. s.
<i>Slc7a2</i>	0,45	n. s.	-0,16	n. s.
<i>M. musculus</i>				
	M1 vs M0		M2 vs M0	
	LogFC	FDR	LogFC	FDR
<i>Nos2</i>	8,8	5,96803E-17	0,3	0,005
<i>Arg1</i>	n. d.		4,84	7,85267E-19
<i>Slc7a2</i>	7,56	1,66944E-29	3,10	3,13952E-17

Примечание. LogFC – логарифм кратного изменения, FDR – скорректированные значения p-value с поправкой на множественное сравнение при анализе дифференциальной экспрессии. N. d. – не было обнаружено транскриптов, n. s. – изменение не достоверно статистически.

Note. LogFC is the logarithm of the fold change of gene expression versus M0, FDR is the adjusted p-value corrected for multiple comparisons in differential expression analysis. N.d., no transcripts were detected; n.s., not significant.

Slc7a2 сверхэкспрессирован как в M1-, так и в M2-макрофагах (табл. 2).

Неожиданным результатом РНК-профилирования макрофагов голого землекопа, активированных рекомбинантным IL-4 мыши, оказалось отсутствие изменений в характеристических M2-ассоциированных генах, например, *Arg1* (табл. 2). Значимому изменению подверглось лишь малое количество генов, включая гены хемокинов *Cxcl13*, *Ccl22*, *Ccl5*, среди которых только *Ccl22* связывают с M2-ответом [2].

В ходе настоящей работы мы проверили другие условия противовоспалительной поляризации, которые потенциально могут вызывать изменение экспрессии M2-характеристических генов в макрофагах голого землекопа – рекомбинантный IL-4 человека, среды с добавлением L-аргинина, а также неспецифичный M2-активатор – цАМФ. Для сравнения аналогичные условия M2-поляризации были проверены на культурах макрофагов костного мозга мыши, по-

лученных в стандартных условиях (рис. 2А). Для анализа было выбрано несколько генов, ярко коррелирующих с приобретением M2-фенотипа макрофагами, – *Arg1*, а также *Mrc1* (маннозный рецептор CD206), *Egr2* (транскрипционный фактор) [1, 4].

Попарное выравнивание белковой последовательности IL-4 голого землекопа показало сходство на уровне около 60% аминокислот как для IL-4 мыши (61,4%), так и человека (58,7%). В свою очередь, уровень сходства между ортологами IL-4 мыши и человека составляет 56,5% (рис. 2Б). Оказалось, что IL-4 человека не вызывает изменения экспрессии *Arg1*, *Mrc1* и *Egr2* относительно M0 в макрофагах голого землекопа (рис. 2В). Кроме того, M2-поляризация также не происходит в макрофагах мыши при добавлении IL-4 человека (рис. 2Г). Судя по всему, уровень различий в аминокислотном составе между доступными рекомбинантными вариантами IL-4 достаточен для того, чтобы данный цитокин не

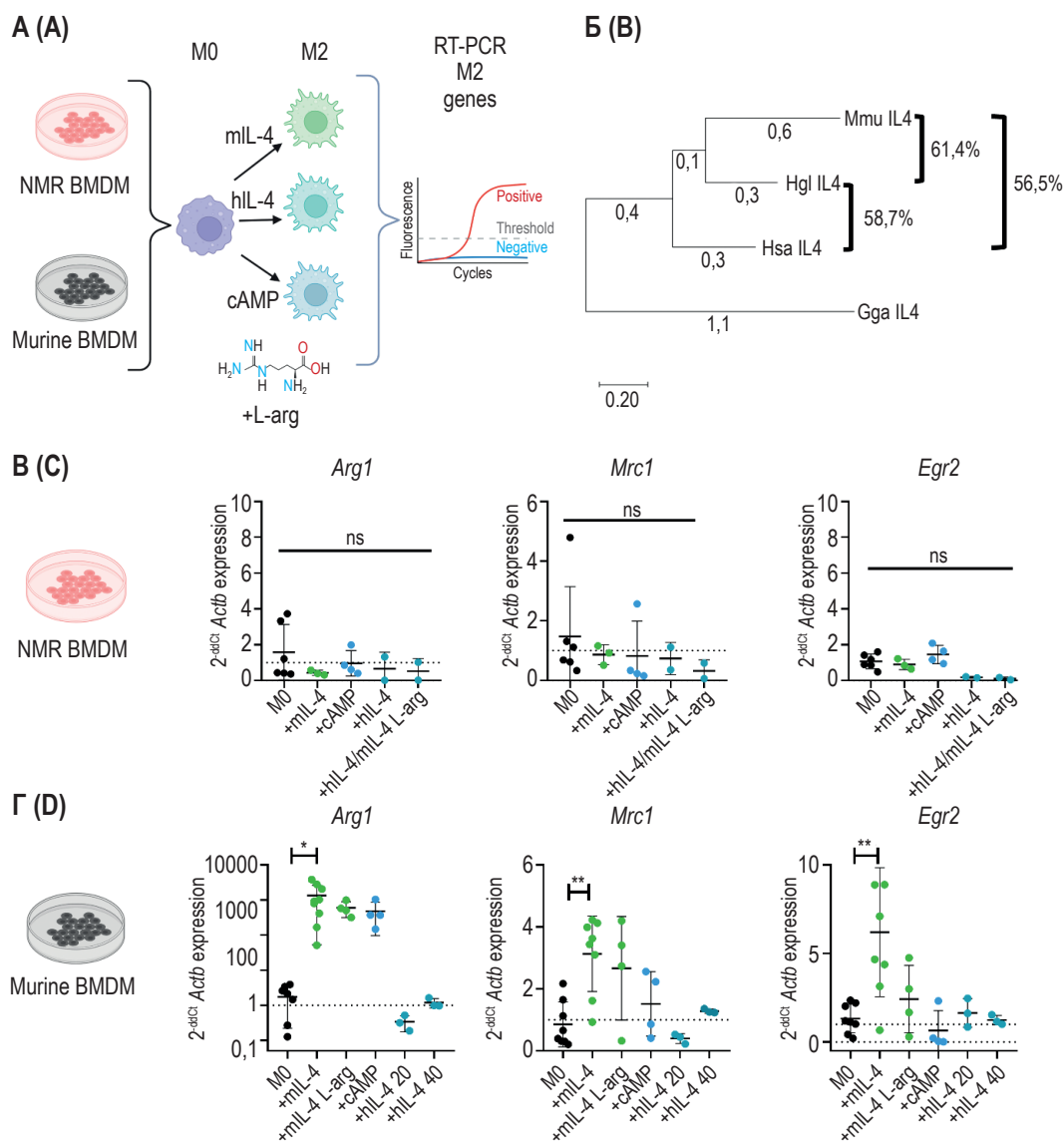


Рисунок 2. Экспрессия M2-ассоциированных генов при различных условиях противовоспалительной поляризации макрофагов голого землекопа

Примечание. А – схема получения культур макрофагов костного мозга голого землекопа и мыши, условия активации зрелых макрофагов. Б – эволюционная дистанция белковых последовательностей IL-4 у некоторых видов (*Mmu* – *Mus musculus*, *Hgl* – *Heterocephalus glaber*, *Hsa* – *Homo sapiens*, *Gga* – *Gallus gallus*) и процент сходных аминокислот в них (% similarity) при попарном выравнивании с помощью алгоритма EMBOSS Needle. В – относительная экспрессия генов *Arg1*, *Mrc1*, *Egr2* в макрофагах голого землекопа через 24 часа после добавления рекомбинантного IL-4 мыши (mIL-4), IL-4 человека (hIL-4), цАМФ (cAMP) в стандартной среде и в среде с повышенным содержанием аргинина (mIL-4/hIL-4 L-arg). Г – относительная экспрессия генов *Arg1*, *Mrc1*, *Egr2* в макрофагах мыши через 24 часа после добавления mIL-4 в стандартной среде и среде с повышенным содержанием аргинина (mIL-4 L-arg), hIL-4 и цАМФ. Каждая точка внутри группы представляет собой индивидуальную культуру клеток, полученную из одного животного. Для сравнения параметров между группами использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; ns – не достоверно.

Figure 2. Expression of M2-associated genes under different polarizing conditions

Note. A, scheme for obtaining cultures of bone marrow-derived macrophages from the two species and different M2 polarization strategies. B, Evolutionary distance of IL-4 protein sequences in four species (*Mmu*, *Mus musculus*; *Hgl*, *Heterocephalus glaber*; *Hsa*, *Homo sapiens*; *Gga*, *Gallus gallus* used as outgroup) and the percentage of similar amino acids (% similarity) in pairwise alignment of IL-4 protein sequences using EMBOSS Needle. C, relative expression of *Arg1*, *Mrc1*, *Egr2* genes in naked mole rat macrophages (NMR BMDM) 24 hours after the addition of recombinant mouse IL-4 (mIL-4), human IL-4 (hIL-4), cAMP, in standard medium and in medium with increased arginine content (mIL-4/hIL-4 L-arg). D, relative expression of the genes *Arg1*, *Mrc1*, *Egr2* in mouse macrophages 24 hours after the addition of mIL-4 in standard medium and medium with a high content of arginine (mIL-4 L-arg), hIL-4 and cAMP. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare relative expression between groups. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ns, not significant.

имел кросс-видовой активности, что представляет собой явное ограничение модели, применяемой в настоящем или в подобных ему исследованиях [6].

Исходя из данных об отсутствии изменения уровня экспрессии *Slc7a2*, как в условиях М1-, так и М2-поляризации, у голого землекопа (табл. 2), мы предположили, что клеткам может быть необходимо большее количество L-аргинина в культуральной среде [6]. Однако увеличение концентрации аргинина в среде в 10 раз не привело к изменениям экспрессии М2-генов у голого землекопа (рис. 2В). У мышей статистически значимых различий по экспрессии генов интереса в М2-макрофагах, активированных в стандартной среде и среде с повышенным аргинином — также не наблюдалось (рис. 2Г), по всей видимости, выбранная нами концентрация аргинина не влияет на степень выраженности М2-фенотипа макрофагов.

Наконец, как альтернативный подход к проблеме полноценности взаимодействия ИЛ-4 мыши и человека с рецепторами голого землекопа в качестве неспецифического активатора М2 фенотипа был использован дибутирил цАМФ, способный проникать внутрь клеток [7]. В макрофагах мышей экспрессия гена *Arg1* повышалась, как при активации ИЛ-4, так и цАМФ, с другой стороны, цАМФ не изменял экспрессии *Mrc1* и *Egr2* (рис. 2Г). При этом в макрофагах голого

землекопа стимуляция цАМФ не приводила к повышению экспрессии *Arg1* (рис. 2В).

Заключение

Поляризация макрофагов костного мозга голого землекопа несет видоспецифичные особенности. Так, отличительной чертой М1-макрофагов голого землекопа является отсутствие продукции оксида азота и реорганизация транскрипционной программы, ассоциированной с этим процессом. Макрофаги голого землекопа, активированные рекомбинантным ИЛ-4, не приобретали характерные для противовоспалительных макрофагов черты. В ходе работы были проверены дополнительные условия М2-поляризации макрофагов голого землекопа, однако никакие из них также не привели к изменению экспрессии ожидаемых М2-ассоциированных генов. Мы предполагаем, что доступные варианты рекомбинантного ИЛ-4 могут иметь недостаточную степень консервативности для того, чтобы взаимодействовать с рецепторами на клетках голого землекопа. Однако вместе с этим отсутствие повышения экспрессии *Arg1*, ключевого гена М2-ответа, в ответ на цАМФ в макрофагах голого землекопа, в отличие от клеток мыши, может указывать на то, что развитие противовоспалительного фенотипа имеет видоспецифичные особенности. Полноценное доказательство этой гипотезы требует постановки опытов с нативным или рекомбинантным цитокином ИЛ-4 голого землекопа.

Список литературы / References

1. Colombo G., Pessolano E., Talmon M., Genazzani A.A., Kunderfranco P. Getting everyone to agree on gene signatures for murine macrophage polarization *in vitro*. *PLoS One*, 2024, Vol. 19, e0297872. doi: 10.1371/journal.pone.0297872.
2. Gorshkova E.A., Gubernatorova E.O., Dvorianinova E.M., Yurakova T.R., Marey M.V., Averina O.A., Holtze S., Hildebrandt T.B., Dmitriev A.A., Drutskaya M.S., Vyssokikh M.Y., Nedospasov S.A. Macrophages from naked mole-rat possess distinct immunometabolic signatures upon polarization. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1172467. doi: 10.3389/fimmu.2023.1172467.
3. Hilton H.G., Rubinstein N.D., Janki P., Ireland A.T., Bernstein N., Fong N.L., Wright K.M., Smith M., Finkle D., Martin-McNulty B., Roy M., Imai D.M., Jojic V., Buffenstein R. Single-cell transcriptomics of the naked mole-rat reveals unexpected features of mammalian immunity. *PLoS Biol.*, 2019, Vol. 17, e3000528. doi: 10.1371/journal.pbio.3000528.
4. Jablonski K.A., Amici S.A., Webb L.M., Ruiz-Rosado Jde D., Popovich P.G., Partida-Sanchez S., Guerau-de-Arellano M. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, e0145342. doi: 10.1371/journal.pone.0145342.
5. Pittet M.J., Michielin O., Migliorini D. Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2022, Vol. 19, pp. 402-421.
6. Wada H., Shibata Y., Abe Y., Otsuka R., Eguchi N., Kawamura Y., Oka K., Baghdadi M., Atsumi T., Miura K., Seino K.I. Flow cytometric identification and cell-line establishment of macrophages in naked mole-rats. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, 17981. doi: 10.1038/s41598-019-54442-1

7. Wentzel A.S., Janssen J.J.E., de Boer V.C.J., van Veen W.G., Forlenza M., Wiegertjes G.F. Fish Macrophages Show Distinct Metabolic Signatures Upon Polarization. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 152. doi: 10.3389/fimmu.2020.00152.

8. Yeramian A., Martin L., Arpa L., Bertran J., Soler C., McLeod C., Modolell M., Palacin M., Lloberas J., Celada A. Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. *Eur. J. Immunol.*, 2006, Vol. 36, pp. 1516-1526.

Авторы:

Горшкова Е.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; инженер I категории отдела иммунологии, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Пуртова С.К. — лаборант, лаборатория молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Дворянинова Е.М. — младший научный сотрудник лаборатории сравнительной геномики и транскриптомики ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Высоких М.Ю. — к.б.н., доцент, заведующий лабораторией молекулярных механизмов старения, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; заведующий лабораторией митохондриальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Недоспасов С.А. — д.б.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; руководитель отдела иммунологии, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва; руководитель направления «Иммунобиология и биомедицина», АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Authors:

Gorshkova E.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Engineer, Department of Molecular Immunology, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Purtova S.K., Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Dvorianinova E.M., Junior Research Associate, Laboratory of Comparative Genomics and Transcriptomics, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Vysokikh M.Yu., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Mechanisms of Aging, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University; Head, Laboratory of Mitochondrial Medicine, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Nedospasov S.A., PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Head, Department of Molecular Immunology, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow; Head, Division of Immunobiology and Biomedicine, Center of Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Krasnodar Region, Russian Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 06.04.2024
Принята к печати 08.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 06.04.2024
Accepted 08.04.2024

СРАВНЕНИЕ *IN VITRO* МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СЕНЕСЦЕНТНЫХ ОПУХОЛЬ- АССОЦИИРОВАННЫХ МАКРОФАГОВ

Пухальская Т.В.^{1,2,3}, Юракова Т.Р.³, Михайловская В.С.¹,
Богданова Д.А.^{1,2}, Демидов О.Н.^{1,2}

¹ АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Опухоль-ассоциированные макрофаги (от англ. Tumor-associated macrophages – TAMs) являются важной и наиболее представленной популяцией иммунных клеток в микроокружении опухоли. В значительной мере именно TAMs могут определять направленность противоопухолевого иммунного ответа, они могут или дополнительно стимулировать его, или наоборот способствовать формированию иммуносупрессивного микроокружения. Одновременно под влиянием опухолевых клеток и противоопухолевой терапии многие клетки в микроокружении опухоли (от англ. tumor microenvironment, TME) могут развивать состояние сенесценции. Последнее десятилетие особую популярность приобретает тема старения (сенесценции, от англ. senescence) и поиска терапии, направленной на удаление сенесцентных клеток. В поисках новых терапевтических стратегий для лечения онкологических заболеваний стареющим клеткам иммунной системы в микроокружении опухоли уделяется особое внимание. Так как наличие сенесцентных TAMs в опухоли ассоциировано с неблагоприятным прогнозом и плохим ответом на терапию. Учитывая актуальность изучения роли стареющих иммунных клеток в TME (в частности опухоль-ассоциированных макрофагов), мы провели сравнительный анализ экспериментальных протоколов получения опухоль-ассоциированных макрофагов *in vitro*, чтобы определить наиболее релевантный подход.

Мы проверили два протокола получения макрофагов из костного мозга мыши: 1) путем добавления кондиционной среды от клеточной линии саркомы мыши L929 (LCCM) (LCCM-BMDM); 2) путем добавления рекомбинантного М-CSF мыши (М-CSF-BMDM). Нами было показано, что LCCM-BMDM по сравнению с М-CSF-BMDM имеют повышенную экспрессию фермента аргиназы (Arg1), способного подавлять активность противоопухолевых цитотоксических лимфоцитов, путем истощения аргинина в микроокружении опухоли. Также LCCM-BMDM демонстрировали повышенную секрецию факторов, характерных для фенотипа, ассоциированного со старением (от англ. senescence-associated secretory phenotype, SASP) – IL-6 и TNF. Как Arg1, так и IL-6 с TNF являются маркерами,

Адрес для переписки:

Пухальская Тамара Владимировна
АНОО ВО НТУ «Сириус»
354340, Россия, Краснодарский край, Федеральная
территория «Сириус», Олимпийский пр., 1.
Тел.: 8 (996) 121-31-34.
E-mail: tomakuphalskaya@gmail.com

Address for correspondence:

Tamara V. Pukhalskaia
Sirius University of Science and Technology
1 Olympic Ave
Federal Territory Sirius
Krasnodar Region
354340 Russian Federation
Phone: + 7 (996) 121-31-34.
E-mail: tomakuphalskaya@gmail.com

Образец цитирования:

Т.В. Пухальская, Т.Р. Юракова, В.С. Михайловская,
Д.А. Богданова, О.Н. Демидов «Сравнение *in vitro*
моделей для исследования сенесцентных опухоль-
ассоциированных макрофагов» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 693–700.
doi: 10.15789/1563-0625-COI-16929

© Пухальская Т.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.V. Pukhalskaia, T.R. Yurakova, V.S. Mikhailovskaya,
D.A. Bogdanova, O.N. Demidov "Comparison of *in vitro*
models for the study of senescence of macrophages associated
with a tumor", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 693–700.
doi: 10.15789/1563-0625-COI-16929

© Pukhalskaia T.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-COI-16929

характерными для сенесцентных макрофагов. Таким образом использование LCCM для получения первичной культуры макрофагов ограничивает дальнейшие шаги в создании модели опухоль-ассоциированных макрофагов, которая отражала бы специфичные характеристики фенотипического ответа макрофагов для различных типов опухолей. Мы считаем, что дифференцировка макрофагов в присутствии М-CSF представляется более предпочтительным протоколом для изучения TAMs и сенесцентных TAMs с последующим тестированием новых терапевтических стратегий.

Ключевые слова: сенесцентные клетки, $p21^{cip1}$, микроокружение опухоли, TAMs, SASP, *in vitro*

COMPARISON OF *IN VITRO* MODELS FOR THE STUDY OF SENESENCE OF MACROPHAGES ASSOCIATED WITH A TUMOR

Pukhalskaia T.V.^{a, b, c}, Yurakova T.R.^c, Mikhailovskaya V.S.^a,
Bogdanova D.A.^{a, b}, Demidov O.N.^{a, b}

^a Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russian Federation

^b Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

^c Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Tumor-associated macrophages (TAMs) are an important and most represented population of immune cells in the tumor microenvironment. To a great extent, TAMs can determine the direction of the antitumor immune response; they can either additionally stimulate it or on the contrary contribute to the formation of immunosuppressive microenvironment. At the same time, under the influence of tumor cells and antitumor therapy, many cells in the tumor microenvironment (TME) can develop a state of senescence. Over the last decade, the topic of senescence and the search for therapies aimed at removing senescent cells has gained popularity. In the search for new therapeutic strategies to treat cancer, senescent cells of the immune system in the tumor microenvironment have received special attention since the presence of senescent TAMs in tumors is associated with poor prognosis and poor response to therapy. Given the relevance of studying the role of senescent immune cells in TME (in particular tumor-associated macrophages), we performed a comparative analysis of experimental protocols to obtain tumor-associated macrophages *in vitro* to determine the most relevant approach. We tested two protocols for obtaining macrophages from mouse bone marrow: (1) by adding conditioned medium from the L929 mouse sarcoma cell line (LCCM) (LCCM-BMDM); and (2) by adding recombinant mouse M-CSF (M-CSF-BMDM). We showed that LCCM-BMDMs, compared to M-CSF-BMDMs, have increased expression of the arginase enzyme (Arg1), which can inhibit the activity of anti-tumor cytotoxic lymphocytes by depleting arginine in the tumor microenvironment. LCCM-BMDMs also exhibited increased secretion of factors characteristic of the senescence-associated secretory phenotype (SASP): IL-6 and TNF. Both Arg1 and IL-6 and TNF are markers characteristic of senescence-associated macrophages. Thus, the use of LCCM to obtain primary macrophage culture limits further steps in creating a model of tumor-associated macrophages that reflects the specific characteristics of the macrophage phenotypic response for different tumor types and also limits studies of senescence formation in tumor-associated macrophages in models of carcinogenesis other than sarcoma. We believe that differentiation of macrophages in the presence of M-CSF appears to be a more preferable protocol to study TAMs and senescent TAMs to test new therapeutic strategies.

Keywords: senescent cells, $p21^{cip1}$, tumor microenvironment, TAMs, SASP, *in vitro*

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант РНФ 19-75-30032).

Введение

Несмотря на широкий спектр различных лекарственных средств, используемых в терапии рака, в данной области остается еще много не-

решенных вопросов, а поиск новых подходов, направленных на увеличение эффективности противоопухолевой терапии, не теряет своей актуальности. Стоит учитывать, что любая терапия оказывает эффект не только на опухолевые клетки, но и на клетки микроокружения (от англ. tumor microenvironment, TME), в том числе и на клетки иммунной системы. Как опухолевые

клетки, так и клетки TME могут подвергаться «старению» (сенесценс), спонтанно или под воздействием противоопухолевой терапии [2]. Сенесцентность характеризуется, необратимой остановкой клеточного цикла и устойчивостью к апоптотическим стимулам, что делает такие клетки устойчивыми и к дальнейшим вмешательствам. Кроме того, для большинства сенесцентных клеток характерны повышенная активность лизосом, увеличение гликолиза, увеличение повреждений ДНК, а также повышенная секреция хемокинов, цитокинов и факторов роста, объединенных под общим названием «секреторный фенотип, ассоциированный со старением» (от англ. senescence-associated secretory phenotype, SASP). В свою очередь SASP, паракринно влияя на клетки TME, способствует целому ряду патологических процессов и резистентности к терапии [3].

Особый интерес в контексте сенесцентности представляют макрофаги, ассоциированные с опухолью (от англ. Tumor-associated macrophages — TAMs). Макрофаги — чрезвычайно пластичные клетки. При физиологических и патологических процессах они имеют два противоположных фенотипа (поляризации): классически активированный подтип M1 и альтернативно активированный подтип M2. В TME чаще представлены так называемые M2 подобные макрофаги и супрессорные клетки миелоидного происхождения, которые формируют иммуносупрессивное микроокружение в опухоли [1]. Наличие сенесцентных TAMs в опухоли ассоциировано с неблагоприятным прогнозом и плохим ответом на терапию. Суммируя данные, полученные в различных моделях *in vivo* и *in vitro*, можно выделить некоторые общие черты, характерные для сенесцентных TAMs, такие как: совместное увеличение экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ p16^{INK4} и/или p21^{cip1}, Arg1, CD206, CXCR1, CD38; увеличенный метаболизм аргинина и гликолиз. SASP сенесцентных TAMs характеризуется секрецией TGF-β, IL-10, IL-6, TNF, IL-1β, Mmp12, Timp2, Cxcl12, Cxcl13, Hgf [6].

Несмотря на то, что эталоном для изучения процессов старения и канцерогенеза является использование *in vivo* моделей, на этапах масштабных скринингов препаратов также необходимо иметь подходящие *in vitro* модели TAMs. Таким образом, задачей данного исследования было провести сравнительный анализ экспериментальных протоколов получения TAMs *in vitro*, чтобы определить наиболее релевантный подход.

Материалы и методы

Мыши

В работе использовали мышей линии C57Bl/6 в возрасте 6-8 недель, полученных из питом-

ника лабораторных животных «Пушино», филиала Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН в г. Пушино. Животных содержали в автономном экспериментально-биологическом комплексе для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике ИМБ РАН (Протокол №3 от 27.10.2023).

Выделение и дифференцировка первичных макрофагов мыши

Макрофаги костного мозга (от англ. bone-marrow-derived macrophage, BMDM) дифференцировали из клеток костного мозга мыши C57B6j в соответствии с ранее опубликованными протоколами [9]. Костный мозг был выделен из большеберцовых и бедренных костей мышей дикого типа.

Культивирование клеток

Клеточные линии колоректального рака мыши MC38 получены из Kerafast и фибробласты L929 (ATCC CCL-1) были получены из ATCC (American Type Culture Collection, США) и культивировались в среде DMEM 4,5 г/л глюкозы (НПП «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% FBS, 4 mM L-глутамин и антибиотиков при 37 °C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂.

Модель получения опухоль-ассоциированных макрофагов

После окончания дифференцировки BMDM рассаживали в концентрации 1×10^6 на лунку 24-луночного планшета в объеме 500 мкл, давали прикрепиться клеткам в течении 3-4 часов, после чего добавляли 500 мкл 3-дневной кондиционной опухолевой среды от линии клеток MC38. В качестве положительного контроля использовали LPS (10 нг/мл), IFNγ (10 нг/мл) и IL-4 (20 нг/мл) мыши для M1 и M2 поляризации соответственно.

Выделение РНК и обратная транскрипция

Клетки из одной лунки 24-луночного планшета лизировали в ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия). Суммарную мРНК выделяли в соответствии с инструкцией производителя. Обратную транскрипцию РНК, очищенной от геномной ДНК, проводили с использованием набора Thermo Scientific RevertAid RT Kit (Thermo Scientific, США) и проводили синтез в соответствии с инструкцией производителя.

Анализ экспрессии генов методом количественной ПЦР в реальном времени

Для постановки количественной ПЦР использовали готовый набор с SYBR (qPCRmix-HS SYBR+LowROX, ЗАО «Евроген», Россия), последовательности праймеров приведены в таблице 1. Синтез производился на амплификаторе MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ qPCR

TABLE 1. SEQUENCES OF PRIMERS FOR qPCR

Ген Gene	Последовательности праймеров (5'→3') Primer sequences (5'→3')	
	Прямой Forward	Обратный Reverse
Actb	CTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTG	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC
Tnf	CAGCCTCTTCTCATTCCTGCTTGTC	CTGGAAGACTCCTCCCAGGGTATAT
Fpr2	CGAAGAGTGTAAGAAGGAGAC	AAGGAAGAAAAGTGATGGAGAC
CD38	CTACAGGCCTGCCAGGTTTC	GTTGCTTCTGAGCCCCTTCA
Arg1	TGAGGAAAGCTGGTCTGCTG	GGCCAGAGATGCTTCCAACCT
Egr2	ATCCTAGGCTCAGTTCAACC	ATCATGCCATCTCCCGC
Mrc1	TACTTGACGGATAGATGGAGG	CATAGAAAGGAATCCACGCAG
P21	CAAAGTGTGCCGTTGTCTCT	AGGAAGTACTGGGCCTCTTG

Biosystems. Для каждого образца реакцию проводили в трех технических повторах. Уровень экспрессии анализируемых генов был нормализован относительно уровня *АСТВ*. Относительную экспрессию генов подсчитывали методом сравнительной количественной оценки величины порогового цикла ($\Delta\Delta Ct$) [10].

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Содержание IL-6 и TNF в надклеточной среде анализировали с помощью набора Invitrogen™ Mouse IL-6 Uncoated ELISA Kit (Thermo Scientific, США) и Invitrogen™ Mouse TNF Uncoated ELISA Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Мультиплексный анализ продукции цитокинов

Профиль продукции цитокинов в LCCM был исследован с помощью технологии мультиплексного анализа Luminex xMAP (Merck, Германия). В настоящей работе был использован набор MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel. Анализ был проведен в соответствии с инструкциями производителя, обработку данных проводили в программе Analyst (Merck, Германия).

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили попарно при помощи t-критерия Стьюдента в программе GraphPad Prism 10. Различия считали достоверными при * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns (non-significant) — нет разницы.

Результаты и обсуждение

Для сравнения как дифференцировка макрофагов с помощью различных протоколов влияет

на последующее моделирование TAMs была выбрана следующая схема эксперимента (рис. 1А, см. 2-ю стр. обложки). Согласно полученным результатам, LCCM-BMDM демонстрируют повышенную экспрессию *Arg1* и *Mrc1* по сравнению с М-CSF-BMDM (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). На основании полученных результатов и ранее опубликованных данных о повышенном базовом уровне экспрессии IL-10 [4] можно предположить, что LCCM-BMDM изначально демонстрируют предрасположенность к М2-подобному фенотипу после дифференцировки по сравнению с М-CSF-BMDM.

Макрофаги, полученные путем добавления LCCM, секретируют более высокие уровни IL-6 и TNF (рис. 1В, см. 2-ю стр. обложки). Данные изменения могут быть обусловлены наличием IL-6 в составе LCCM (рис. 1Г, см. 2-ю стр. обложки). Это может способствовать проявлению более выраженного М2 фенотипа при активации макрофагов IL-4, увеличивая *Arg1* и *Mrc1* [7]. Помимо IL-6, LCCM также содержит фактор, ингибирующий лейкемию, который может стимулировать макрофаги к М2-подобному фенотипу через активацию STAT3 [11].

Несмотря на эти отличия между макрофагами, полученными путем дифференцировки из клеток костного мозга в присутствии рекомбинантного М-CSF или LCCM в качестве основного источника М-CSF, LCCM-BMDM широко используются для изучения биологии макрофагов [12]. Тем не менее такой подход, на наш взгляд, является спорным в случае получения первичной культуры TAMs *in vitro*. Использование LCCM-BMDM для дальнейшей ассоциации с опухолью может приводить к искажен-

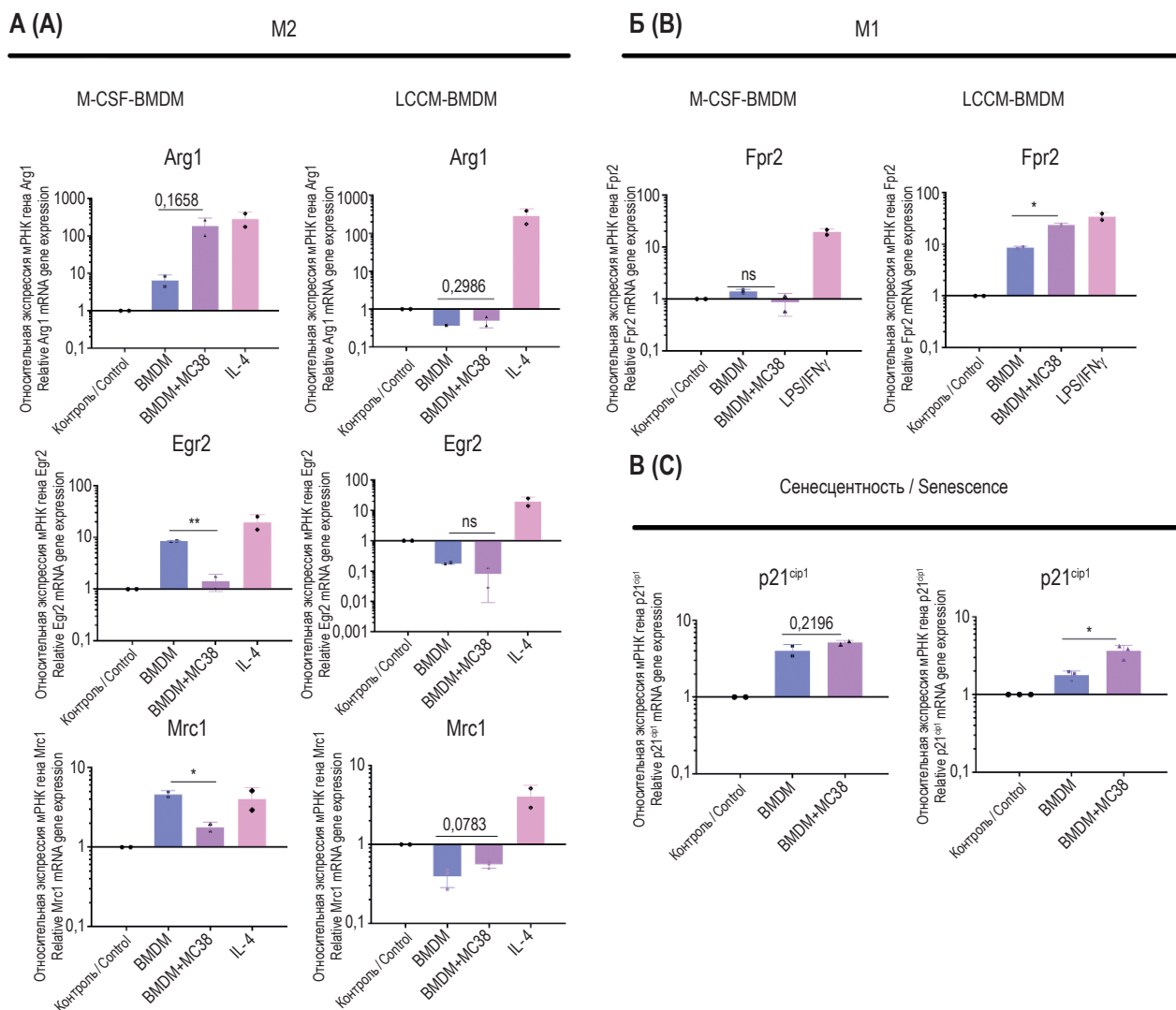


Рисунок 2. Изменения относительной экспрессии мРНК в LCCM-BMDM и M-CSF-BMDM после 24 ч ассоциации с кондиционной средой от аденокарциномы толстой кишки мыши (MC38)

Примечание. А – изменения относительной экспрессии генов M2 поляризации (*Arg1*, *Egr2*, *Mrc1* соответственно). Б – изменения относительной экспрессии генов M1 поляризации (*Fpr2*). В – изменения относительной экспрессии ингибитора клеточного цикла *p21^{cip1}*. Данные qPCR. Уровень экспрессии был нормализован относительно уровня Actb. Значения представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение среднего из двух независимых экспериментов. Контроль: M-CSF-BMDM или LCCM-BMDM, собранными сразу после окончания дифференцировки. В качестве положительного контроля M1/M2 поляризации использовались LPS/IFN γ и IL-4 соответственно. Статистический анализ проведен при помощи t-критерия Стьюдента, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, ns (non-significant) – нет разницы.

Figure 2. Changes in relative mRNA expression in LCCM-BMDM and M-CSF-BMDM after 24 h association with conditioned medium from mouse colon adenocarcinoma (MC38)

Note. A, changes in relative expression of M2 polarization genes (*Arg1*, *Egr2*, *Mrc1*, respectively). B, changes in relative expression of M1 polarization genes (*Fpr2*). C, changes in the relative expression of the cell cycle inhibitor *p21^{cip1}*. qPCR data. Expression levels were normalized relative to Actb levels. Values represent the mean $\pm$ standard deviation of the mean from two independent experiments. Control: M-CSF-BMDM or LCCM-BMDM harvested immediately after the end of differentiation. LPS/IFN γ and IL-4 were used as positive controls for M1/M2 polarisation, respectively. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ns – non-significant (Student's t-test, was used).

ным фенотипическим характеристикам TAMs (рис. 1Г, см. 2-ю стр. обложки). Кроме пластичности для макрофагов характерна способность «запоминать» различные сигналы, с которыми они раньше встречались, посредством метабо-

лических и эпигенетических изменений. Данное явление получило название тренированный иммунитет [5]. Можно предположить, что подобный механизм может лежать в основе различий M-CSF-BMDM и LCCM-BMDM.

Таким образом, переход макрофагов в фенотип, подразумеваемый конкретной моделью опухолевой ассоциации, может быть «смазан» или затруднен на фоне влияния, которое макрофаги уже получили в процессе дифференцировки от LCCM. Так, например, в полученных нами данных были показаны фенотипические различия LCCM-BMDM и M-CSF-BMDM после ассоциации кондиционной средой от аденокарциномы толстой кишки мыши (MC38). Ассоциация M-CSF-BMDM с MC38 вызывала увеличение экспрессии аргиназы *Arg1* (рис. 2А). В то же время наблюдалось снижение экспрессии *Egr2* и *Mrc1* относительно контроля (рис. 2А). При ассоциации LCCM-BMDM с MC38 наблюдалось увеличение экспрессии *Fpr2*, в отличие от M-CSF-BMDM, где экспрессия *Fpr2* (рис. 2Б) не изменялась. Также в отличие от M-CSF-BMDM в LCCM BMDM не наблюдалось увеличения *Arg1* (рис. 2А).

Тем не менее в отдельных случаях моделирование TAMs с использованием LCCM-BMDM может быть актуально — например, в моделях, в которых опухоли являются источником M-CSF. При гепатоцеллюлярной карциноме человека существует значительная связь между высокой экспрессией M-CSF и повышенной инфильтрацией макрофагов, что связано с плохой выживаемостью пациентов [8]. Однако к TAMs, которые были получены с использованием LCCM-BMDM, стоит относиться осторожнее, принимая во внимание ограничения данной модели при изучении сенесцентных макрофагов в ТМЕ. В частности было продемонстрировано, что ассоциация LCCM-BMDM с MC38 *in vitro*

приводит к значимому увеличению экспрессии $p21^{cip1}$, в отличие от M-CSF-BMDM ассоциированных с MC38 (рис. 2В).

Заключение

Наши результаты показывают, что в *in vitro* моделях TAMs использование рекомбинантного M-CSF для дифференцировки является наиболее подходящей методикой получения TAMs, которая ближе всего отражает дифференцировку TAMs *in vivo*. Кондиционная среда от L929 изначально репрограммирует макрофаги в промежуточное состояние между M2-подобным фенотипом и фенотипом характерным для сенесцентных клеток. Так, LCCM-BMDM изначально демонстрируют увеличенную экспрессию *Arg1* и *Mrc1* по сравнению с M-CSF-BMDM, а также секрецию факторов SASP — IL-6 и TNF. Таким образом, необходимо тщательно выбирать модель получения TAMs, что позволит избежать нежелательных aberrаций при тестировании новых стратегий репрограммирования ТМЕ с целью повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Благодарности

Работа Пухальской Т.В. и Богдановой Д.А. финансировалась Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; Проект НИР-ИМБ-2102). Также выражаем благодарность Друцкой Марине Сергеевне за ценные замечания и советы, а также за возможность провести работу на базе лаборатории молекулярных механизмов иммунитета.

Список литературы / References

1. Boutilier A.J., ElSawa S.F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 29, no. 22, 6995. doi: 10.3390/ijms22136995.
2. Bruni D., Angell H.K., Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat. Rev. Cancer*, 2020, Vol. 20, no. 11, pp. 662-680.
3. Chambers C.R., Ritchie S., Pereira B.A., Timpson P. Overcoming the senescence-associated secretory phenotype (SASP): a complex mechanism of resistance in the treatment of cancer. *Mol. Oncol.*, 2021, Vol. 15, no. 12, pp. 3242-3255.
4. de Brito Monteiro L., Davanzo G.G., de Aguiar C.F., Corrêa da Silva F., Andrade J.R., Campos Codo A., Silva Pereira J.A.D., Freitas L.P., Moraes-Vieira P.M. M-CSF- and L929-derived macrophages present distinct metabolic profiles with similar inflammatory outcomes. *Immunobiology*, 2020, Vol. 225, no. 3, 151935. doi: 10.1016/j.imbio.2020.151935.
5. Ding C., Shrestha R., Zhu X., Geller A.E., Wu S., Woeste M.R., Li W., Wang H., Yuan F., Xu R., Chariker J.H., Hu X., Li H., Tieri D., Zhang H.G., Rouchka E.C., Mitchell R., Siskind L.J., Zhang X., Xu X.G., McMasters K.M., Yu Y., Yan J. Inducing trained immunity in pro-metastatic macrophages to control tumor metastasis. *Nat. Immunol.*, 2023, Vol. 24, no. 2, pp. 239-254.
6. Haston S., Gonzalez-Gualda E., Morsli S., Ge J., Reen V., Calderwood A., Moutsopoulos I., Panousopoulos L., Deletic P., Carreno G., Guiho R., Manshaei S., Gonzalez-Meljem J. M., Lim H. Y., Simpson D. J., Birch J., Pallikonda H. A., Chandra T., Macias D., Doherty G. J., Rassl D. M., Rintoul R. C., Signore M., Mohorianu I., Akbar A. N., Gil J., Muñoz-

Espín D., Martínez-Barbera J.P. Clearance of senescent macrophages ameliorates tumorigenesis in KRAS-driven lung cancer. *Cancer Cell*, 2023, Vol. 41, no. 7, pp. 1242-1260.e6.

7. Hu S., Marshall C., Darby J., Wei W., Lyons A.B., Körner H. Absence of tumor necrosis factor supports alternative activation of macrophages in the liver after infection with leishmania major. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1. doi: 10.3389/fimmu.2018.00001.

8. Mantovani A., Marchesi F., Malesci A., Laghi L., Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2017, Vol. 14, no. 7, pp. 399-416.

9. Marim F.M., Silveira T.N., Lima D.S. Jr., Zamboni D.S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 12, e15263. doi: 10.1371/journal.pone.0015263.

10. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, 2008, Vol. 3, no. 6, pp. 1101-1108.

11. Yu S., Li Q., Wang Y., Cui Y., Yu Y., Li W., Liu F., Liu T. Tumor-derived LIF promotes chemoresistance via activating tumor-associated macrophages in gastric cancers. *Exp. Cell. Res.*, 2021, Vol. 406, no. 1, 112734. doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112734.

12. Yurakova T.R., Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Nosenko M.A., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S. HDM induces distinct immunometabolic phenotype in macrophages in TLR4-dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2022, Vol. 1868, no. 12, 166531. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166531.

Авторы:

Пухальская Т.В. — старший лаборант, Институт цитологии Российской академии наук; студент магистратуры АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»», Сириус; старший лаборант-исследователь, ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Юракова Т.Р. — старший инженер-исследователь ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Pukhalskaia T.V., Senior Laboratory Assistant, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences; Graduate Student, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius; Senior Research Assistant, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Yurakova T.R., Senior Research Engineer, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Михайловская В.С. — студент магистратуры
АНОО ВО «Научно-технологический университет
“Сириус”», Сириус, Россия

Богданова Д.А. — младший научный сотрудник
АНОО ВО «Научно-технологический университет
“Сириус”», Сириус; младший научный сотрудник
Институт цитологии Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

Демидов О.Н. — д.м.н., профессор, ведущий научный
сотрудник, Институт цитологии Российской академии
наук; профессор, АНОО ВО «Научно-технологический
университет “Сириус”», Сириус, Россия

Mikhailovskaya V.S., Graduate Student, Sirius University
of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russian
Federation

Bogdanova D.A., Postgraduate Student, Junior Research
Associate, Sirius University of Science and Technology,
Federal Territory Sirius; Junior Research Associate, Institute
of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg,
Russian Federation

Demidov O.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior
Research Associate, Institute of Cytology, Russian Academy
of Sciences, St. Petersburg; Professor, Sirius University of
Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russian
Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 05.04.2024
Принята к печати 09.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 05.04.2024
Accepted 09.04.2024

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ IL-10 И TGF- β В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ В-ЛИМФОЦИТОВ

Уварова А.Н., Устюгова А.С., Жеремян Э.А., Стасевич Е.М.,
Корнеев К.В., Купраш Д.В.

ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва,
Россия

Резюме. В-лимфоциты участвуют в развитии многих заболеваний, в том числе аутоиммунных, онкологических и инфекционных. В отличие от регуляторных Т-лимфоцитов, роль В-лимфоцитов в противовоспалительной регуляции иммунного ответа стала активно изучаться относительно недавно. Цитокины IL-10 и TGF- β являются одними из ключевых секретируемых факторов иммуносупрессии, поэтому изучение особенностей их транскрипционной регуляции в В-клетках представляется актуальной задачей.

Данная работа посвящена функциональной характеристике промоторных областей генов *IL10* и *TGFB1* в иммортализованных В-клеточных линиях, соответствующих разным стадиям развития В-лимфоцитов — Reh и Raji. Для этого мы идентифицировали области потенциальных промоторов генов *IL10* и *TGFB1*, ориентируясь на эпигенетические признаки функциональных регуляторных областей, определяемых биоинформатическими методами анализа данных ChIP-Seq хроматиновых меток в CD19⁺ лимфоцитах. Мы изучили активность выбранных промоторов с помощью репортерного анализа в В-клетках. Дополнительно, мы функционально охарактеризовали однонуклеотидный полиморфизм rs1800469, который расположен в промоторе *TGFB1* и ассоциирован с развитием колоректального рака, хронической обструктивной болезнью легких и риском радиационного фиброза. Активность промоторов *IL10* и *TGFB1* возрастала в модели про-В-клеток Reh и модели более зрелых В-лимфоцитов Raji после стимуляции форболовым эфиром, причем активность обоих промоторов была ниже в клетках линии Raji. Присутствие минорного аллеля однонуклеотидного полиморфизма rs1800469(A) приводило к повышению активности промотора гена *TGFB1* в стимулированной клеточной линии Reh. Более высокая активность промоторов *IL10* и *TGFB1* в клетках острого лимфобластного лейкоза Reh может быть связана с характерным для этой патологии увеличением имму-

Адрес для переписки:

Уварова Аксинья Николаевна
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.
Тел.: 8 (499) 135-14-05.
E-mail: uvarowww@gmail.com

Address for correspondence:

Aksinya N. Uvarova
Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences
32 Vavilova St
Moscow
119991 Russian Federation
Phones: +7 (499) 135-14-05.
E-mail: uvarowww@gmail.com

Образец цитирования:

А.Н. Уварова, А.С. Устюгова, Э.А. Жеремян,
Е.М. Стасевич, К.В. Корнеев, Д.В. Купраш
«Функциональная характеристика промоторов генов
противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- β
в клеточных моделях В-лимфоцитов» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 701–706.
doi: 10.15789/1563-0625-FCO-16940

© Уварова А.Н. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.N. Uvarova, A.S. Ustiugova, E.A. Zheremyan,
E.M. Stasevich, K.V. Korneev, D.V. Kuprash “Functional
characteristics of the gene promoters of anti-inflammatory
cytokines TGF- β and IL-10 in B lymphocyte cell models”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 4, pp. 701–706.
doi: 10.15789/1563-0625-FCO-16940

© Uvarova A.N. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-FCO-16940

носупрессии. Также возможно, что активация про-В-клеток Reh вызывает их дифференцировку в моноцитоподобные клетки, которые под аутокринным воздействием TGF- β и IL-10 могут поляризоваться в M2-макрофаги, продуцирующие противовоспалительные цитокины. M2-макрофаги могут функционировать в качестве опухоль-ассоциированных макрофагов, которые являются важным компонентом опухолевого микроокружения и способствуют развитию колоректального рака. Кроме того, повышенный уровень TGF- β в тканях повышает риски возникновения фиброза и снижает уровень воспаления при хронической обструктивной болезни легких.

Ключевые слова: регуляция транскрипции, иммуносупрессия, В-лимфоциты, IL-10, TGF- β , SNP

FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE GENE PROMOTERS OF ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES TGF- β AND IL-10 IN B LYMPHOCYTE CELL MODELS

Uvarova A.N., Ustiugova A.S., Zheremyan E.A., Stasevich E.M., Korneev K.V., Kuprash D.V.

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. B cells play a crucial role in the pathogenesis of various diseases, such as autoimmune disorders, cancers, and infections. Unlike regulatory T cells, the anti-inflammatory capabilities of B cells have only recently garnered attention. Cytokines IL-10 and TGF- β are among the key secreted immunosuppressive factors, therefore studying the characteristics of their transcriptional regulation in B cells appears to be a relevant task. This study focuses on characterizing the promoter regions of *IL10* and *TGFB1* genes in immortalized B cell lines representing different developmental stages — Reh and Raji. To achieve this, we identified potential promoter regions guided by the epigenetic features of functional regulatory regions determined by bioinformatics methods of ChIP-Seq data analysis of chromatin marks in CD19⁺ lymphocytes. We examined the activity of selected promoters using reporter analysis in B cells. Additionally, we studied the impact of a single nucleotide polymorphism rs1800469 in the *TGFB1* promoter, which is associated with the development of colorectal cancer, chronic obstructive pulmonary disease, and the risk of radiation fibrosis. Our results showed increased promoter activity of *IL10* and *TGFB1* in the Reh pro-B cells compared to the Raji mature B cells upon stimulation. Interestingly, the presence of the minor allele of rs1800469 led to enhanced *TGFB1* promoter activity in the Reh cells. Higher activity of *IL10* and *TGFB1* promoters in acute lymphoblastic leukemia Reh cells may be associated with the increased immunosuppression, which is characteristic of this pathology. It is also possible that activation of pro-B cells Reh induces their differentiation into monocyte-like cells, which can be polarized into alternatively activated (M2) macrophages by autocrine TGF- β and IL-10. M2 macrophages can function as tumor-associated macrophages and contribute to the development of colorectal cancer. Moreover, increased levels of TGF- β in tissues increase the risks of fibrosis and decrease inflammation levels in chronic obstructive pulmonary disease.

Keywords: transcription regulation, immunosuppression, B cells, IL-10, TGF- β , SNP

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда: грант № 22-14-00398 (изучение промотора IL-10), грант № 21-74-00106 (изучение промотора TGF- β).

Введение

В-лимфоциты играют важную роль в регуляции иммунного ответа как в норме, так и при патологических состояниях [3]. Традиционно основной функцией В-клеток считается продукция антител в ответ на чужеродные антигены, однако

также известны иммуносупрессорные свойства В-клеток [13]. Регуляторные В-лимфоциты осуществляют свою иммуносупрессивную функцию за счет продукции провоспалительных цитокинов IL-10, TGF- β , IL-35, гранзима В, а также экспрессии CD39, CD73 и PD-L1, которые ингибируют пролиферацию и продукцию цитокинов эффекторными Т-клетками [14, 15]. В представленной работе мы сфокусировались на функциональной характеристике промоторных областей генов *TGFB1* и *IL10* в В-клеточных линиях Reh и

Raji, в которых была показана экспрессия исследуемых генов, согласно базам данных FANTOM5 human promoterome (<https://fantom.gsc.riken.jp/zenbu/>) и Cancer Cell Line Encyclopedia (<https://sites.broadinstitute.org/ccle/>). По своим характеристикам происходящая из острого лимфобластного лейкоза линия Reh соответствует стадии про-В-клеток, а изолированные из пациента с лимфомой Беркитта клетки Raji представляют собой модель наивных В-лимфоцитов [7].

Материалы и методы

Области промотора *IL10* и *TGFB1* определяли с использованием данных ENCODE, Roadmap визуализированным в геномном браузере UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>), на основании эпигенетических признаков регуляторных областей: пиков ацетилирования лизина 27 гистона H3 (H3K27Ac), моно- и триметилирования лизина 4 гистона H3 (H3K4me1, H3K4me3), а также данных о чувствительности к ДНКазе I и наличию сайтов посадки транскрипционных факторов (ТФ). Оценка активности выбранных промоторов генов *IL10* и *TGFB1*, содержащего альтернативные варианты rs1800469, проводилась с использованием двойного люциферазного теста. Для этого потенциальные промоторные последовательности гена *IL10* (chr1:206772847-206773555; GRCh37/hg19) и *TGFB1* (chr19:41858947-41861101; GRCh37/hg19) были амплифицированы при помощи ПЦР с геномной ДНК с использованием специфических праймеров, содержащих сайты рестрикции. Затем промоторные области были клонированы перед репортерным геном люциферазы Firefly в вектор pGL3-basic (Promega, США). Введение в последовательность промотора минорного А-аллеля rs1800469 осуществилось с использованием ПЦР-направленного мутагенеза с перекрывающимися праймерами. Плазмиды выделяли с помощью набора Plasmid Midiprep (ЗАО «Евроген», Россия) и верифицировали секвенированием по Сэнгеру (ЦКП «Геном», Россия) [12].

Клетки линий Raji и Reh культивировали в среде RPMI 1640 (НПП «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% FBS (Corning, США), 2 mM L-глутамина, 1 mM пирувата натрия, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все НПП «ПанЭко», Россия), заменимых аминокислот и 10 mM HEPES (все Gibco, США). Стимуляцию клеток осуществляли путем добавления в культуральную среду форбол-12-миристан-13-ацетата (1 мкг/мл, РМА; Sigma-Aldrich, США) за 24 ч до трансфекции плазмидами, в качестве контроля активации добавляли фосфатно-солевой буфер (PBS). Трансфекцию клеток проводили с использованием системы для электропора-

ции Neon Transfection System (Thermo Scientific, США). На одну точку брали 2,5 млн клеток, добавляли к ним 5 мкг тестируемых плазмид в сочетании с 0,5 мкг контрольного вектора pRL-CMV (Promega, США), экспрессирующим люциферазу Renilla под сильным CMV-промотором. Клетки подвергали электропорации с параметрами: один импульс напряжением 1300 В и длительностью 30 мс. Через 24 ч после трансфекции клетки лизировали с использованием набора Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, США) и на люминометре 20/20n (Turner BioSystems, США) измеряли сигнал от люцифераз Firefly и Renilla, согласно протоколу производителя.

Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (версия 9.0.0. для Windows, GraphPad Software, США; www.graphpad.com). Для определения степени достоверности использовали непарный t-критерий Стьюдента. Данные были получены не менее чем в трех независимых экспериментах и представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистически значимое различие идентифицировали при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Мы изучили активность промоторов противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF-β (рис. 1А, Б) в immortalized В-клеточных линиях Reh и Raji без и при стандартной активации лимфоцитов с использованием РМА. Для этого, репортерные конструкции с клонированными промоторами *IL10* или *TGFB1* мы трансфицировали клетки Reh и Raji и измеряли активность репортерной люциферазы с помощью двойного репортерного теста. В отсутствие активации выбранные нами промоторные последовательности обладали достаточно низкой эффективностью во всех представленных клеточных линиях (рис. 1В, Г). Активность промоторов *IL10* и *TGFB1* значительно возрастала в обеих РМА-стимулированных В-лимфоцитарных клеточных линиях, при этом активность промотора была ниже в клетках линии Raji (рис. 1В, Г). Дополнительно, мы провели функциональный анализ однонуклеотидного полиморфизма rs1800469(G/A), расположенного в промоторе гена *TGFB1* (рис. 1Б). Минорный аллель rs1800469(A) встречается в Европейской популяции с частотой 0,32, ассоциирован с повышенным риском развития колоректального рака [11] и лучевого фиброза [6], но является протективным в случае хронической обструктивной болезни легких [2]. Для функциональной аннотации полиморфизма rs1800469 мы протестировали активность промотора гена *TGFB1* в зависимости

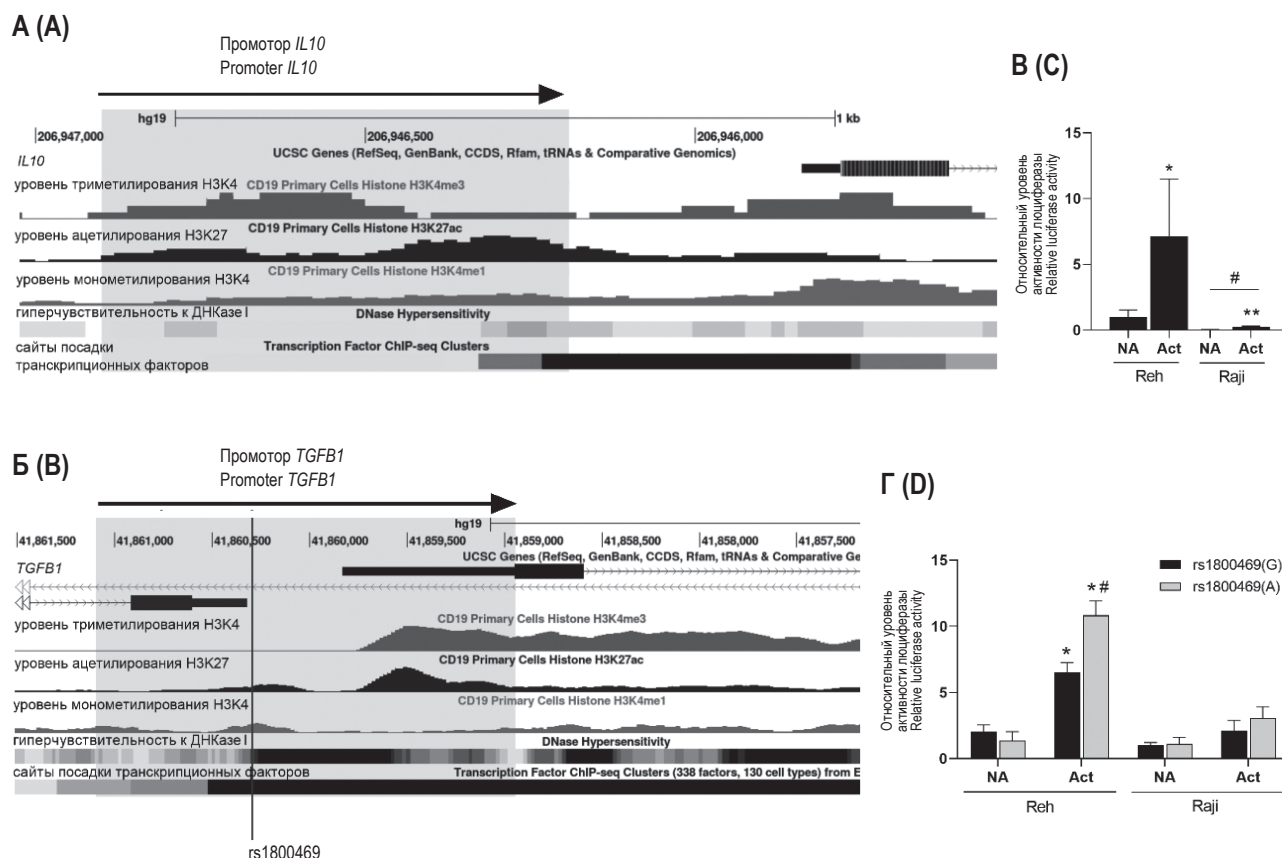


Рисунок 1. Расположение промоторов генов *IL10* (А) и *TGFB1* (Б) относительно эпигенетических меток активного хроматина в первичных В-лимфоцитах согласно данным ENCODE и Roadmap (GRCh37/hg19)

Примечание. Серым обозначены границы промоторов, вертикальной линией – расположение полиморфизма rs1800469.

H3K4me1 – пики монометилирования 4 лизина 3 гистона, H3K4me3 – пики триметилирования 4 лизина 3 гистона, H3K27Ac – пики ацетилирования 27 лизина 3 гистона. Прямоугольниками отмечены кластеры гиперчувствительности к ДНКазе I и сайты связывания транскрипционных факторов.

В – относительная активность промотора гена *IL10* в составе люциферазных репортерных конструкций, трансфицированных в PMA-стимулированные В-клеточные линии Reh и Raji. Относительный сигнал светлячковой люциферазы нормирован на сигнал люциферазы Renilla, а также на сигнал из клеток Reh без активации.

Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD, $n \geq 3$, ** $p < 0,005$ – достоверная разница между активностью промотора в стимулированных и неактивированных клетках Raji, * $p < 0,05$ – достоверная разница между активностью промотора в стимулированных и неактивированных клетках Reh, # $p < 0,05$ – достоверная разница активности промотора между клеточными линиями (непарный критерий t-Стьюдента). Г – относительная активность промоторов *TGFB1*, содержащих альтернативные варианты rs1800469 в составе люциферазных репортерных конструкций, трансфицированных в Reh и Raji. Относительный сигнал светлячковой люциферазы нормирован на сигнал люциферазы Renilla. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD, $n \geq 3$. # $p < 0,05$ – достоверная разница между вариантами промотора, содержащего альтернативные аллели rs1800469; * $p < 0,05$ – достоверная разница между активностью промотора в активированных клетках Reh и в остальных точках (непарный критерий t-Стьюдента).

Figure 1. Schematic representation of the *IL10* (A) and *TGFB1* (B) promoters relative to epigenetic marks of active chromatin in primary B-cells based on the ENCODE and Roadmap data (GRCh37/hg19)

Note. Gray marks the putative promoters, the vertical line shows the location of the rs1800469. Histograms indicate the location of histone modifications (H3K4 mono/tri-methylation, H3K27 acetylation). Rectangles mark regulatory elements positions according to ENCODE, DNase I hypersensitivity clusters (DNase I) and transcription factor ChIP-seq (TF clusters). C, relative luciferase activity in Reh and Raji cells transfected with constructs containing *IL10* promoter. All data were normalized to Renilla luciferase internal reference and further normalized to the luciferase activity of Reh cells without activation. Data are presented as mean values $\pm$ SD, $n \geq 3$, ** $p < 0.005$ – significant difference between promoter activity in Raji cells with and without activation, * $p < 0.05$ – significant difference between promoter activity in Reh cells with and without activation, # $p < 0,05$ – significant difference between promoter activity in Reh and Raji cells as calculated by unpaired Student's t-test. D, relative activity of the *TGFB1* promoters with alternative rs1800469 alleles in luciferase reporter constructs transfected into the Reh and Raji cells. All data were normalized to Renilla luciferase internal reference. Data are presented as mean values $\pm$ SD, $n \geq 3$. # $p < 0.05$ – significant difference between variants of the promoter containing alternative alleles of rs1800469; * $p < 0.05$ – significant difference between promoter activity in activated and non-activated cells, as calculated by unpaired Student's t-test.

от представленного аллеля SNP в люциферазном тесте. Люциферазный тест проводился через 24 ч после активации клеток с использованием РМА. Согласно полученным результатам, минорный аллель полиморфизма rs1800469(A) увеличивает активность промотора гена *TGFB1* в клеточной линии Reh (рис. 1Г). Часто аллель-специфическая разница активностей регуляторных элементов генов, содержащих альтернативные варианты SNP, связана с изменением силы связывания функционального транскрипционного фактора. Биоинформатическое приложение ANANASTRA (<https://ananastra.autosome.ru/>), содержащее обширные данные об аллель-специфическом связывании ТФ с полиморфизмами в разных типах клеток, предсказывает более сильное связывание ТФ CTCF при наличии минорного аллеля rs1800469(A) в клетках поджелудочной железы, что косвенно может указывать на участие этого фактора в аллель-специфической активности промотора *TGFB1*.

Общий более высокий уровень активности промоторов *IL10* и *TGFB1* в клетках Reh может объясняться их происхождением из острого лимфобластного лейкоза, для которого характерно увеличение числа регуляторных В-лимфоцитов в крови, способствующих иммуносупрессии за счет секреции противовоспалительных факторов [1]. Другим объяснением наблюдаемого фенотипа может служить возможная дифференцировка Reh в моноцитоподобные клетки при активации [10]. Это согласуется с известным фактом дифференцировки про-В-клеток в моноциты, которые под аутокринным воздействием *TGF-β* и *IL-10* могут поляризоваться в альтернативно-активированные макрофаги (M2), про-

дуцирующих еще большее количество противовоспалительных цитокинов [9]. M2-макрофаги могут функционировать в качестве опухоль-ассоциированных макрофагов, которые являются важным компонентом опухолевого микроокружения и способствуют развитию колоректального рака [8]. Кроме того, повышенный уровень *TGF-β* в тканях повышает риски возникновения фиброза [5] и снижает уровень воспаления при хронической обструктивной болезни легких [4].

Заключение

В настоящей работе показано, что активность промоторов *IL10* и *TGFB1* была значительно выше в стимулированных клетках линии Reh, что может объясняться их происхождением из острого лимфобластного лейкоза, для которого характерно увеличение числа регуляторных В-лимфоцитов в крови, способствующих иммуносупрессии за счет секреции противовоспалительных факторов. С другой стороны, такой фенотип может быть вызван их дифференцировкой в моноцитоподобные клетки. Это согласуется с известным фактом дифференцировки про-В-клеток в моноциты, которые под аутокринным воздействием *TGF-β* и *IL-10* могут поляризоваться в альтернативно-активированные макрофаги, активно продуцирующие противовоспалительные цитокины. Присутствие минорного аллеля однонуклеотидного полиморфизма rs1800469(A), который ассоциирован с повышенным риском развития колоректального рака и лучевого фиброза и снижением воспаления при хронической обструктивной болезни легких, увеличивает активность промотора гена *TGFB1* в клеточной линии Reh.

Список литературы / References

1. Brum da Silva Nunes V., Kehl Dias C., Nathali Scholl J., Nedel Sant'Ana A., de Fraga Dias A., Granero Farias M., Alegretti A.P., Sosnoski M., Esteves Daudt L., Bohns Michalowski M., Oliveira Battastini A.M. Lymphocytes from B-acute lymphoblastic leukemia patients present differential regulation of the adenosinergic axis depending on risk stratification. *Discov. Oncol.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 143. doi: 10.1007/s12672-022-00602-1.
2. Celedon J.C., Lange C., Raby B.A., Litonjua A.A., Palmer L.J., DeMeo D.L., Reilly J.J., Kwiatkowski D.J., Chapman H.A., Laird N., Sylvia J.S. The transforming growth factor-β1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum. Mol. Genet.*, 2004, Vol. 13, no. 15, pp. 1649-1656.
3. Chekol Abebe E., Asmamaw Dejenie T., Mengie Ayele T., Dagnew Baye N., Agegnehu 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.
4. Di Stefano A., Sangiorgi C., Gnemmi I., Casolari P., Brun P., Ricciardolo F.L., Contoli M., Papi A., Maniscalco P., Ruggeri P., Girbino G. TGF-β signaling pathways in different compartments of the lower airways of patients with stable COPD. *Chest*, 2018, Vol. 153, no. 4, pp. 851-862.
5. Frangogiannis, N.G., Transforming growth factor-β in tissue fibrosis. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 3, e20190103. doi: 10.1084/jem.20190103.
6. Grossberg A.J., Lei X., Xu T., Shaitelman S.F., Hoffman K.E., Bloom E.S., Stauder M.C., Tereffe W., Schlembach P.J., Woodward W.A., Buchholz T.A. Association of transforming growth factor β polymorphism C-509T with radiation-induced fibrosis among patients with early-stage breast cancer: a secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Oncol.*, 2018, Vol. 4, no. 12, pp. 1751-1757.

7. Hartmann T.N., Leick M., Ewers S., Diefenbacher A., Schraufstatter I., Honczarenko M., Burger M. Human B cells express the orphan chemokine receptor CCR4-1 in a maturation-stage-dependent and CCR4-1 modulated manner. *Immunology*, 2008, Vol. 125 no. 2, pp. 252-262.
8. Hou S., Zhao Y., Chen J., Lin Y., Qi X. Tumor-associated macrophages in colorectal cancer metastasis: molecular insights and translational perspectives. *J. Transl. Med.*, 2024, Vol. 22, no. 1, 62. doi: org/ 10.1186/s12967-024-04856-x.
9. Li M., Jiang P., Wei S., Wang J., Li, C., The role of macrophages-mediated communications among cell compositions of tumor microenvironment in cancer progression. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1113312. doi: 10.3389/fimmu.2023.1113312.
10. Patel B., Mohammad R.M., Blaustein J., Al-Katib A. Induced expression of a monocytoid B lymphocyte antigen phenotype on the REH cell line. *Am. J. Hematol.*, 1990, Vol. 33, no. 3, pp. 153-159.
11. Stanilova S., Stanilov N., Julianov A., Manolova I., Miteva L. Transforming growth factor- β 1 gene promoter-509C/T polymorphism in association with expression affects colorectal cancer development and depends on gender. *PloS One*, 2018, Vol. 13, no. 8, e0201775. doi: 10.1371/journal.pone.0201775.
12. Uvarova A.N., Stasevich E.M., Ustiugova A.S., Mitkin N.A., Zheremyan E.A., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Bogolyubova A.V., Rubtsov M.A., Kulakovskiy I.V., Kuprash, D.V. rs71327024 Associated with COVID-19 hospitalization reduces CXCR6 promoter activity in Human CD4⁺ T cells via disruption of c-myc binding. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 18, 13790. doi: 10.3390/ijms241813790.
13. Zheremyan E.A., Ustiugova A.S., Karamushka N.M., Uvarova A.N., Stasevich E.M., Bogolyubova A.V., Kuprash D.V., Korneev K.V. Breg-mediated immunoregulation in the skin. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, Vol. 25, no. 1, 583. doi: 10.3390/ijms25010583.
14. Zheremyan E.A., Ustiugova A.S., Uvarova A.N., Karamushka N.M., Stasevich E.M., Gogoleva V.S., Bogolyubova A.V., Mitkin N.A., Kuprash D.V., Korneev, K.V. Differentially activated B cells develop regulatory phenotype and show varying immunosuppressive features: a comparative study. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1178445. doi: 10.3389/fimmu.2023.1178445.
15. Zheremyan E.A., Ustiugova A.S., Radko A.I., Stasevich E.M., Uvarova A.N., Mitkin N.A., Kuprash D.V., Korneev K.V. Novel potential mechanisms of regulatory B cell-mediated immunosuppression. *Biochemistry (Moscow)*, 2023, Vol. 88, no. 1, pp. 13-21.

Авторы:

Уварова А.Н. — к.б.н., младший научный сотрудник центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Устиугова А.С. — старший лаборант центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Жеремян Э.А. — старший лаборант лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Стасевич Е.М. — младший научный сотрудник центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Корнеев К.В. — к.б.н., старший научный сотрудник центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Купраш Д.В. — д.б.н., профессор, член-корр. РАН, главный научный сотрудник, руководитель центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Uvarova A.N., PhD (Biology), Junior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Ustiugova A.S., Senior Laboratory Assistant, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Zheremyan E.A., Senior Laboratory Assistant, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Stasevich E.M., Junior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Korneev K.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kuprash D.V., PhD, MD (Biology), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Chief Research Associate and Head of the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 04.04.2024

Отправлена на доработку 06.04.2024

Принята к печати 17.04.2024

Received 04.04.2024

Revision received 06.04.2024

Accepted 17.04.2024

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА TAS2R38 В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Нёма М.А., Муркина Р.Г., Минеев В.Н.

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В настоящее время все больше появляется данных об экстраоральных рецепторах к горькому вкусу (TAS2R). В обзоре приводятся современные данные по полиморфизмам, особенностям экспрессии и функционирования 38-го подтипа TAS2R (TAS2R38), его молекулярных вариантах, различающихся степенью чувствительности к лигандам и их роли в патогенезе заболеваний органов дыхания. Показывается механизм трансдукции сигнала от вкусовых рецепторов, опосредованный G-белком. Приводятся сведения об участии TAS2R38 в системе местной защиты в реснитчатом эпителии дыхательных путей, его активации молекулами системы “quorum sensing” и связи с компонентами мукоцилиарного клиренса. Было показано, что действие лиганда на TAS2R38 приводит к активации NO-синтазы с последующей продукцией оксида азота (NO), запускающего ряд внутриклеточных реакций, ведущих к увеличению скорости биения ресничек мерцательного эпителия, а также оказывающего прямое антибактериальное действие. TAS2R38 также обнаруживается на лейкоцитах, причем его экспрессия с возрастом снижается, что может рассматриваться в качестве компонента общего старения иммунокомпетентных клеток организма. Известно, что активация TAS2R38, кроме того, способствует усилению фагоцитарной активности макрофагов, что также опосредовано действием G-белка и цГМФ. Рецепторы TAS2R рассматриваются и как структуры, ассоциированные с аллергическими заболеваниями, в частности с бронхиальной астмой. В ходе ряда исследований в группах детей с бронхиальной астмой было выявлено, что экспрессия большинства TAS2R выше у детей с тяжелой бронхиальной астмой. В других работах было показано, что у лиц с эозинофильным вариантом хронического риносинусита наблюдается более высокий уровень экспрессии TAS2R38 в верхних дыхательных путях в сравнении с таковым у лиц с хроническим риносинуситом без эозинофилии. На сегодняшний день функциональная значимость экстраоральных рецепторов к горькому вкусу изучена не в полной мере. В дальнейшем еще предстоит выполнить большой объем исследовательской работы для окончательного понимания роли TAS2R в патогенезе заболеваний органов дыхания.

Ключевые слова: TAS2R, TAS2R38, полиморфизм, G-белок, система “quorum sensing”, бронхиальная астма

Адрес для переписки:

Муркина Рахиль Геннадьевна
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова»
197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6-8.
Тел.: 8 (900) 620-53-96.
E-mail: mrg1327x@inbox.ru

Address for correspondence:

Rakhil G. Murkina
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
6-8, L. Tolstoy St
St. Petersburg
197022 Russian Federation
Phone: +7 (900) 620-53-96.
E-mail: mrg1327x@inbox.ru

Образец цитирования:

М.А. Нёма, Р.Г. Муркина, В.Н. Минеев «Роль генетического полиморфизма TAS2R38 в патогенезе заболеваний органов дыхания» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 707-710.
doi: 10.15789/1563-0625-ROT-16925

© Нёма М.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.A. Nyoma, R.G. Murkina, V.N. Mineev “Role of TAS2R38 polymorphism in respiratory diseases pathogenesis”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 707-710.
doi: 10.15789/1563-0625-ROT-16925

© Nyoma M.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-ROT-16925

ROLE OF TAS2R38 POLYMORPHISM IN RESPIRATORY DISEASES PATHOGENESIS

Nyoma M.A., Murkina R.G., Mineev V.N.

First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. More and more new data, concerning extraoral bitter taste receptors (TAS2R), appear now. Current data on polymorphisms, expression patterns and form of TAS2R subtype 38 (TAS2R38), its molecular variants that differ in the degrees of sensitivity to ligands and their role in the pathogenesis of respiratory disorders are discussed in this review. The mechanism of signal transduction from taste receptors mediated by G-protein is shown. Participation of TAS2R38 in the local protective mechanisms in a ciliated epithelium of the respiratory tract and its activation by “quorum sensing” system molecules and its connection with the components of mucociliary clearance are presented. It has been shown that the action of the ligand on the TAS2R38 leads to the activation of NO synthase, followed by the production of nitric oxide (NO), which triggers a number of intracellular reactions leading to an increase in the rate of beating of the cilia of the ciliary epithelium, as well as having a direct antibacterial effect. TAS2R38 are also found on leukocytes, and its expression decreases with age, which can be considered as a component of the general aging of immunocompetent cells in the body. It is known that activation of TAS2R38 also enhances the phagocytic activity of macrophages, which is also mediated by the action of G-protein and cGMP. TAS2R receptors are also considered to be associated with allergic diseases, in particular – with bronchial asthma. A number of studies in groups of children with bronchial asthma revealed that the expression of most TAS2Rs was higher in children with severe bronchial asthma. Other studies have shown that patients with the eosinophilic variant of chronic rhinosinusitis have a higher levels of TAS2R38 expression in the upper respiratory tract compared to those with chronic rhinosinusitis without eosinophilia. To date, the functional significance of extraoral bitter taste receptors has not been fully studied. In the future, a large amount of research work remains to be done to finally understand the role of TAS2R in the pathogenesis of respiratory diseases.

Keywords: TAS2R, TAS2R38, polymorphism, G-protein, “quorum sensing” system, bronchial asthma

К настоящему времени описаны 25 подтипов TAS2R [12], экспрессия которых представляет собой ткане- и клеточноспецифичный процесс [6], предопределенный функционированием данных рецепторов посредством G-белок-ассоциированного пути внутриклеточной сигнальной системы [5]. При этом каждый подтип TAS2R характеризуется собственным селективным сродством к веществам горького вкуса (вкусовым лигандам) [12] и обладает определенным диапазоном чувствительности, обусловленным генетическим полиморфизмом.

Ранее мы исследовали вклад однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism – SNP) элементов сигнальной системы JAK-STAT в патогенез бронхиальной астмы [1, 2]. В сигнальных системах TAS2-рецепторов наибольшей информативностью в рамках генетического полиморфизма в настоящее время обладает рецептор TAS2R38.

Известно, что ген, кодирующий TAS2R38, локализуется в участке 7q34 и содержит 1 экзон. Соответствующий ему рецептор имеет сродство к фенилтиокарбамиду (PTC) и 6-N-пропилтиоурацилу (PROP) [11]. Оба соединения являются производными тиомочевины и имеют в своем составе тиоцианатную химическую группу (N C-S-), благодаря которой обладают горьким вкусом. Несмотря на это, далеко не все способ-

ны ощущать горький вкус фенилтиокарбамидом и 6-N-пропилтиоурацилом, что объясняется существованием нескольких форм рецептора TAS2R38, различающихся по степени вкусовой чувствительности.

Известны две наиболее распространенные молекулярные формы TAS2R38: PAV (пролин-аланин-валин) и AVI (аланин-валин-изолейцин) [4], детерминированные тремя SNP гена TAS2R38. Так, SNP rs713598, rs1726866 и rs10246939 ведут к замене пролина на аланин в положении 49 (Pro49Ala), аланина на валин в положении 262 (Ala262Val) и валина на изолейцин в положении 296 (Val296Ile) соответственно [3]. Совместное наследование перечисленных вариантов, в свою очередь, приводит к образованию одного из ранее упомянутых форм рецептора. При этом PAV является активной формой рецептора TAS2R38 (предопределяет низкий порог чувствительности), а AVI – неактивной (предопределяет высокий порог чувствительности), что в пределах рецепторных клеток II типа языка и неба обуславливает высокую или низкую вкусовую чувствительность соответственно.

В пределах реснитчатого эпителия дыхательных путей представленные выше формы TAS2R38 предопределяют степень выраженности местной протекции, основанной на механизме действия NO (усилении мукоцилиарного клиренса, пря-

мом антибактериальном эффекте) [8], продукция которого осуществляется за счет активации рецептора молекулами системы “quorum sensing”, выступающими в роли дополнительной группы его агонистов [10].

Взаимодействие TAS2R с лигандами, в том числе с молекулами системы “quorum sensing”, продуцируемыми *Pseudomonas aeruginosa* и другими грамотрицательными бактериями, запускает сигнальный каскад, включающий активацию G-белка с последующей его диссоциацией на G-субъединицу гастрин и G 3/G 13-субъединицы, PLC 2-опосредованное высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, Ca^{2+} -зависимую активацию, предположительно, эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) с целью продукции оксида азота (NO) [8]. Синтезированный в таких условиях NO запускает ряд внутриклеточных реакций, ведущих к увеличению скорости биения ресничек мерцательного эпителия, а также оказывает прямое антибактериальное действие при диффузии через апикальную мембрану.

Как отмечено ранее, эффективность TAS2R38-опосредованной протекции зависит от варианта (PAV или AVI) рецептора. Наилучший PTC-, 3-охо-С12-HSL- и С4-HSL-индуцированный ответ в виде повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , наибольший прирост скорости движения ресничек мерцательного эпителия и концентрации NO наблюдался при гомозиготном гаплотипе PAV/PAV в сравнении с таковым при гаплотипах PAV/AVI и AVI/AVI [9]. Таким образом, можно предположить, что лица с гомозиготным гаплотипом PAV/PAV более устойчивы к респираторным инфекциям.

Отдельное внимание обращает на себя факт обнаружения рецептора TAS2R38 на лейкоцитах (нейтрофилах, моноцитах, лимфоцитах) периферической крови человека [15]. Преимущественно, TAS2R38 экспрессируется на нейтрофилах и моноцитах. В меньшей степени рецептор экспрессируется на лимфоцитах [15]. При этом в пределах данной фракции лейкоцитов по выраженности экспрессии CD8^+ -Т-лимфоциты (цитотоксические Т-лимфоциты) уступают CD4^+ -Т-лимфоцитам (Т-хелперам) [15]. С возрастом количество экспрессируемых рецепторов TAS2R38 во всех фракциях лейкоцитов значительно сокращается [15], что может рассматриваться в качестве компонента общего старения иммунокомпетентных клеток организма, ведущего к снижению протективных возможностей иммунитета.

Функциональная значимость TAS2R38, локализованного на лейкоцитах, изучена не в полной мере. Известно, что активация данного рецептора осуществляется, в частности, путем взаимодействия с ранее уже упоминаемой сигнальной молекулой 3-охо-С12-HSL (N-(3-оксододеканойл)-L-гомосерин лактон) и, предположительно, сопровождается Ca^{2+} -опосредованной индукцией иммунного ответа.

Известно, что активация TAS2R38 также способствует усилению фагоцитарной активности макрофагов. Недавно проведенные исследования выявили в макрофагах Ca^{2+} -зависимую активацию эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и нейрональной NO-синтазы (nNOS) с последующей продукцией NO в ответ на стимуляцию TAS2R (в том числе TAS2R38), что ранее было продемонстрировано в пределах мерцательного эпителия дыхательных путей. Синтезированный в таких условиях NO, в свою очередь, запускает ряд внутриклеточных реакций, включающий образование цГМФ и активацию протеинкиназы G, сопровождающуюся усилением фагоцитарной активности [7].

В настоящее время рецепторы TAS2R рассматриваются не только в качестве компонентов врожденного иммунитета, но и как структуры, ассоциированные с аллергическими заболеваниями, в частности с бронхиальной астмой. В ходе ряда исследований в группах детей с бронхиальной астмой было выявлено, что экспрессия большинства TAS2R выше у детей с тяжелой бронхиальной астмой [13].

Данные, касающиеся оценки особенности экспрессии непосредственно TAS2R38 при заболеваниях аллергической природы, носят весьма ограниченный характер. Так, согласно некоторым исследованиям, у лиц с эозинофильным вариантом хронического риносинусита наблюдается более высокий уровень экспрессии TAS2R38 в пределах верхних дыхательных путей в сравнении с таковым у лиц с хроническим риносинуситом без эозинофилии [14].

Проанализированы литературные источники, импакт-фактор которых составляет не менее 0,4, с использованием базы данных PubMed и Medline.

В ходе анализа данных литературы установлено, что полиморфизм TAS2R38 значим в патогенезе заболеваний органов дыхания. В дальнейшем необходимо исследовать полиморфизм других молекул TAS2R, в том числе в отечественной популяции, для понимания патогенеза бронхообструкции.

Вклад экстраоральных TAS2R в бронходилатацию и реализацию механизмов местного иммунитета в слизистой бронхов позволяет рассматривать их в качестве значимого звена патогенеза болезней органов дыхания, а их полиморфизмы — как фактор прогноза риска развития и тяжести течения заболеваний, эффективности терапии. Таким образом, отметим, что TAS2-рецепторы — это потенциально новая мишень для воздействия на патогенез респираторной патологии. Дальнейшие исследования экспрессии TAS2R, ее регуляции, полиморфизмов разных подтипов этих рецепторов должны предоставить новые факты о роли этих молекул в механизмах мукоцилиарного клиренса, бронходилатации и иммунитета.

Список литературы / References

1. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А. Полиморфизм гена белка STAT6 и бронхиальная астма (обзор литературы) // Казанский медицинский журнал, 2009. Т. 90, № 1. С. 102-109. [Mineev V.N., Sorokina L.N., Nema M.A. STAT6 protein polymorphism and bronchial asthma (review). *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2009, Vol. 90, no. 1, pp. 102-109. (In Russ.)].
2. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Дубина М.В., Янчина Е.Д. Интронный полиморфизм rs324011 гена белка STAT6 у пациентов с различной тяжестью течения бронхиальной астмы // Казанский медицинский журнал, 2010. Т. 91, № 1. С. 12-15. [Mineev V.N., Sorokina L.N., Nema M.A., Dubina M.V., Yanchina E.D. Intron polymorphism of the rs324011 gene of STAT6 protein in patients with varying severity of bronchial asthma. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2010, Vol. 91, no. 1, pp. 12-15. (In Russ.)].
3. Bachmanov A.A., Beauchamp G.K. Taste receptor genes. *Annu. Rev. Nutr.*, 2007, Vol. 27, pp. 389-414.
4. Campbell M.C., Ranciaro A., Froment A., Hirbo J., Omar S., Bodo J.M., Nyambo T., Lema G., Zinshteyn D., Drayna D., Breslin P.A., Tishkoff S.A. Evolution of functionally diverse alleles associated with PTC bitter taste sensitivity in Africa. *Mol. Biol. Evol.*, 2012, Vol. 29, no. 4, pp. 1141-1153.
5. Chandrashekar J., Mueller K.L., Hoon M.A., Adler E., Feng L., Guo W., Zuker C.S., Ryba N.J. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, 2000, Vol. 100, no. 6, pp. 703-711.
6. Douglas J.E., Lin C., Mansfield C.J., Arayata C.J., Cowart B.J., Spielman A.I., Adappa N.D., Palmer J.N., Cohen N.A., Reed D.R. Tissue-dependent expression of bitter receptor TAS2R38 mRNA. *Chem. Senses*, 2019, Vol. 44, no. 1, pp. 33-40.
7. Gopallawa I., Freund J.R., Lee R.J. Bitter taste receptors stimulate phagocytosis in human macrophages through calcium, nitric oxide, and cyclic-GMP signaling. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2021, Vol. 78, no. 1, pp. 271-286.
8. Kawasumi T., Takeno S., Ishikawa C., Takahara D., Taruya T., Takemoto K., Hamamoto T., Ishino T., Ueda T. The Functional Diversity of Nitric Oxide Synthase Isoforms in Human Nose and Paranasal Sinuses: Contrasting Pathophysiological Aspects in Nasal Allergy and Chronic Rhinosinusitis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 14, 7561. doi: 10.3390/jms.22147561.
9. Lee R.J., Xiong G., Kofonow J.M., Chen B., Lysenko A., Jiang P., Abraham V., Doghramji L., Adappa N.D., Palmer J.N., Kennedy D.W., Beauchamp G.K., Doulias P.T., Ischiropoulos H., Kreindler J.L., Reed D.R., Cohen N.A. T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 11, 4145-4159.
10. Maurer S., Wabnitz G.H., Kahle N.A., Stegmaier S., Prior B., Giese T., Gaida M.M., Samstag Y., Hänsch G.M. Tasting *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Human Neutrophils Express the Bitter Receptor T2R38 as Sensor for the Quorum Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 369. doi: 10.3389/fimmu.2015.00369.
11. Meng T., Nielsen D.E. An Investigation of TAS2R38 Haplotypes, dietary intake, and risk factors for chronic disease in the canadian longitudinal study on aging. *J. Nutr.*, 2023, Vol. 153, no. 11, 3270-3279. doi: 10.1016/j.tjnut.2023.09.010.
12. Meyerhof W., Batram C., Kuhn C., Brockhoff A., Chudoba E., Bufe B., Appendino G., Behrens M. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem. Senses*, 2010, Vol. 35, no. 2, pp. 157-170.
13. Orsmark-Pietras C., James A., Konradsen J.R., Nordlund B., Söderhäll C., Pulkkinen V., Pedroletti C., Daham K., Kupczyk M., Dahlén B., Kere J., Dahlén S.E., Hedlin G., Melén E. Transcriptome analysis reveals upregulation of bitter taste receptors in severe asthmatics. *Eur. Respir. J.*, 2013, Vol. 42, no. 1, pp. 65-78.
14. Takemoto K., Lomude L.S., Takeno S., Kawasumi T., Okamoto Y., Hamamoto T., Ishino T., Ando Y., Ishikawa C., Ueda T. Functional alteration and differential expression of the bitter taste receptor T2R38 in human paranasal sinus in patients with chronic rhinosinusitis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 5, 4499. doi: 10.3390/ijms24054499.
15. Tran H.T.T., Herz C., Ruf P., Stetter R., Lamy E. Human T2R38 bitter taste receptor expression in resting and activated lymphocytes. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2949. doi: 10.3389/fimmu.2018.02949.

Авторы:

Нёма М.А. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Муркина Р.Г. — студентка 6-го курса ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Минеев В.Н. — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Nyoma M.A., PhD (Medicine), Associate Professor, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Murkina R.G., 6th year Student, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Mineev V.N., PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 03.04.2024

Отправлена на доработку 05.04.2024

Принята к печати 09.04.2024

Received 03.04.2024

Revision received 05.04.2024

Accepted 09.04.2024

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *TLR2* Arg753Gln С УРОВНЕМ ЕГО ЭКСПРЕССИИ У ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ С СИНДРОМОМ СТАРЧЕСКОЙ АСТЕНИИ

Лукьянова С.О., Артемьева О.В., Насаева Е.Д., Ганковская Л.В.

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Среди паттернраспознающих рецепторов *TLR2* является исключительным из-за возможности гетеродимеризации с различными типами *TLR*, что позволяет ему распознавать широкий спектр молекулярных структур на поверхности патогенов. Полиморфизмы в генах, участвующих в сигнальном каскаде *TLRs*, могут быть фактором восприимчивости хозяина к развитию воспаления, влиять на исход ряда инфекционных заболеваний и иммунных повреждений. Вариант Arg753Gln (rs5743708) в гене *TLR2* — это наиболее охарактеризованная миссенс-мутация кодирующей области в домене TIR, которая включает замену аргинина на глутамин в позиции 753 аминокислотной последовательности белка. Эта функционально значимая замена ведет к измененной передаче сигналов и взаимосвязана с воспалительными реакциями. В работе проведено исследование ассоциации полиморфизма Arg753Gln (rs5743708) гена *TLR2* с уровнем его экспрессии у долгожителей. В исследование включено 82 долгожителя, среди которых синдром старческой астении выявлен у 41 обследуемого на основании краткой батареи тестов физического функционирования, при регистрации ≤ 7 баллов. Было показано, что носительство аллеля Gln статистически значимо ассоциировано с повышенным риском развития синдрома старческой астении, у пациентов с генотипом Arg/Gln в 12,8 раза выше шанс развития этого гериатрического синдрома. Установлено, что аллель Arg и генотип Arg/Arg являются протективными факторами развития синдрома старческой астении у долгожителей. При проведении анализа экспрессии гена *TLR2* у долгожителей было выявлено повышение его экспрессии в 2,79 раза относительно доноров. Оценка уровня экспрессии гена *TLR2* в группах долгожителей с наличием и отсутствием синдрома старческой астении показала повышение экспрессии гена *TLR2* в 1,4 раза у долгожителей с этим гериатрическим синдромом. У пациентов с генотипом Arg/Gln экспрессия гена *TLR2* была в 1,3 раза выше, чем в группе с генотипом Arg/Arg и в 1,6 раза выше, чем в группе с генотипом Gln/Gln. Повышение частоты встречаемости генотипа Arg/Gln полиморфизма Arg753Gln гена *TLR2* у долгожителей с синдромом старческой астении может быть обусловлено повышением

Адрес для переписки:

Лукьянова Светлана Олеговна
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ
117513, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1.
Тел.: 8 (915) 182-37-62.
E-mail: lukyanovasv@mail.ru

Address for correspondence:

Svetlana O. Lukyanova
N. Pirogov Russian National Research Medical University
1 Ostrovityanov St
Moscow
117513 Russian Federation
Phone: +7 (915) 182-37-62.
E-mail: lukyanovasv@mail.ru

Образец цитирования:

С.О. Лукьянова, О.В. Артемьева, Е.Д. Насаева,
Л.В. Ганковская «Ассоциация полиморфизма гена *TLR2*
Arg753Gln с уровнем его экспрессии у долгожителей
с синдромом старческой астении» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 711-716.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16697

© Лукьянова С.О. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.O. Lukyanova, O.V. Artemieva, E.D. Nasaeva,
L.V. Gankovskaya "Association of *TLR2* Arg753Gln gene
polymorphism with its expression level in nonagenarians
with frailty", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 711-716.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16697

© Lukyanova S.O. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-AOT-16697

экспрессии гена этого рецептора. Необходимы дальнейшие функциональные и молекулярно-генетические исследования, которые дополнят наше понимание механизмов регуляции и активации *TLR2* и его роли в развитии синдрома старческой астении.

Ключевые слова: воспалительное старение, долголетие, экспрессия генов, *TLR2*, полиморфизм, синдром старческой астении

ASSOCIATION OF *TLR2* Arg753Gln GENE POLYMORPHISM WITH ITS EXPRESSION LEVEL IN NONAGENARIANS WITH FRAILITY

Lukyanova S.O., Artemieva O.V., Nasaeva E.D., Gankovskaya L.V.

N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. *TLR2* is an exceptional pattern-recognizing receptor because of its ability to heterodimerise with different types of TLRs, which allows it to recognize a wide range of molecular structures on the surface of pathogens. Polymorphisms in genes involved in the TLRs signaling cascade may be a factor in host susceptibility to the development of inflammation, affecting the outcome of a number of infectious diseases and immune diseases. The variant Arg753Gln (rs5743708) in the *TLR2* gene is the most characterized missense mutation of the coding region in the TIR domain, which involves the substitution of arginine for glutamine at position 753 of the protein sequence. This functionally significant substitution leads to altered signaling and is associated with inflammatory responses. In this study, we investigated the association of the Arg753Gln (rs5743708) polymorphism of the *TLR2* gene with the level of its expression in nonagenarians. The study included 82 nonagenarians. Frailty was detected in 41 subjects using a short physical performance battery, with registration in the test ≤ 7 points. It was shown that carriage of the Gln allele is statistically significantly associated with an increased risk of developing frailty; patients with the Arg/Gln genotype have a 12.8-fold higher chance of developing this geriatric syndrome. The Arg allele and the Arg/Arg genotype were found to be protective factors in the development of frailty in nonagenarians. Analysis of *TLR2* gene expression in nonagenarians revealed a 2.79-fold increase in *TLR2* expression relative to donors. Evaluation of *TLR2* gene expression level in groups of nonagenarians with the presence and absence of frailty showed a 1.4-fold increase in *TLR2* gene expression in nonagenarians with this geriatric syndrome. In patients with the Arg/Gln genotype, *TLR2* gene expression was 1.3 times higher than in the group with the Arg/Arg genotype and 1.6 times higher than in the group with the Gln/Gln genotype. The increased frequency of occurrence of the Arg/Gln genotype of the Arg753Gln polymorphism of the *TLR2* gene in nonagenarians with frailty may be due to increased gene expression of this receptor. It is necessary to conduct further functional and molecular genetic studies.

Keywords: inflammaging, longevity, gene expression, *TLR2*, polymorphism, frailty

Введение

Известно, что дисрегуляция системы врожденного иммунитета при старении приводит к активации воспалительного ответа и развитию воспалительного старения (inflammaging) [5].

Toll-подобные рецепторы (TLR) являются одними из наиболее изученных рецепторов распознавания образов (PRR) врожденного иммунитета. *TLR2* образует гетеродимеры с *TLR1*, *TLR4*, *TLR6* и *TLR10*, что позволяет ему распознавать

широкий спектр патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) и эндогенных молекулярных паттернов, связанных с повреждением (DAMP) [4].

В гене *TLR2* идентифицировано 16 полиморфизмов. Вариант Arg753Gln (rs5743708) в гене *TLR2* — это наиболее охарактеризованная миссенс-мутация кодирующей области в домене TIR, которая включает замену аргинина на глутамин в позиции 753 аминокислотной последовательности белка. В ряде работ было показано, что

полиморфизм Arg753Gln функционально значим и связан с измененной передачей сигналов, ухудшением активации NF-κB [8, 9, 11]. Для однонуклеотидного полиморфизма (SNP) Arg753Gln в гене *TLR2* человека были показаны ассоциации с повышенным риском развития туберкулеза, септического шока в ходе грамположительной бактериальной инфекции, возрастной макулярной дистрофии, тяжелого течения COVID-19 с развитием пневмонии [3, 6, 7, 9, 10].

Воспалительное старение ассоциировано с развитием возраст-ассоциированных заболеваний и гериатрических синдромов. Ключевым гериатрическим синдромом с высоким риском развития неблагоприятных исходов для здоровья является синдром старческой астении (ССА) [1]. Ранее нами было показано, что повышение экспрессии гена *TLR2* ассоциировано с развитием ССА у долгожителей и может являться одним из факторов патологического старения [2].

Целью настоящего исследования явилась оценка ассоциации полиморфизма Arg753Gln (rs5743708) гена *TLR2* с уровнем его экспрессии у долгожителей с ССА.

Материалы и методы

В исследование было включено 82 долгожителя (22 мужчин, 60 женщин, средний возраст $91,4 \pm 2,18$), находившихся на обследовании в Российском геронтологическом научно-клиническом центре РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (директор — член-корреспондент РАН, д.м.н. Ткачева О.Н.). Оценка ССА была проведена на основании краткой батареи тестов физического функционирования (Short Physical Performance Battery, SPPB), критерием наличия ССА являлась регистрация ≤ 7 баллов. ССА был выявлен у 41 исследуемого долгожителя. Группу сравнения для оценки экспрессии гена *TLR2* составили здоровые доноры ($n = 24$; средний возраст $22,5$; 16 женщин; 8 мужчин).

Биологическим материалом для исследования служила периферическая кровь (ПК). В ходе работы определяли уровень экспрессии гена *TLR2* в лейкоцитах ПК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) согласно отработанному нами ранее протоколу [2], анализ однонуклеотидного полиморфизма гена *TLR2* Arg753Gln методом ПЦР проводился стандартным набором SNP-экспресс (НПФ «Литех», Россия).

Статистическая обработка результатов выполнялась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2016, GraphPad Prism 8 и IBM SPSS Statistics 26. Для оценки различий

между исследуемыми группами использовался критерий Манна—Уитни, различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$. При сравнении частот аллелей и генотипов по качественному бинарному признаку пользовались критерием χ^2 . Степень риска развития событий оценивали по величине отношения шансов (odds ratio (OR)) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI).

Работа была одобрена локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол заседания № 213 от 13.12.2021) и проводилась в соответствии с правилами надлежащей клинической практики. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-15-00137, <http://rscf.ru/project/23-15-00137/>.

Результаты и обсуждение

Среди всех известных паттернраспознающих рецепторов TLR2 является исключительным из-за возможности гетеродимеризации с различными типами TLR, что расширяет спектр лигандов, а также возможности для про- и противовоспалительного действия [4]. В исследовании на трансфектных 293Т-клетках было показано, что полиморфизм Arg753Gln снижает способность TLR2 реагировать на бактериальные пептиды *in vitro* [8].

В настоящем исследовании впервые был проведен анализ распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера гена *TLR2* Arg753Gln у долгожителей. Было показано, что среди 82 долгожителей генотип Arg/Gln имеют 52,44% ($n = 43$), Arg/Arg 39,02% ($n = 32$), Gln/Gln 8,54% ($n = 7$) ($\chi^2 = 2,0021$, $p = 0,1571$). Наблюдаемое распределение частот аллелей и генотипов гена *TLR2* среди обследованных соответствовало ожидаемому распределению Харди—Вайнберга ($\chi^2 = 2,00$, $p = 0,157$).

Затем была проведена оценка распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера гена *TLR2* Arg753Gln у долгожителей в зависимости от наличия ССА. У долгожителей с наличием ССА частота встречаемости аллеля Gln составила 42,68%, в группе с отсутствием этого гериатрического синдрома — 26,83%. Частота генотипа Arg/Gln в группе с ССА составила 80,49%, в группе долгожителей с отсутствием ССА — 24,39% (табл. 1).

Носительство аллеля Gln статистически значимо ассоциировано с повышенным риском развития ССА (OR = 2,031, 95% CI 1,054–3,913, $\chi^2 = 4,544$, $p = 0,033$). Показано, что у пациентов с генотипом Arg/Gln в 12,8 раза выше шанс развития ССА (OR = 12,78, 95% CI 4,470–36,580,

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА Arg753Gln В ГЕНЕ *TLR2* В ИССЛЕДУЕМЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ГРУППАХ

TABLE 1. FREQUENCY OF ALLELES AND GENOTYPES OF POLYMORPHIC MARKER Arg753Gln IN *TLR2* GENE IN THE STUDIED CLINICAL GROUPS

	Отсутствие ССА No frailty (n = 41)		Наличие ССА With frailty (n = 41)		OR	95% CI	χ^2	p
	n	%	n	%				
Аллель Arg Allele Arg	60	73,17	47	57,32	0,49	0,256-0,949	4,544	0,033
Аллель Gln Allele Gln	22	26,83	35	42,68	2,031	1,054-3,913	4,544	0,033
Arg/Arg	25	60,98	7	17,07	0,132	0,047-0,368	16,605	< 0,001
Arg/Gln	10	24,39	33	80,49	12,788	4,470-36,580	25,866	< 0,001
Gln/Gln	6	14,63	1	2,44	0,1446	0,017-1,271	3,905	0,048

$\chi^2 = 25,866$, $p = 0,000$). Аллель Arg и генотип Arg/Arg являются протективными факторами развития ССА (табл. 1).

При проведении анализа экспрессии гена *TLR2* у долгожителей было выявлено повышение его экспрессии в 2,79 раза относительно доноров ($p < 0,0001$) (рис. 1А). Оценка уровня экспрессии гена *TLR2* в группах долгожителей с наличием и отсутствием ССА показала повышение экспрессии гена *TLR2* в 1,4 раза у долгожителей с этим гериатрическим синдромом ($p < 0,005$) (рис. 1Б).

На рисунке 1В представлен уровень экспрессии гена *TLR2* в зависимости от генотипа полиморфного маркера гена *TLR2* Arg753Gln. У пациентов с генотипом Arg/Gln экспрессия гена *TLR2* в 1,3 раза выше чем в группе с генотипом Arg/Arg ($p < 0,005$) и в 1,6 раза выше чем в группе с генотипом Gln/Gln ($p < 0,005$) (рис. 1В).

Полиморфизмы в генах, участвующих в сигнальном каскаде TLRs, могут быть фактором восприимчивости хозяина к развитию воспаления, влиять на исход ряда инфекционных заболеваний и иммунных повреждений. Эта регуляция может

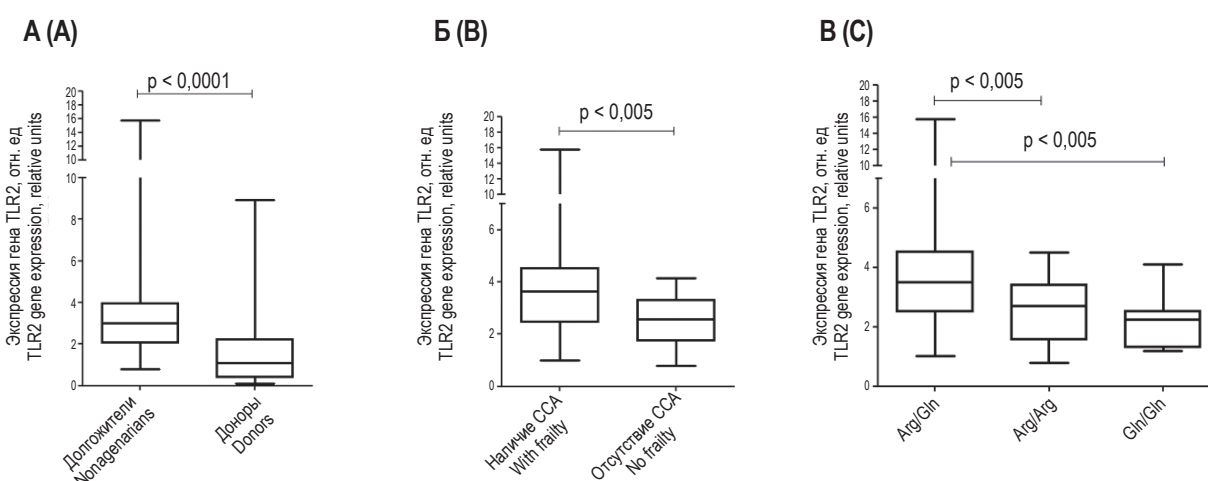


Рисунок 1. Экспрессия гена *TLR2* в лейкоцитах периферической крови долгожителей и здоровых доноров (А), долгожителей с наличием и отсутствием ССА (Б), долгожителей с различными генотипами полиморфного маркера гена *TLR2* Arg753Gln (В)

Figure 1. *TLR2* gene expression in peripheral blood leukocytes of nonagenarians and healthy donors (A), nonagenarians with frailty and absence of frailty (B), nonagenarians with different genotypes of polymorphic marker of *TLR2* gene Arg753Gln (C)

включать клеточные сигнальные события, ответственные за выработку цитокинов и хемокинов и их взаимодействие с адаптивным иммунным ответом, обеспечивая тесную связь между иммуно-старением и воспалением, продолжительностью жизни и успешностью старения.

Заключение

Исследования по молекулярному моделированию показали, что наличие замены в полиморфизме Arg753Gln приводит к изменениям во внутриклеточном домене TIR. Это нарушает гетеродимеризацию с TLR6, рекрутирование адаптерных белков Mal и MyD88, фосфорилирование p38, активацию NF-κB, что коррелирует со снижением воспалительной реакции [11]. Вероятно, этот механизм косвенно может быть связан с из-

менением экспрессии гена TLR2. У долгожителей с генотипом Arg/Arg, который по результатам нашего исследования является протективным в отношении риска развития ССА, был выявлен средний уровень экспрессии TLR2, который, вероятно, является наиболее благоприятным.

В группе долгожителей была выявлена ассоциация гетерозиготного генотипа Arg/Gln полиморфного варианта Arg753Gln гена TLR2 с развитием ССА. Носительство данного генотипа увеличивает шанс развития ССА в 12,8 раза (табл. 1), что позволяет рассматривать его в качестве неблагоприятного маркера данного гериатрического синдрома. Повышение частоты встречаемости генотипа Arg/Gln полиморфизма Arg753Gln гена TLR2 у долгожителей с ССА может быть обусловлено повышением экспрессии гена этого рецептора.

Список литературы / References

1. Артемьева О.В., Греченко В.В., Громова Т.В., Ганковская Л.В. Синдром старческой астении: неоднозначная роль воспалительного старения // Иммунология. 2022. Т. 43, № 6. С. 746-756. [Artemyeva O.V., Grechenko V.V., Gromova T.V., Gankovskaya L.V. Frailty: a controversial role of inflammaging. *Immunologiya = Immunology*, 2022, Vol. 43, no. 6, pp. 746-756. (In Russ.)]
2. Лукьянова С.О., Артемьева О.В., Стражеско И.Д., Ганковская Л.В. Экспрессия генов TLR2, IL-1β, IL-10 как возможный фактор успешного или патологического старения у долгожителей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2023. Т. 176, № 10. С. 510-513. [Lukyanova S.O., Artemyeva O.V., Strazhesko I.D., Nasaeva E.D., Grechenko V.V., Gankovskaya L.V. Expression of TLR2, IL-1β, IL-10 genes as a possible factor of successful or pathological aging in nonagenarians. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2023, Vol. 176, no. 10, pp. 510-513. (In Russ.)]
3. Bakaros E., Voulgaridi I., Paliatsa V., Gatselis N., Germanidis G., Asvestopoulou E., Alexiou S., Botsfari E., Lygoura V., Tsachouridou O., Mimitsoudis I., Tseroni M., Sarrou S., Mouchtouri V.A., Dadouli K., Kalala F., Metallidis S., Dalekos G., Hadjichristodoulou C., Speletas M. Innate immune gene polymorphisms and COVID-19 prognosis. *Viruses*, 2023, Vol. 15, no. 9, 1784. doi: 10.3390/v15091784.
4. Colleselli K., Stierschneider A., Wiesner C. An update on Toll-like receptor 2, its function and dimerization in pro- and anti-inflammatory processes. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 15, 12464. doi: 10.3390/ijms241512464.
5. Franceschi C., Bonafè M., Valensin S., Olivieri F., de Luca M., Ottaviani E., de Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, Vol. 908, pp. 244-254.
6. Gao J.W., Zhang A.Q., Wang X., Li Z.Y., Yang J.H., Zeng L., Gu W., Jiang J.X. Association between the TLR2 Arg753Gln polymorphism and the risk of sepsis: a meta-analysis. *Crit. Care*, 2015, Vol. 19, 416. doi: 10.1186/s13054-015-1130-3.
7. Güven M., Batar B., Mutlu T., Bostancı M., Mete M., Aras C., Ünal M. Toll-like receptors 2 and 4 polymorphisms in age-related macular degeneration. *Curr. Eye Res.*, 2016, Vol. 41, no. 6, pp. 856-861.
8. Lorenz E., Mira J.P., Cornish K.L., Arbour N.C., Schwartz D.A. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect. Immun.*, 2000, Vol. 68, no. 11, 6398-6401.
9. Merx S., Neumaier M., Wagner H., Kirschning C.J., Ahmad-Nejad P. Characterization and investigation of single nucleotide polymorphisms and a novel TLR2 mutation in the human TLR2 gene. *Hum. Mol. Genet.*, 2007, Vol. 16, no. 10, pp. 1225-1232.

10. Ogus A.C., Yoldas B., Ozdemir T., Uguz A., Olcen S., Keser I., Coskun M., Cilli A., Yegin O. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur. Respir. J.*, 2004, Vol. 23, no. 2, pp. 219-223.
11. Xiong Y., Song C., Snyder G.A., Sundberg E.J., Medvedev A.E. R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88. *J. Biol. Chem.*, 2012, Vol. 287, no. 45, pp. 38327-38337.

Авторы:

Лукьянова С.О. — ассистент кафедры иммунологии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Артемяева О.В. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Насаева Е.Д. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор кафедры иммунологии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Lukyanova S.O., Assistant Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Artemieva O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Nasaeva E.D., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Gankovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 28.03.2024
Отправлена на доработку 30.03.2024
Принята к печати 02.04.2024

Received 28.03.2024
Revision received 30.03.2024
Accepted 02.04.2024

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ТИПИРОВАНИЯ HLA-ГЕНОВ МЕТОДОМ NGS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ПЛАТФОРМ

Павлова И.Е.¹, Кузьмич Е.В.¹, Хамаганова Е.Г.², Рудик Д.В.³,
Кузьмина Е.П.², Абдрахимова А.Р.²

¹ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS), позволяющее проводить массовое HLA-типирование на уровне от высокого до аллельного разрешения, быстро завоевало позицию наиболее распространенного и максимально информативного метода определения генов главного комплекса гистосовместимости (HLA-генов). Метод характеризуется сочетанием экономической и технологической эффективности. HLA-типирование методом NGS выполняется с помощью специальных платформ (генетических секвенаторов). Наиболее распространенной платформой является MiSeq (Illumina, США). В настоящее время техническое обслуживание этого прибора затруднено, что вызвало необходимость поиска аналогов, не уступающих по производительности и качеству HLA-типирования. Целью нашего исследования являлся сравнительный анализ результатов HLA-типирования методом NGS с использованием платформ MiSeq (Illumina, США) и Fa斯塔Seq 300 (GeneMind, Китай). В исследование включены образцы ДНК, выделенные из ядросодержащих клеток периферической крови доноров, вступивших в Федеральный регистр доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК): 12 образцов получены и проанализированы в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России и 24 образца — в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. HLA-типирование всех образцов выполнено дважды: с использованием секвенатора MiSeq и секвенатора Fa斯塔Seq 300. Результаты HLA-типирования 12 образцов из ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, полученные на двух платформах, совпали. Аллель гена *DRB1* одного из образцов представлен в виде группы Р при применении MiSeq, но группы G в случае Fa斯塔Seq 300. Результаты HLA-типирования 24 образцов из

Адрес для переписки:

Павлова Ирина Евгеньевна
ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»
191024, Россия, Санкт-Петербург,
ул. 2-ая Советская, 16.
Тел.: 8 (921) 983-66-64.
E-mail: pavlova@niigt.ru

Address for correspondence:

Irina E. Pavlova
Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology,
Federal Medical and Biological Agency
16 2nd Sovetskaya St
St. Petersburg
191024 Russian Federation
Phone: +7 (921) 983-66-64.
E-mail: pavlova@niigt.ru

Образец цитирования:

И.Е. Павлова, Е.В. Кузьмич, Е.Г. Хамаганова, Д.В. Рудик, Е.П. Кузьмина, А.Р. Абдрахимова «Сравнительный анализ результатов типирования HLA-генов методом NGS с использованием различных платформ» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 717-726.
doi: 10.15789/1563-0625-CAO-16916

© Павлова И.Е. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.E. Pavlova, E.V. Kuzmich, E.G. Khamaganova, D.V. Rudik, E.P. Kuzminova, A.R. Abdrakhimova "Comparative analyses of the results of HLA genes typing by NGS method using different platforms", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 717-726.
doi: 10.15789/1563-0625-CAO-16916

© Pavlova I.E. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CAO-16916

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, полученные на двух платформах, также совпали. Однако для 10 образцов наблюдались различия в уровне разрешения HLA-типирования. Более высокий уровень разрешения при применении MiSeq получен для генов: *B* – 2 случая; *C*, *DRB3*, *DRB4* – по 3 случая. При использовании FastaSeq 300 более высокий уровень разрешения имел место несколько чаще и установлен для генов: *DRB1* – 4, *DQB1* – 7, *DPA1* – 10 случаев. Различия в уровне разрешения HLA-типирования некоторых образцов не являются критическими, так как в настоящее время для подбора пары донор-реципиент ГСК используются результаты высокоразрешающего типирования. Полученные данные свидетельствуют о возможности эффективного использования секвенатора FastaSeq 300 для HLA-типирования. Целесообразно провести аналогичный анализ на основе обследования пациентов с различными нозологическими формами заболеваний, лечение которых требует проведения аллогенной трансплантации ГСК.

Ключевые слова: аллели, генетический анализатор, гены, секвенирование нового поколения, HLA, HLA-типирование

COMPARATIVE ANALYSES OF THE RESULTS OF HLA GENES TYPING BY NGS METHOD USING DIFFERENT PLATFORMS

Pavlova I.E.^a, Kuzmich E.V.^a, Khamaganova E.G.^b, Rudik D.V.^c,
Kuzminova E.P.^b, Abdrakhimova A.R.^b

^a Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

^b National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

^c I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Next generation sequencing (NGS) allows high-resolution and allelic HLA-typing. The most common platform is MiSeq (Illumina, USA). Currently, the maintenance of this device is difficult, which has necessitated the search for analogues that are not inferior in capacity and quality of HLA-typing. The purpose of our study was a comparative analysis of the results of HLA-typing by NGS using the MiSeq (Illumina, USA) and FastaSeq 300 (Gene-Mind, China) platforms. The study included DNA samples of hematopoietic stem cell (HSC) donors: 12 samples were obtained and analyzed at the FSBI RosNIIGT FMBA of Russia and 24 samples at the National Medical Research Center for Hematology of the Ministry of Health of the Russian Federation. HLA typing of all samples was performed twice: using a MiSeq sequencer and a FastaSeq 300 sequencer. The results of HLA-typing of 12 samples from the FSBI RosNIIGT FMBA of Russia, obtained on two platforms, coincided. *DRB1* allele of one sample was achieved as group P with MiSeq, but as group G with FastaSeq 300. The results of HLA-typing of 24 samples from the National Medical Research Center for Hematology of the Ministry of Health of the Russian Federation, obtained on two platforms, coincided. However, differences in the level of resolution of HLA-typing were observed for 10 samples. A higher level of resolution with using MiSeq was observed for genes: *B* – 2 cases; *C*, *DRB3*, *DRB4* – 3 cases each. When using FastaSeq 300, a higher level of resolution was achieved a little more often and was established for the genes: *DRB1* – 4, *DQB1* – 7, *DPA1* – 10 cases. Differences in the level of resolution of HLA-typing for some samples are not critical, since high-resolution typing results are currently used to select HSC donor-recipient pairs. Our study indicated the possibility of effectively using the FastaSeq 300 for HLA-typing.

Keywords: alleles, genetic analyzer, genes, next generation sequencing, HLA, HLA-typing

Введение

Секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS), позволяющее проводить массовое HLA-типирование на уровне от высокого до аллельного разрешения, быстро за-

воевало позицию наиболее распространенного и максимально информативного метода определения генов главного комплекса гистосовместимости [2, 3]. Метод характеризуется сочетанием экономической и технологической эффективности.

Под HLA-типированием высокого уровня разрешения понимают определение принадлежности к подгруппе HLA-аллелей, кодирующих идентичную аминокислотную последовательность в пределах антигенсвязывающего сайта. Для получения результата высокого уровня разрешения необходимо выполнить секвенирование (определение нуклеотидной последовательности) 2-го и 3-го экзонов для HLA-генов класса I, 2-го экзона для HLA-генов класса II, исключить неоднозначности в пределах перечисленных экзонов и нулевые аллели. Под HLA-типированием аллельного уровня понимают определение конкретного HLA-аллеля, имеющего уникальное наименование, присвоенное Номенклатурным комитетом по факторам HLA-системы ВОЗ. Результаты HLA-типирования также могут быть представлены в виде групп G или P. Группа G объединяет аллели, имеющие идентичную нуклеотидную последовательность в экзонах, кодирующих пептидсвязывающие домены (экзоны 2 и 3 для HLA-аллелей класса I; экзон 2 для HLA-аллелей класса II), и в ряде случаев может включать нулевые аллели. Группа P объединяет аллели, имеющие одинаковую протеиновую последовательность пептидсвязывающих доменов, которая кодируется экзонами 2 и 3 HLA-аллелей класса I и экзонами 2 HLA-аллелей класса II. Представление результатов HLA-типирования в виде групп G и P наиболее часто используется в базах данных регистров доноров костного мозга [5].

Подбор доноров и реципиентов гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) на основании результатов HLA-типирования высокого уровня разрешения является обязательным условием проведения аллогенной неродственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [1].

Использование метода NGS приобрело особую значимость в связи с необходимостью развития Федерального регистра доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток. Согласно Постановлению Правительства Российской Федерации № 640 от 12.04.2022 «Об утверждении Правил ведения Федерального регистра доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, донорского костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, реципиентов костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток» HLA-типирование доноров и реципиентов ГСК должно выполняться именно методом секвенирования, а NGS позволяет справиться с этой задачей наиболее эффективно. Кроме того, этот метод позволяет открывать новые HLA-

аллели с максимально полной их характеристикой [4].

HLA-типирование методом NGS выполняется с помощью специальных платформ (генетических секвенаторов). Наиболее распространенной платформой является MiSeq (Illumina, США). В настоящее время техническое обслуживание этого прибора затруднено, что вызвало необходимость поиска аналогов, не уступающих по производительности и качеству HLA-типирования. **Целью нашей работы** являлся анализ результатов HLA-типирования с использованием двух NGS платформ.

Материалы и методы

В исследование включены образцы ДНК, выделенные из ядросодержащих клеток периферической крови доноров, вступивших в Федеральный регистр доноров ГСК: 12 образцов получены и проанализированы в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России и 24 образца – в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. HLA-типирование всех образцов выполнено дважды: с использованием секвенатора MiSeq (Illumina, США) и секвенатора Fa斯塔Seq 300 (GeneMind, Китай). Характеристика платформ представлена в таблице 1. Для всех исследований применяли реагенты NGSgo (GenDx, Нидерланды) в соответствии с инструкцией производителя. В ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России HLA-типирование выполнено по шести HLA-генам – *A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1*, в ФГБУ «НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ» Минздрава России – по одиннадцати HLA-генам – *A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1*. Для анализа результатов использовали программу NGSengine, уровень разрешения устанавливали оптимизированный – от аллельного до более низкого (без неоднозначностей).

Результаты и обсуждение

Результаты HLA-типирования 12 образцов из ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, полученные на двух платформах, совпали. Для образца ID1 аллель гена *DRB1* определен в виде группы P при применении MiSeq, но группы G в случае Fa斯塔Seq 300 (табл. 2).

Результаты HLA-типирования 24 образцов из ФГБУ «НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ» Минздрава России, полученные на двух платформах, также совпали. Однако для 10 образцов, представленных в таблице 3, наблюдались различия в уровне разрешения. Более высокий уровень разрешения при применении MiSeq получен для генов: *B* – 2 случая; *C, DRB3, DRB4* – по 3 случая. При ис-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАТФОРМ MiSeq и FastaSeq 300

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF MiSeq and FastaSeq 300 PLATFORMS

Характеристика Characteristic	MiSeq	FastaSeq 300
Принцип Principle	Мостиковая ПЦР Bridge PCR	Мостиковая ПЦР Bridge PCR
Количество проточных ячеек Number of flow cells	1	1
Загрузка HLA образцов (тип ячейки) Loading HLA samples (cell type)	10 (Нано), 40 (Микро), 150 (Стандарт) 10 (Nano), 40 (Micro) 150 (Standard)	576 (FCM*), 1440 (FCH**)
Количество независимых дорожек на ячейке Number of independent tracks per cell	1	4
Длина прочтений Read length	PE***25, PE75, PE150, PE250, PE300	SE****50, SE75, PE75, PE150
Количество прочтений на одну ячейку (млн) для разных типов ячеек Number of reads (millions) per 1 cell for different cell types	1/4/12/22	100/250
Продолжительность анализа (час) Analysis duration (hour)	17-39	19,5-24
Качество секвенирования Sequencing quality	PE150: Q30***** > 80%	PE150 Q30 > 85%

Примечание. * – проточная ячейка средняя (FCM); ** – проточная ячейка высокая (FCH); *** – парное прочтение (PE); **** – одноконцевое прочтение (SE); ***** – процент нуклеотидов, для которых вероятность быть ошибочно определенными меньше 0,001 (Q30).

Note. *, flow cell medium (FCM); **, flow cell high (FCH); ***, paired-end (PE); ****, single-end (SE); *****, percentage of nucleotides for which the probability of being incorrectly identified is less than 0.001 (Q30).

пользовании FastaSeq 300 более высокий уровень разрешения имел место несколько чаще и установлен для генов: *DRB1* – 4, *DQB1* – 7, *DPA1* – 10 случаев.

Таким образом, результаты определения HLA-генов, полученные с использованием платформ MiSeq и FastaSeq 300, идентичны для всех 36 образцов. Различия в уровне разрешения HLA-типирования некоторых образцов не являются критическими, так как в настоящее время для подбора пары донор-реципиент ГСК исполь-

зуются результаты высокоразрешающего типирования.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о возможности эффективного использования секвенатора FastaSeq 300 для HLA-типирования. Целесообразно провести аналогичный анализ на основе обследования пациентов с различными нозологическими формами заболеваний, лечение которых требует проведения аллогенной ТГСК.

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ HLA-ТИПИРОВАНИЯ 12 ОБРАЗЦОВ ИЗ ФГБУ РОСНИИГТ ФМБА РОССИИ

TABLE 2. RESULTS OF HLA-TYPING FOR 12 SAMPLES FROM FSBI ROSNIIGT FMBA OF RUSSIA

ID	MiSeq (Illumina, США) MiSeq (Illumina, USA)		FastaSeq 300 (GeneMind, Китай) FastaSeq 300 (GeneMind, China)	
	Аллель 1 Allele 1	Аллель 2 Allele 2	Аллель 1 Allele 1	Аллель 2 Allele 2
1	A*02:01:01	A*02:05:01:01	A*02:01:01	A*02:05:01:01
	B*15:01:01	B*50:01:01:01	B*15:01:01	B*50:01:01:01
	C*03:03:01	C*06:02:01:02	C*03:03:01	C*06:02:01:02
	DRB1*11:04:01	DRB1*15:01P	DRB1*11:04:01	DRB1*15:01:01G
	DQB1*03:01:01G	DQB1*06:02:01G	DQB1*03:01:01G	DQB1*06:02:01G
	DPB1*04:02:01G	–	DPB1*04:02:01G	–
2	A*01:01:01	A*02:01:01	A*01:01:01	A*02:01:01
	B*41:02:01:01	B*51:01:01	B*41:02:01:01	B*51:01:01
	C*14:02:01	C*17:03:01:01	C*14:02:01	C*17:03:01:01
	DRB1*11:04:01	DRB1*13:03	DRB1*11:04:01	DRB1*13:03
	DQB1*03:01:01G	–	DQB1*03:01:01G	–
	DPB1*04:01:01G	DPB1*04:02:01G	DPB1*04:01:01G	DPB1*04:02:01G
3	A*02:12	A*02:30:01	A*02:12	A*02:30:01
	B*38:01:01	B*52:01:01	B*38:01:01	B*52:01:01
	C*12:02:02:01	C*12:03:01:01	C*12:02:02:01	C*12:03:01:01
	DRB1*13:01:01G	DRB1*15:02:01	DRB1*13:01:01G	DRB1*15:02:01
	DQB1*06:01:01G	DQB1*06:03:01G	DQB1*06:01:01G	DQB1*06:03:01G
	DPB1*03:01:01	DPB1*04:01:01G	DPB1*03:01:01	DPB1*04:01:01G
4	A*02:01:01	A*03:01:01	A*02:01:01	A*03:01:01
	B*40:01:02	B*44:03:01	B*40:01:02	B*44:03:01
	C*03:04:01	C*04:01:01	C*03:04:01	C*04:01:01
	DRB1*03:01:01G	DRB1*15:01:01G	DRB1*03:01:01G	DRB1*15:01:01G
	DQB1*02:01:01G	DQB1*06:02:01G	DQB1*02:01:01G	DQB1*06:02:01G
	DPB1*03:01:01	DPB1*04:01:01G	DPB1*03:01:01	DPB1*04:01:01G
5	A*24:02:01	A*68:01:02:02	A*24:02:01	A*68:01:02:02
	B*18:01:01	B*44:02:01	B*18:01:01	B*44:02:01
	C*07:01:01	C*07:04:01	C*07:01:01	C*07:04:01
	DRB1*11:01:01G	DRB1*11:04:01	DRB1*11:01:01G	DRB1*11:04:01
	DQB1*03:01:01G	–	DQB1*03:01:01G	–
	DPB1*04:02:01G	DPB1*02:01:01G	DPB1*04:02:01G	DPB1*02:01:01G
6	A*03:01:01	–	A*03:01:01	–
	B*35:01:01	B*51:01:01	B*35:01:01	B*51:01:01
	C*04:01:01	C*15:04:01:01	C*04:01:01	C*15:04:01:01
	DRB1*01:01:01G	DRB1*11:01:01G	DRB1*01:01:01G	DRB1*11:01:01G
	DQB1*03:01:01G	DQB1*05:01:01G	DQB1*03:01:01G	DQB1*05:01:01G
	DPB1*04:02:01G	DPB1*15:01:01G	DPB1*04:02:01G	DPB1*15:01:01G

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

ID	MiSeq (Illumina, США) MiSeq (Illumina, USA)		FastaSeq 300 (GeneMind, Китай) FastaSeq 300 (GeneMind, China)	
	Аллель 1 Allele 1	Аллель 2 Allele 2	Аллель 1 Allele 1	Аллель 2 Allele 2
7	A*01:01:01	A*02:01:01	A*01:01:01	A*02:01:01
	B*13:02:01	B*57:01:01:01	B*13:02:01	B*57:01:01:01
	C*06:02:01	—	C*06:02:01	—
	DRB1*07:01:01G	—	DRB1*07:01:01G	—
	DQB1*02:01:01G	DQB1*03:03:02	DQB1*02:01:01G	DQB1*03:03:02
	DPB1*04:01:01G	DPB1*06:01:01	DPB1*04:01:01G	DPB1*06:01:01
8	A*25:01:01:01	—	A*25:01:01:01	—
	C*12:03:01	C*12:301	C*12:03:01	C*12:301
	DRB1*04:01:01G	DRB1*15:01:01G	DRB1*04:01:01G	DRB1*15:01:01G
	DQB1*03:01:01G	DQB1*06:02:01G	DQB1*03:01:01G	DQB1*06:02:01G
	DPB1*04:01:01G	DPB1*23:01:01	DPB1*04:01:01G	DPB1*23:01:01
9	A*01:01:01	—	A*01:01:01	—
	B*08:01:01	B*37:01:01:01	B*08:01:01	B*37:01:01:01
	C*06:02:01	C*07:01:01	C*06:02:01	C*07:01:01
	DRB1*01:01:01G	DRB1*16:02:01G	DRB1*01:01:01G	DRB1*16:02:01G
	DQB1*05:01:01G	DQB1*05:02	DQB1*05:01:01G	DQB1*05:02
	DPB1*03:01:01	DPB1*14:01:01	DPB1*03:01:01	DPB1*14:01:01
10	A*03:01:01	A*11:01:01	A*03:01:01	A*11:01:01
	B*07:02:01	B*35:03:01	B*07:02:01	B*35:03:01
	C*04:01:01	C*07:02:01	C*04:01:01	C*07:02:01
	DRB1*08:01:01G	DRB1*13:03	DRB1*08:01:01G	DRB1*13:03
	DQB1*03:01:01G	DQB1*04:02:01G	DQB1*03:01:01G	DQB1*04:02:01G
	DPB1*04:01:01G	—	DPB1*04:01:01G	—
11	A*02:01:01	—	A*02:01:01	—
	B*15:01:01:04	B*41:02:01:01	B*15:01:01:04	B*41:02:01:01
	C*04:01:01	C*17:03:01:01	C*04:01:01	C*17:03:01:01
	DRB1*01:01:01G	DRB1*13:03	DRB1*01:01:01G	DRB1*13:03
	DQB1*03:01:01G	DQB1*05:01:01G	DQB1*03:01:01G	DQB1*05:01:01G
	DPB1*04:01:01G	—	DPB1*04:01:01G	—
12	A*02:01:01	A*33:03:01	A*02:01:01	A*33:03:01
	B*44:03:01	B*58:01:01	B*44:03:01	B*58:01:01
	C*03:02:02	C*16:01:01:01	C*03:02:02	C*16:01:01:01
	DRB1*13:02:01	DRB1*15:01:01G	DRB1*13:02:01	DRB1*15:01:01G
	DQB1*06:02:01G	DQB1*06:09:01G	DQB1*06:02:01G	DQB1*06:09:01G
	DPB1*03:01:01	DPB1*04:01:01G	DPB1*03:01:01	DPB1*04:01:01G

Примечание. «—» — получен гомозиготный результат.

Note. —, homozygous result was obtained.

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ HLA-ТИПИРОВАНИЯ 24 ОБРАЗЦОВ ИЗ ФГБУ «НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ» МИНЗДРАВА РОССИИ

TABLE 3. RESULTS OF HLA-TYPING FOR 24 SAMPLES FROM NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTER FOR HEMATOLOGY OF THE MINISTRY OF HEALTH OF THE RUSSIAN FEDERATION

ID	MiSeq (Illumina, США) MiSeq (Illumina, USA)		FastaSeq 300 (GeneMind, Китай) FastaSeq 300 (GeneMind, China)	
	Аллель 1 Allele 1	Аллель 2 Allele 2	Аллель 1 Allele 1	Аллель 2 Allele 2
3	A*02:01:01	A*02:01:01	A*02:01:01	A*02:01:01
	B*15:01:01	B*44:02:01	B*15:01:01G	B*44:02:01G
	C*03:03:01	C*05:01:01	C*03:03:01	C*05:01:01G
	DRB1*08:01:01G	DRB1*12:01:01G	DRB1*08:01:01	DRB1*12:01:01G
	DRB3*02:02:01:01	—	DRB3*02:02:01G	—
	DQB1*03:01:01G	DQB1*04:02:01G	DQB1*03:01:01:01	DQB1*04:02:01:04
	DQA1*04:01:01	DQA1*05:05:01	DQA1*04:01:01	DQA1*05:05:01
	DPB1*04:02:01G	DPB1*23:01:01G	DPB1*04:02:01G	DPB1*23:01:01G
	DPA1*01:03:01G	DPA1*01:03:01G	DPA1*01:03:01:04	DPA1*01:03:01
4	A*29:02:01:01	A*32:01:01	A*29:02:01:01	A*32:01:01
	B*08:01:01	B*44:03:01	B*08:01:01	B*44:03:01
	C*07:01:01	C*16:01:01:01	C*07:01:01	C*16:01:01:01
	DRB1*03:01:01G	DRB1*07:01:01G	DRB1*03:01:01G	DRB1*07:01:01G
	DRB3*01:01:02:01	—	DRB3*01:01:02:01	—
	DRB4*01:01:01:01	—	DRB4*01:01:01:01	—
	DQB1*02:01:01G	DQB1*02:01:01G	DQB1*02:01:01:01	DQB1*02:01:01G
	DQA1*02:01:01	DQA1*05:01:01	DQA1*02:01:01	DQA1*05:01:01
	DPB1*01:01:01	DPB1*04:01:01G	DPB1*01:01:01	DPB1*04:01:01G
	DPA1*01:03:01G	DPA1*02:01:02G	DPA1*01:03:01:01	DPA1*02:01:02:02
5	A*02:01:01	A*02:01:01	A*02:01:01	A*02:01:01
	B*27:02:01:04	B*39:06:02:03	B*27:02:01:04	B*39:06:02:03
	C*02:02:02G	C*12:03:01G	C*02:02:02G	C*12:03:01G
	DRB1*13:01:01G	DRB1*16:01:01	DRB1*13:01:01	DRB1*16:01:01
	DRB3*02:02:01:02	—	DRB3*02:02:01	—
	DRB5*02:02:01	—	DRB5*02:02:01	—
	DQB1*05:02	DQB1*06:03:01G	DQB1*05:02:01:01	DQB1*06:03:01:01
	DQA1*01:02:02:01	DQA1*01:03:01	DQA1*01:02:02:01	DQA1*01:03:01
	DPB1*02:01:02G	DPB1*04:01:01G	DPB1*02:01:02G	DPB1*04:01:01G
	DPA1*01:03:01G	DPA1*01:03:01G	DPA1*01:03:01:01	DPA1*01:03:01:04
6	A*01:01:01	A*02:01:01	A*01:01:01	A*02:01:01
	B*15:01:01	B*49:01:01	B*15:01:01	B*49:01:01
	C*03:03:01	C*07:01:01	C*03:03:01	C*07:01:01
	DRB1*04:01:01G	DRB1*07:01:01G	DRB1*04:01:01G	DRB1*07:01:01:01
	DRB4*01:03:01:01	—	DRB4*01:03:01G	—
	DQB1*03:02:01G	DQB1*03:03:02	DQB1*03:02:01:01	DQB1*03:03:02
	DQA1*02:01:01	DQA1*03:01:01:01	DQA1*02:01:01	DQA1*03:01:01:01
	DPB1*02:01:02G	DPB1*04:01:01G	DPB1*02:01:02G	DPB1*04:01:01G
	DPA1*01:03:01G	DPA1*01:03:01G	DPA1*01:03:01:01	DPA1*01:03:01

Таблица 3 (продолжение)
Table 3 (continued)

ID	MiSeq (Illumina, США) MiSeq (Illumina, USA)		FastaSeq 300 (GeneMind, Китай) FastaSeq 300 (GeneMind, China)	
	Аллель 1 Allele 1	Аллель 2 Allele 2	Аллель 1 Allele 1	Аллель 2 Allele 2
7	A*02:01:01	A*26:01:01:01	A*02:01:01	A*26:01:01:01
	B*15:01:01:04	B*35:02:01	B*15:01:01:04	B*35:02:01
	C*04:01:01	C*06:02:01	C*04:01:01	C*06:02:01
	DRB1*08:01:01G	DRB1*11:04:01	DRB1*08:01:01:01	DRB1*11:04:01
	DRB3*02:02:01:02	—	DRB3*02:02:01	—
	DQB1*03:01:01G	DQB1*04:02:01G	DQB1*03:01:01:02	DQB1*04:02:01:04
	DQA1*04:01:01	DQA1*05:05:01	DQA1*04:01:01	DQA1*05:05:01
	DPB1*03:01:01	DPB1*104:01:01	DPB1*03:01:01	DPB1*104:01:01
	DPA1*01:03:01G	DPA1*01:03:01G	DPA1*01:03:01:01	DPA1*01:03:01
8	A*01:01:01	A*29:01:01:01	A*01:01:01	A*29:01:01:01
	B*13:02:01	B*49:01:01	B*13:02:01	B*49:01:01
	C*06:02:01	C*06:02:01	C*06:02:01	C*06:02:01
	DRB1*07:01:01	DRB1*13:02:01	DRB1*07:01:01	DRB1*13:02:01
	DRB3*03:01:01:01	—	DRB3*03:01:01:01	—
	DRB4*01:03:01:01	—	DRB4*01:01:01G	—
	DQB1*02:02:01	DQB1*06:04:01:01	DQB1*02:02:01	DQB1*06:04:01:01
	DQA1*01:02:01	DQA1*02:01:01	DQA1*01:02:01	DQA1*02:01:01
	DPB1*04:01:01G	DPB1*17:01:01	DPB1*04:01:01G	DPB1*17:01:01
	DPA1*01:03:01:04	DPA1*02:01:01:03	DPA1*01:03:01:04	DPA1*02:01:01:03
9	A*24:02:01	A*32:01:01	A*24:02:01	A*32:01:01
	B*38:01:01	B*52:01:01	B*38:01:01	B*52:01:01
	C*12:02:02:01	C*12:03:01:01	C*12:02:02:01	C*12:03:01:01
	DRB1*13:01:01	DRB1*15:02:01	DRB1*13:01:01	DRB1*15:02:01
	DRB3*02:02:01:02	—	DRB3*02:02:01:02	—
	DRB5*01:02:01	—	DRB5*01:02:01	—
	DQB1*06:01:01G	DQB1*06:03:01:01	DQB1*06:01:01:01	DQB1*06:03:01:01
	DQA1*01:03:01:01	DQA1*01:03:01	DQA1*01:03:01:01	DQA1*01:03:01
	DPB1*04:01:01G	DPB1*04:01:01G	DPB1*04:01:01G	DPB1*04:01:01G
	DPA1*01:03:01:04	DPA1*01:03:01:04	DPA1*01:03:01:04	DPA1*01:03:01:04
12	A*02:01:01	A*25:01:01:01	A*02:01:01	A*25:01:01:01
	B*07:02:01	B*18:01:01	B*07:02:01	B*18:01:01
	C*07:02:01	C*12:03:01:01	C*07:02:01	C*12:03:01
	DRB1*11:04:01G	DRB1*15:01:01	DRB1*11:04:01G	DRB1*15:01:01
	DRB3*02:02:01	—	DRB3*02:02:01	—
	DRB5*01:01:01:01	—	DRB5*01:01:01:01	—
	DQB1*03:01:01	DQB1*06:02:01	DQB1*03:01:01	DQB1*06:02:01
	DQA1*01:02:01	DQA1*05:05:01	DQA1*01:02:01	DQA1*05:05:01
	DPB1*04:01:01G	DPB1*04:02:01G	DPB1*04:01:01G	DPB1*04:02:01G
	DPA1*01:03:01:04	DPA1*01:03:01	DPA1*01:03:01:04	DPA1*01:03:01

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

ID	MiSeq (Illumina, США) MiSeq (Illumina, USA)		FastaSeq 300 (GeneMind, Китай) FastaSeq 300 (GeneMind, China)	
	Аллель 1 Allele 1	Аллель 2 Allele 2	Аллель 1 Allele 1	Аллель 2 Allele 2
15	A*02:01:01:79	A*33:03:01	A*02:01:01:79	A*33:03:01
	B*13:02:01	B*58:01:01	B*13:02:01	B*58:01:01
	C*03:02:02	C*06:02:01	C*03:02:02	C*06:02:01
	DRB1*03:01:01G	DRB1*07:01:01	DRB1*03:01:01G	DRB1*07:01:01
	DRB3*02:02:01:01	–	DRB3*02:02:01:01	–
	DRB4*01:03:01:01	–	DRB4*01:01:01G	–
	DQB1*02:01:01	DQB1*02:02:01	DQB1*02:01:01	DQB1*02:02:01
	DQA1*02:01:01	DQA1*05:01:01:03	DQA1*02:01:01	DQA1*05:01:01:03
	DPB1*03:01:01G	DPB1*04:02:01G	DPB1*03:01:01G	DPB1*04:02:01G
	DPA1*01:03:01	DPA1*01:03:01	DPA1*01:03:01	DPA1*01:03:01
18	A*11:01:01	A*32:01:01	A*11:01:01	A*32:01:01
	B*27:02:01:04	B*50:01:01:01	B*27:02:01:04	B*50:01:01:01
	C*02:02:02	C*06:02:01:02	C*02:02:02	C*06:02:01G
	DRB1*07:01:01	DRB1*15:02:01	DRB1*07:01:01	DRB1*15:02:01
	DRB4*01:03:01:01	–	DRB4*01:03:01:01	–
	DRB5*01:03	–	DRB5*01:03	–
	DQB1*02:02:01	DQB1*05:02:01:01	DQB1*02:02:01	DQB1*05:02:01:01
	DQA1*01:01:01:07	DQA1*02:01:01	DQA1*01:01:01:07	DQA1*02:01:01
	DPB1*03:01:01G	DPB1*04:02:01G	DPB1*03:01:01G	DPB1*04:02:01G
	DPA1*01:03:01	DPA1*01:03:01	DPA1*01:03:01	DPA1*01:03:01

Список литературы / References

1. Кузьмич Е.В., Алянский А.Л., Иванова Н.Е., Витрищак А.А., Владовская М.Д., Морозова Е.В., Бондаренко С.Н., Семенова Е.В., Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В. Анализ результатов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в зависимости от степени HLA-подбора пациента и неродственного донора // Онкогематология, 2014. № 3. С. 25-31. [Kuzmich Ye.V., Alyanskiy A.L., Ivanova N.Ye., Vitrischak A.A., Vladovskaya M.D., Morozova Ye.V., Bondarenko S.N., Semenova Ye.V., Zubarovskaya L.S., Afanasyev B.V. Analysis of the results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depending on HLA matching of the unrelated donor/recipient pair. *Onkogematologiya = Oncohematology*, 2014, no. 3, pp. 25-31. (In Russ.)]
2. Хамаганова Е.Г., Хижинский С.П., Абдрахимова А.Р., Кузьминова Е.П., Леонов Е.А., Покровская О.С., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н. Мультилокусные HLA-гаплотипы (A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1) в семьях больных с назначением к трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 291-302. [Khamaganova E.G., Khizhinsky S.P., Abdrakhimova A.R., Kuzminova E.P., Leonov E.A., Pokrovskaya O.S., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N. Multilocus HLA haplotypes (A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1) in families of patients scheduled for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Meditinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 291-302. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MNH-2651.
3. Янкевич Т.Э., Трофимов Ю.Д., Болдырева М.Н., Шубина Е.С., Гольцов А.Ю., Алтухова О.С., Суслова Т.А. Разработка системы «HLA-эксперт» для типирования генов HLA с высоким разрешением методом NFS. Опыт использования // Вестник гематологии, 2018. Т. 14, № 2. С. 56. [Yankevich T.E., Trofimov Yu.D., Boldyreva M.N., Shubina E.S., Gol'cov A.Yu., Altuhova O.S., Suslova T.A. Development of the "HLA-expert" system

for typing HLA genes with high resolution using the NFS method. Experience of use. *Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology*, 2018, Vol. 14, no. 2, p. 56. (In Russ.)]

4. Loginova M., Smirnova D., Paramonov I. A Novel HLA-B*57 allele, HLA-B*57:163, was identified by next generation sequencing typing. *HLA*, 2023, Vol. 101, no. 2, pp. 171-172.

5. Standards for histocompatibility & immunogenetics testing [date of access March 2024]. Available at: [http:// www.efiweb.org](http://www.efiweb.org).

Авторы:

Павлова И.Е. — д.м.н., главный научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Кузьмич Е.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Хаммаганова Е.Г. — д.б.н., заведующая лабораторией тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Рудик Д.В. — к.б.н., доцент кафедры биохимии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кузьминова Е.П. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Абдрахимова А.Р. — научный сотрудник лаборатории тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Pavlova I.E., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Kuzmich E.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Khamaganova E.G., PhD, MD (Biology), Head, Tissue Typing Laboratory, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Rudik D.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biochemistry, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Kuzminova E.P., PhD (Biology), Senior Research Associate, Tissue Typing Laboratory, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Abdrakhimova A.R., Research Associate, Tissue Typing Laboratory, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 06.04.2024
Принята к печати 18.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 06.04.2024
Accepted 18.04.2024

АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА ФИКОЛИНА (*FCN2*) У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ РАЗЛИЧНОЙ ТЯЖЕСТИ

Смольникова М.В., Афоничева К.В., Марченко И.В.,
Терещенко С.Ю.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской
академии наук», г. Красноярск, Россия

Резюме. Бронхиальная астма (БА) представляет собой одно из самых распространенных хронических заболеваний во всех возрастных группах. Астма имеет гетерогенные фенотипы с различной этиологией. В связи с этим для классификации БА используется множество параметров, например, степень тяжести и уровень контроля течения. Фенотип БА во многом зависит от состояния иммунной системы, а врожденный иммунитет играет важную роль в восприимчивости и патофизиологии астмы. Система комплемента (СК) является одним из компонентов гуморального иммунитета и состоит из комплекса защитных протеолитических ферментов (в том числе лектинов). Фиколин-2 (L-фиколин) является одной из основных опсонизирующих молекул респираторного секрета и протеином лектинового пути активации СК. Наличие полиморфизмов в гене L-фиколина влияют на уровень экспрессии, нарушение его связывающей способности, что может быть ассоциировано с более высокой восприимчивостью к инфекциям и вирусам, а также предрасположенностью к астме.

Цель — изучить распространенность полиморфизмов rs17549193 и rs7851696 гена L-фиколина (*FCN2*) у детей больных бронхиальной астмой различной степени тяжести.

Исследованы русские дети, направленные в детский аллергологический центр (Красноярск, Россия), в возрасте от 8 до 18 лет. Дети с БА были разделены на группы в зависимости от степени тяжести заболевания в соответствии с GINA-2023: легкая ($n = 146$) и тяжелая (включала персистирующую средней тяжести и тяжелую персистирующую, $n = 254$). В группу сравнения включены дети сопоставимые по возрасту и полу без БА, аллергии и инфекций. Экстракция ДНК из венозной крови проведена с использованием сорбентного метода. Генотипирование полиморфизмов rs17549193 и rs7851696 гена *FCN2* произведено методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Полученные результаты представляют информативные данные о частоте распределения полиморфных вариантов гена *FCN2* в популяции здорового населения русской национальности и у детей с социально и экономически важным заболеванием — бронхиальной астмой. Распределение rs17549193 и rs7851696 *FCN2* соответствует мировым европеоидным популяциям. Статистически значимых отли-

Адрес для переписки:

Смольникова Марина Викторовна
Научно-исследовательский институт медицинских
проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (391) 228-06-81.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Address for correspondence:

Marina V. Smolnikova
Research Institute of Medical Problems of the North
3g Partizan Zheleznayak St
Krasnoyarsk
660022 Russian Federation
Phone: +7 (391) 228-06-81.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Образец цитирования:

М.В. Смольникова, К.В. Афоничева, И.В. Марченко,
С.Ю. Терещенко «Анализ распределения полиморфизмов
гена фиколина (*FCN2*) у детей с бронхиальной астмой
различной тяжести» // Медицинская иммунология,
2024. Т. 26, № 4. С. 727-732.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16854

© Смольникова М.В. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.V. Smolnikova, K.V. Afonicheva, I.V. Marchenko,
S.Yu. Tereshchenko "Analysis of the distribution of ficolin
gene polymorphisms (*FCN2*) in children with bronchial
asthmas of various severity", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4,
pp. 727-732. doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16854

© Smolnikova M.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-AOT-16854

чий между больными астмой с разной степенью тяжести заболевания и здоровыми в исследованной выборке не выявлено.

Результаты исследования указывают на расширение выборки и спектра исследуемых полиморфных генов протеинов лектинового пути активации СК в связи с их важным значением для профилактики тяжелых форм заболеваний, а также на их значимость в функционировании иммунной системы.

Ключевые слова: астма, степень тяжести, дети, фиколин, генетический полиморфизм

ANALYSIS OF THE DISTRIBUTION OF FICOLIN GENE POLYMORPHISMS (*FCN2*) IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMAS OF VARIOUS SEVERITY

Smolnikova M.V., Afonicheva K.V., Marchenko I.V.,
Tereshchenko S.Yu.

Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Asthma is one of the most common chronic diseases in all age groups. Asthma has heterogeneous phenotypes with different etiologies. Many parameters are used to classify asthma, for example, the severity and level of flow control. The asthma phenotype is dependent on the state of the immune system, and innate immunity plays an important role in the susceptibility and pathophysiology of asthma. The complement system (CS) consists of a complex of protective proteolytic enzymes (including lectins). Ficolin-2 (L-ficolin) is one of the main opsonizing molecules of respiratory secretions and a protein of the lectin pathway of CS activation. Polymorphisms in the L-ficolin gene affect the level of expression which may be associated with a higher susceptibility to infections and viruses, as well as a predisposition to asthma.

Aim: To study the distribution of polymorphisms rs17549193 and rs7851696 of the L-ficolin (*FCN2*) gene in children with asthma of varying severity.

Russian children from the Children's Allergy Center (Krasnoyarsk, Russia), aged from 8 to 18 years, were studied. Children with asthma were divided into groups depending on the severity of the disease in accordance with GINA-2023: mild ($n = 146$) and severe ($n = 254$). The comparison group included children of comparable age and gender without asthma, allergies or infections. DNA extraction from blood was performed using the sorbent method. Genotyping of polymorphisms rs17549193 and rs7851696 *FCN2* was performed by real-time polymerase chain reaction.

The results obtained provide distribution of the polymorphic variants *FCN2* gene in the population of healthy Russian children and in children with a socially and economically important disease, namely asthma. The distribution of rs17549193 and rs7851696 *FCN2* corresponds to the global Caucasoid populations. There were no statistically significant differences between asthma patients with varying degrees of severity of the disease and healthy ones in the studied sample.

The results indicate an expansion of the sample and range of studied polymorphic genes of proteins of the lectin pathway of CS activation due to their importance for the prevention of severe forms of diseases, as well as their significance in the functioning of the immune system.

Keywords: asthma, severity, children, ficolin, genetic polymorphism

Введение

Бронхиальная астма (БА) — неинфекционное гетерогенное заболевание мультифакториальной природы, развитие которого зависит от генетической предрасположенности и факторов окружающей среды. К пусковым механизмам окружающей среды, в результате которых про-

исходят обострения астмы, относятся различные аллергены, инфекции, некоторые заболевания. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) принимает ряд мер для улучшения диагностики и лечения астмы. Данное заболевание включено в Глобальный план действий ВОЗ по профилактике неинфекционных заболеваний и борьбе с

ними, а также в повестку дня в области устойчивого развития до 2030 года, принятую Организацией Объединенных Наций (ООН).

Доказано, что врожденный иммунитет играет важную роль в восприимчивости и патофизиологии бронхиальной астмы. Одним из факторов гуморального иммунитета является система комплемента (СК) — комплекс защитных протеолитических ферментов, постоянно присутствующих в крови. Данная система обеспечивает связь между врожденным и адаптивным иммунитетом. СК состоит из множества белков, разделяющихся на группы: компоненты классического пути активации комплемента; белки, принимающие участие в альтернативном пути активации комплемента, а также белки-регуляторы интенсивности реакций. Функциями СК являются опсонизация патогенных организмов и усиление фагоцитоза, участие в стимулировании воспалительных реакций, а также разрушение мембраны чужеродной клетки путем образования мембранотакующего комплекса [1].

Одним из трех основных путей активации СК, наряду с классическим и альтернативным путями, является лектиновый путь (ЛП). Во время ЛП включается взаимодействие протеинов (лектинов), способных связываться с углеводами, с микроорганизмами или поврежденными клетками. В результате этого происходит иницирование каскада реакций и активация защитных функций СК. Основные лектины, избирательно распознающие углеводы на поверхности микроорганизмов и обратимо с ними связывающиеся — это фиколины трех типов (Н, L и M), маннозосвязывающий лектин (MBL), MBL-ассоциированные сериновые протеазы 2 и 3 (MASP-2, MASP-3) [6]. Для нормального функционирования иммунной системы и для предотвращения риска развития заболеваний инфекционной и неинфекционной природы крайне необходима четкая работа участников ЛП активации СК.

Показано, что L-фиколин обладает антимикробной активностью и играет существенную роль в защите от вирусов и инфекций дыхательных путей. В частности, он может связываться и элиминировать респираторно-синцитиальный вирус и вирусы гриппа [13]. Кроме этого, L-фиколин участвует в защите от бактериальных инфекций дыхательных путей, например пневмококковой инфекции, за счет связывания с бактерией и стимуляции иммунной системы. L-фиколин (или фиколин-2) способен связываться с микроорганизмами путем воздействия на ряд лигандов (липотейхоевые кислоты, полисахариды, ДНК и эластин) через сайты связывания в своем домене (fibrinogen-like domain). Показано, что L-фиколин связывается с ком-

понентами поверхности мембран *Mycobacterium tuberculosis*, некапсулированными формами *Streptococcus pneumoniae*, *Aspergillus fumigatus*. *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus agalactiae* также входят в число патогенов, которые распознаются фиколином-2 [9].

Изменения в генетической структуре полиморфных генов лектиновых белков, ассоциированных с уровнем продукции лектинов, влияют на работоспособность системы комплемента и, соответственно, элиминацию чужеродных агентов. Описан ряд полиморфных участков в гене L-фиколина, которые ассоциированы с уровнем экспрессии и активностью белка, например, rs17549193 FCN2 [14]. Полиморфизмы FCN2 ассоциированы с различным течением заболеваний и с более высоким риском подверженности к инфекционным заболеваниям, в том числе к COVID-19, а также с аутоиммунными заболеваниями и другими патологиями [12]. Показано, что полиморфизм rs17514136 FCN2 у детей ассоциирован с риском развития инфекционных заболеваний, таких как гепатит В, лейшманиоз, шистосомоз, системная красная волчанка, а также с риском развития бронхиальной астмы [7]. У лиц с ВИЧ-инфекцией полиморфизм rs3124952 FCN2 связан с риском развития туберкулеза [11].

Таким образом, развитие бронхиальной астмы, степень тяжести заболевания, различия в концентрации и функциональной активности белков системы комплемента обуславливаются в том числе генетической составляющей. Необходимо отметить, что частота встречаемости вариантов полиморфизмов гена FCN2, в частности rs17549193 и rs7851696, варьируется в зависимости от этнической принадлежности [2, 8].

В связи с вышеописанным актуальным является выявление факторов риска развития фенотипов астмы путем проведения сравнительного анализа генетических показателей в отдельно взятой популяции. **Целью данной работы** является анализ распределения полиморфизмов гена L-фиколина (rs17549193 и rs7851696) у русских детей с бронхиальной астмой.

Материалы и методы

В исследование были включены больные бронхиальной астмой с разной степенью тяжести дети в возрасте от 8 до 18 лет. Степень тяжести была определена с помощью анкетирования по системе GINA. В зависимости от степени тяжести заболевания, определяемой в соответствии с рекомендациями рабочей группы GINA (Global Initiative for Asthma), были выделены группы: легкая (n = 146) и тяжелая (включала персистирующую средней тяжести и тяжелую персистирующую, n = 254). Группа сравнения включа-

ла детей г. Красноярска ($n = 229$) без патологий бронхолегочной системы. Национальность детей, согласно анкетным данным, определена как русские. Для всех обследованных было получено письменное информированное согласие на проведение исследования от родителей.

Выделение ДНК из венозной крови было проведено с использованием набора реагентов DIAtom™ DNA Prep 100 (ООО «Изоген», Москва). Определение вариантов rs17549193 и rs7851696 *FCN2* было произведено с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени. Частоту встречаемости анализируемых признаков выражали в абсолютных и относительных значениях. Статистически значимыми считались различия на уровне значимости $p < 0,05$. Распределение генотипов по полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (РХВ) с помощью критерия χ^2 . Для выявления ассоциации генетических маркеров с различными вариантами течения астмы рассчитывали отношение шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (CI). Исследования одобрены на заседании локального этического комитета Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (Протокол № 12 от 10.12.2013 г.).

Результаты и обсуждение

В результате сравнительного анализа частоты распределения аллельных вариантов rs17549193 и rs7851696 *FCN2* у детей из контрольной группы (русские) с популяциями европеоидов мира (по данным ресурса ensembl.org) показано, что частота диких и минорных аллелей rs17549193 и rs7851696 у русских соотносятся с таковыми у европеоидов. Это говорит о том, что при отборе

групп сравнения корректно определен славянский состав, относящийся к европеоидам, а также о гомогенности генетической структуры исследованных групп.

В проведенном исследовании выявлено, что частота генотипа ТТ полиморфизма rs17549193 гена *FCN2* в исследованной выборке ниже как в группе здоровых, так и в группах больных БА по сравнению с другими генотипами (7,5% при легкой БА, 8,7% при тяжелой и 7,0% у здоровых детей, $p > 0,05$) (рис. 1). Генотип СТ чаще встречается в группе детей без астмы по сравнению с больными астмой (43,7% против 38,8%, $p > 0,05$). Структурный полиморфизм rs17549193, локализованный в экзоне 8 гена *FCN2*, ассоциирован с более высоким уровнем фиколина в плазме, который обусловлен его низкой функциональной способностью к связыванию бактерий и, соответственно, меньшей способностью накапливаться в очаге воспаления [3]. Ранее показано, что полиморфизм rs17549193 гена *FCN2* связан с повышенным риском развития туберкулеза легких. В том же исследовании статистически значимой ассоциации с туберкулезом легких не было обнаружено для других полиморфизмов *FCN2* (rs3124952, rs3811140 и rs3124953) [5].

При сравнении частот генотипов и аллелей полиморфизма rs7851696 гена *FCN2* выявлены незначительные различия в частоте встречаемости гомозиготного генотипа GG среди больных БА и контрольной группой (76% у больных легкой БА, 77% — у больных тяжелой БА и 73,8% у здоровых, $p > 0,05$) (рис. 2). Аллельный вариант Т чаще встречается в контрольной группе по сравнению с больными БА вне зависимости от тяжести заболевания (14,6% против 12,4%, $p > 0,05$). Наличие редкого аллеля полиморфизма

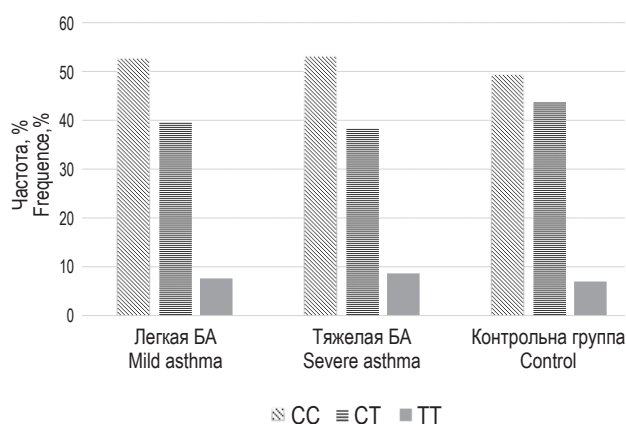


Рисунок 1. Частота распределения генотипов полиморфизма rs7851696 гена *FCN2*

Figure 1. Distribution of genotypes of polymorphism rs7851696 of *FCN2*

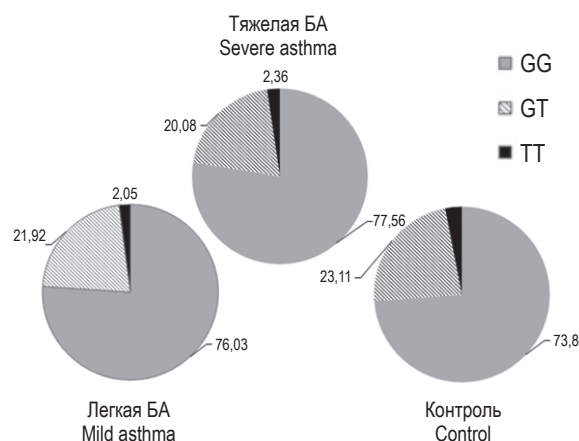


Рисунок 2. Частота распределения генотипов полиморфизма rs17549193 гена *FCN2*

Figure 2. Distribution of genotypes of polymorphism rs17549193 of *FCN2*

rs7851696 в 8 экзоне гена *FCN2* приводит к аминокислотной замене аланина на серин (p.A258S, +6424G > T) что повышает способность фиколина прикрепляться к углеводным компонентам бактерий [4]. В данной мутации гомозиготный вариант GG гена *FCN2* ассоциирован с низкой тканевой функциональной активностью. Ранее сообщалось, что аллельный вариант G rs7851696 *FCN2*, также как и rs17549193, ассоциирован с повышенным риском развития туберкулеза легких [15]. Кроме этого, установлено, что аллель T ассоциирован с высоким сродством фиколина-2 к углеводным компонентам мембран патогенных микроорганизмов [10].

Заключение

По результатам данного исследования впервые получены данные по распределению полиморфизмов rs17549193 и rs7851696 гена L-фиколина (*FCN2*) у детей с бронхиальной астмой различной степени тяжести и здоровых детей русской национальности. В исследованной выборке не были показаны статистически значимые отличия в частоте генетических вариантов между группами сравнения.

Данное исследование проведено на примере бронхиальной астмы ввиду ее широкого распространения и важности как серьезной медицинской и социальной проблемы. Один из основных факторов, способствующих обострениям и ухудшению течения бронхиальной астмы, — вирусные

и инфекционные агенты. Генетические варианты *FCN2* могут нарушать способность L-фиколина связываться с патогенами, что может увеличить риск развития различных заболеваний, например инфекций дыхательных путей, сепсиса и других, связанных с нарушением работы иммунной системы.

В связи с вышесказанным, существует необходимость проведения дальнейших исследований с участием больших выборок и расширенным спектром изучаемых полиморфных участков в генах лектинов для понимания роли генетических вариантов протеинов лектинового пути активации системы комплемента (в том числе маннозосвязывающего лектина и MBL-ассоциированных сериновых протеаз) в развитии заболеваний у различных этнических групп для оценки функционирования иммунной защиты и разработки новых методов их профилактики.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке «Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках реализации научного проекта № 20231102-06108 «Разработка системы критериев предрасположенности населения Крайнего Севера к заболеваниям бронхолегочной системы на основе генетических маркеров: пути к персонализации и здоровьесбережению».

Список литературы / References

1. Смольникова М.В., Терещенко С.Ю. Протеины лектинового пути активации системы комплемента: иммунобиологические функции, генетика и участие в патогенезе заболеваний человека // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 2. С. 209-221. [Smolnikova M.V., Tereshchenko S.Yu. Proteins of the lectin pathway of the complement system activation: immunobiological functions, genetics and involvement in the pathogenesis of human diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 2, pp. 209-221. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-POT-1777.
2. Badarukhiya J.A., Tupperwar N., Nizamuddin S., Mulpur A.K., Thangaraj K. Novel FCN2 Variants and Haplotypes are Associated with Rheumatic Heart Disease. *DNA Cell Biol.*, 2021, Vol. 40, no. 10, pp. 1338-1348.
3. Bjarnadottir H., Arnardottir M., Ludviksson B.R. Frequency and distribution of FCN2 and FCN3 functional variants among MBL2 genotypes. *Immunogenetics*, 2016, no. 68, pp. 315-325.
4. Cedzynski M., Nuytinck L., Atkinson A.P.M., St Swierzko A., Zeman K., Szemraj J., Szala A., Turner M.L., Kilpatrick D.C. Extremes of l-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 150, no. 1, pp. 99-104.
5. Dabrowska-Zamojcin E., Czerewaty M., Malinowski D., Tarnowski M., Śluczanska-Głabowska S., Domanski L., Safranow K., Pawlik A. Ficolin-2 gene rs7851696 polymorphism is associated with delayed graft function and acute rejection in kidney allograft recipients. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2018, Vol. 66, no. 1, pp. 65-72.
6. Dobó J., Kocsis A., Farkas B., Demeter F., Cervenak L., Gál P. The lectin pathway of the complement system—activation, regulation, disease connections and interplay with other (proteolytic) systems. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, Vol. 25, no. 3, 1566. doi: 10.3390/ijms25031566.
7. Garred P., Honoré C., Ma Y.J., Rørvig S., Cowland J., Borregaard N., Hummelshøj T. The Genetics of Ficolins. *JIN*, 2010, Vol. 2, no. 1, pp. 3-16.
8. Gaździcka J., Gołabek K., Hudy D., Miśkiewicz-Orczyk K., Zięba N., Tynior W., Asman M., Misiólek M., Strzelczyk J.K. Selected SNPs of FCN2 associated with chronic tonsillitis in the polish adult population. *Genes (Basel)*, 2023, Vol. 14, no. 2, 242. doi: 10.3390/genes14020242.

9. Gil E., Noursadeghi M., Brown J.S. Streptococcus pneumoniae interactions with the complement system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2022, no. 12, 929483. doi: 10.3389/fcimb.2022.929483.
10. Hummelshøj T., Munthe-Fog L., Madsen H.O., Fujita T., Matsushita M., Garred P. Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. *Hum. Mol. Genet.*, 2005, Vol. 14, no. 12, pp. 1651-1658.
11. Jensen M.L., Honoré C., Hummelshøj T., Hansen B.E., Madsen H.O., Garred P. Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells. *Mol Immunol.*, 2007, Vol. 44, no. 5, pp. 856-865.
12. Metzger M.-L., Michelfelder I., Goldacker S., Melkaoui K., Litzman J., Guzman D., Grimbacher B., Salzer U. Low ficolin-2 levels in common variable immunodeficiency patients with bronchiectasis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2015, Vol. 179, no. 2, pp. 256-264.
13. Pan Q., Chen H., Wang F., Jeza V.T., Hou W., Zhao Y., Xiang T., Zhu Y., Endo Y., Fujita T., Zhang X.-L. L-ficolin binds to the glycoproteins hemagglutinin and neuraminidase and inhibits influenza A virus infection both in vitro and in vivo. *J. Innate Immun.*, 2012, Vol. 4, no. 3, pp. 312-324.
14. Świerczko A.S., Jarych D., Gajek G., Chojnacka K., Kobiela P., Kufelnicka-Babout M., Michalski M., Sobczuk K., Szala-Poździej A., Matsushita M., Mazela J., Domżalska-Popadiuk I., Kilpatrick D.C., Kalinka J., Sekine H., Cedzyński M. Polymorphisms of the FCN2 Gene 3'UTR Region and Their Clinical Associations in Preterm Newborns. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 741140. doi: 10.3389/fimmu.2021.741140.
15. Xu D.-D., Wang C., Jiang F., Wei L.-L., Shi L.-Y., Yu X.-M., Liu C.-M., Liu X.-H., Feng X.-M., Ping Z.P., Jiang T.-T., Chen Z.-L., Li Z.-J., Li J.-C. Association of the FCN2 Gene Single Nucleotide Polymorphisms with Susceptibility to Pulmonary Tuberculosis. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 9, e0138356. doi: 10.1371/journal.pone.0138356.

Авторы:

Смольникова М.В. — к.б.н., руководитель группы молекулярно-генетических исследований, ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Афоничева К.В. — младший научный сотрудник группы молекулярно-генетических исследований, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Марченко И.В. — младший научный сотрудник группы молекулярно-генетических исследований, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Терещенко С.Ю. — д.м.н., профессор, заведующий клиническим отделением соматического и психического здоровья детей, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Authors:

Smolnikova M.V., Ph.D. (Biology), Head of the Molecular Genetic Research Group, Leading Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Afonicheva K.V., Junior Research Associate at the Molecular Genetic Research Group, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Marchenko I.V., Junior Research Associate at the Molecular Genetic Research Group, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Tereshchenko S.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Clinical Department of Somatic and Mental Health of Children, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 01.04.2024
Отправлена на доработку 03.04.2024
Принята к печати 10.04.2024

Received 01.04.2024
Revision received 03.04.2024
Accepted 10.04.2024

ТРАФИК IgE И IgG В-КЛЕТОК В НИЗКОДОЗОВОЙ МОДЕЛИ АЛЛЕРГИИ НА Gal d1, 2, 3

Фаттахова Г.В.¹, Макарова А.О.^{1,2}, Коновалова М.В.¹,
Каширина Е.И.¹, Коцарева О.Д.¹, Окара П.С.³,
Матушевская Е.В.⁴, Свиричевская Е.В.¹

¹ ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени
М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства»,
Москва, Россия

Резюме. Аллергия I типа опосредуется образованием IgE-антител к белкам, выделяемым нереплицирующимися микроорганизмами (пыльца растений, клещи домашней пыли и др.), попадающими на слизистые оболочки в очень низких концентрациях. Механизмы и локализация переключения наивных В-клеток на синтез IgE к аллергенам полностью не определены. Целью данной работы было определение места переключения В-клеток и трафик IgE-продуцирующих В-клеток у мышей, иммунизированных низкой дозой эквивалентной смеси белков куриных яиц Gal d1, Gal d2, Gal d3. Аллергены в физиологическом растворе вводили в холку мышей 9–10 раз с интервалом в 2–3 дня; общая доза составила 2,7 мкг на мышь. Продукцию IgE к белкам Gal d в крови и В-клетками, выделенным из холки, дренирующих лимфоузлов, селезенки и костного мозга иммунных мышей анализировали в динамике после прекращения сенсибилизации. Как в крови, так и в культурах *in vitro* доминирование IgE менялось с распознавания низкомолекулярного белка Gal d2 в течение сенсибилизации мышей на высокомолекулярный аллерген Gal d3 после отмены сенсибилизации. Показали, что формировался IgG ответ памяти, который появлялся только через месяц после окончания сенсибилизации. IgG формировался только к Gal d3, но не к другим аллергенам. Культуры *in vitro* показали, что В-клетки переключались на выработку IgE локально в холке с низким трафиком в селезенку, но не в лимфоузлы. В сыворотке крови титры IgE ко всем белкам Gal d снижались после прекращения сенсибилизации и сохранялись длительное время. В селезенке через месяц после отмены сенсибилизации появлялся пул В-клеток, продуцирующих IgE *in vitro*. Полученные результаты позволили сделать несколько выводов. 1) В-клетки переключаются на синтез IgE локально в месте попадания аллергена (холка). 2) Наблюдается преимущественное распознавание IgE антителами белков из пула аллергенов, причем ответ двухфазный: на раннем ответе распознается низкомолекулярный белок Gal d2; при ответе памяти распознается высокомолекулярный аллерген Gal d3. 3) В данной модели наблюдается

Адрес для переписки:

Свиричевская Елена Викторовна
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: 8 (910) 464-87-60.
E-mail: esvir@mail.ibch.ru

Address for correspondence:

Elena V. Svirshchevskaya
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
16/10 Miklukho-Maklay St
Moscow
117997 Russian Federation
Phone: +7 (910) 464-87-60.
E-mail: esvir@mail.ibch.ru

Образец цитирования:

Г.В. Фаттахова, А.О. Макарова, М.В. Коновалова,
Е.И. Каширина, О.Д. Коцарева, П.С. Окара,
Е.В. Матушевская, Е.В. Свиричевская «Трафик IgE
и IgG В-клеток в низкодозовой модели аллергии на
Gal d1, 2, 3» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 4. С. 733–740. doi: 10.15789/1563-0625-IAI-16635

© Фаттахова Г.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

G.V. Fattakhova, A.O. Makarova, M.V. Konovalova,
O.D. Kotsareva, E.I. Kashirina, P.S. Okara,
E.V. Matushevskaya, E.V. Svirshchevskaya “IgE and IgG
B cell traffic in a low-dose Gal d1, 2, 3 allergy model”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 4, pp. 733–740.
doi: 10.15789/1563-0625-IAI-16635

© Fattakhova G.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IAI-16635

доминирование IgG ответа на высокомолекулярный белок Gal d3. Таким образом, показано, что при распознавании иммунной системой смеси белков, происходящих из аллергена, наблюдается доминирование белков, распознаваемых как IgE, так и IgG. Поскольку у больных аллергией чаще всего нет IgG-антител, то можно предположить, что в этом случае наблюдается поддерживаемый поступлением антигена ответ первой фазы, при котором распознаются низкомолекулярные белки IgE-антителами, но не формируется IgG ответ.

Ключевые слова: аллергия на куриные яйца, IgE, Gal d, трафик В-клеток, мышинная модель аллергии, локальное переключение В-клеток

IgE AND IgG B CELL TRAFFIC IN A LOW-DOSE Gal d1, 2, 3 ALLERGY MODEL

Fattakhova G.V.^a, Makarova A.O.^{a, b}, Konovalova M.V.^a,
Kotsareva O.D.^a, Kashirina E.I.^a, Okara P.S.^c, Matushevskaya E.V.^d,
Svirshchevskaya E.V.^a

^a Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, Russian Federation

^d Institute of Advanced Training, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Abstract. Type I allergy is mediated by the formation of IgE antibodies to proteins secreted by non-replicating microorganisms (plant pollen, house dust mites, etc.) that enter the mucous membranes in very low concentrations. The mechanisms and localization of naive B cells' switching to IgE production have not been fully determined. The aim of this work was to determine the switching site of B cells and the traffic of IgE-producing B cells in mice immunized with a low dose of equimolar mixture of egg proteins Gal d1, Gal d2, and Gal d3. Allergens in saline solution were injected into the withers of mice 9–10 times with an interval of 2–3 days; the total dose was 2.7 µg/mouse. The production of IgE to Gal d proteins in the blood and by B cells isolated from the withers, draining lymph nodes, spleen, and bone marrow of immune mice was analyzed in dynamics after cessation of sensitization. Both in blood and in *in vitro* cultures, the dominance of IgE changed from the recognition of the LMW Gal d2 during the sensitization of mice to the HMW Gal d3 after sensitization was discontinued. In this model, an IgG memory response appeared only a month after the end of sensitization and recognized only Gal d3. *In vitro* cultures showed that B cells switched to IgE production locally in the withers with low traffic to the spleen. In the blood serum, IgE titers for all Gal d proteins decreased after the cessation of sensitization and persisted for a long time. A month after the cancellation of the sensitization, a pool of B cells producing IgE *in vitro* appeared in the spleen. These B-cells died after 20–30 days as no *in vitro* IgE production was observed later than 85–90 days. The results obtained allowed us to draw several conclusions. B cells switch to IgE synthesis locally at the site of allergen injections. The response was two-phase: LMW Gal d2 was recognized in the early response, while HMW Gal d3 was recognized in the late phase. In this model, the IgG response to HMW Gal d3 was clearly dominant. In conclusion, it has been shown that when the immune system recognizes a mixture of proteins originating from some allergen, the dominance of proteins recognized by both IgE and IgG is observed. Since allergy patients most often do not have IgG antibodies, it can be assumed that in this case an acute phase response, supported by antigen intake, is observed, in which LMW allergens are recognized.

Keywords: allergy to chicken eggs, IgE, Gal d, B cell traffic, mouse model of allergy, local switching of B cells

Введение

Аллергены могут быть как корпускулярными (клещи домашней пыли, пыльца растений, споры грибов, фрагменты эпидермиса домашних животных и т. д.), так и растворимыми (пищевые аллергены, яд насекомых). Корпускулярные аллергены попадают в дыхательные пути, где

задерживаются на поверхности слизистых оболочек. Большинство из них вымывается секретом; меньшая часть захватывается резидентными фагоцитами и, как полагают, доставляется в дренирующие лимфатические узлы (ЛУ). Яды насекомых, по-видимому, попадают в кровоток и транспортируются в селезенку. Когда белко-

вый антиген достигает вторичных лимфоидных органов, дальнейший иммунный ответ будет зависеть от количества и формы чужеродных белков, захваченных и представленных иммунным клеткам [8, 14, 22]. Известно, что длительное поступление значительного количества антигена приводит к образованию специализированной ниши, специфичной для антигена и называемой зародышевым центром (ЗЦ) [9, 13]. Перед образованием ЗЦ небольшие иммунные кластеры, называемые экстрафолликулярными фокусами (ЭФФ), появляются вокруг фолликулярных дендритных клеток (ФДК), окруженных активированными аллергеном В-клетками и небольшим количеством фолликулярных Т-клеток. Увеличивающееся количество нагруженных антигенами В-клеток, накапливающихся в ЭФФ, индуцирует их созревание в ЗЦ. Скоординированное взаимодействие между ФДК, В- и Т-клетками в ЗЦ приводит к гипермутации В-клеток и отбору В-клеток, продуцирующих антитела к поступающему антигену. В случае ограниченного числа таких В-клеток зрелые ЗЦ, скорее всего, не будут образовываться. Показано, что В-клетки в ЭФФ могут гипермутировать, однако с низкой эффективностью [13]. Вероятно, это относится и к реакции на аллергены. Количество белков аллергенов, проникающих через барьеры организма, очень низкое. Аллергены не содержат адъювантных молекул, однако попадают через слизистые оболочки носа, легких (респираторные аллергены), полости рта и тонкого кишечника (пищевые аллергены), кожу (укусы членистоногих) в течение длительного времени. Соответственно, уровень доставки антигена будет длительным, но в небольшом количестве.

В настоящее время имеется достаточное количество работ, показывающих возможность локального образования ЭФФ в тканях. Образование лимфоидных ЭФФ в ткани полипов носа и бронхов у пациентов с хроническим риносинуситом и пневмонией было показано многими группами [1, 7, 9, 11]. Подтверждением локальной выработки IgE стало выявление IgE в грудном молоке или слезах при отсутствии IgE в крови [10, 12]. Пищевые аллергены предположительно проникают через тонкий кишечник. Нет данных, свидетельствующих об образовании ЭФФ в эпителии кишечника, однако более вероятно, что пищевая аллергия также инициируется не в кишечнике, а слизистой полости рта [2, 5, 6, 15].

Доля циркулирующего IgE в крови составляет менее 0,04% от концентрации IgG из-за высокого сродства к IgE рецептору типа I (FcεRI), экспрессируемого тканевыми резидентными тучными клетками [19]. Это затрудняет обнаружение IgE в крови. Идентификация В-клеток, секретирующих IgE, также представляет проблему из-за

экспрессии низкоаффинного рецептора FcεRII (CD23) многими иммунными клетками [13].

При моделировании аллергии часто используются адъюванты или высокомолекулярные носители для инициации первичного иммунного ответа на аллергены [16, 21]. Такие протоколы приводят к образованию высоких титров антител IgG, препятствующих IgE-ответу. Ранее мы показали, что в большинстве случаев в крови пациентов с аллергией, не проходивших аллерген-специфической терапии, отсутствуют IgG к аллергенам [20].

Участие ЗЦ в образовании IgE на мышиных моделях остается активной областью исследований. Было показано, что IgE⁺В-клетки подвергаются апоптозу внутри ЗЦ [18]. В целом до сих пор пути, регулирующие переключение В-клеток на синтез IgE *in vivo* и трафик IgE⁺В-клеток, изучены мало.

Аллергия характеризуется доминирующим распознаванием некоторых белков из аллергенов, называемых «основными» аллергенами [17]. Продолжительная аллергия приводит к распознаванию минорных белков аллергенов [3]. При этом нет данных, чем основные и минорные аллергены отличаются. Работ по моделированию на животных аллергической реакции на смесь аллергенов нет.

Целью данной работы был анализ места формирования и трафик В-клеток, секретирующих IgE и IgG, в модели аллергии на низкие дозы смеси аллергенов яичного белка. Показана иерархия иммунного ответа на смесь антигенов Gal d1, Gal d2, Gal d3 и формирование IgG⁺ и IgE⁺В-клеток памяти.

Материалы и методы

Материалы

Рекомбинантные аллергены Gal d-белки были предоставлены Анной Долговой (Санкт-Петербургский институт Пастера, Санкт-Петербург, Россия). Использован липополисахарид (ЛПС) (Merck KGaA, Дармштадт, Германия).

Мыши

Самки мышей BALB/c в возрасте 8-12 недель были получены из питомника «Столбовая» (Московская область, Россия). Протокол одобрен Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) Центра исследований животных ИБХ РАН (разрешение № 326 от 16.08.2021).

Гель-электрофорез

Gal d1, Gal d2, Gal d3 (30 мкг/линия) денатурировали при 95 °C в буфере для образцов Laemmli в течение 5 мин в восстановительных условиях (2-меркаптоэтанол). Белки разделяли в 10%-ном геле с использованием системы электрофореза Bio-Rad. Гели окрашивали PageBlue™ (Thermo Scientific, США), маркер молекулярной массы PageRuler™ (Thermo Scientific, США).

Эксперименты *in vivo*

Антигены готовили в эквимольном соотношении Gal 1, Gal 2, Gal 3 в физрастворе (ФР) 6 мкг/мл, чтобы получить 300 нг суммарного белка в 50 мкл. Смесь фильтровали через фильтры 0,2 мкм, замораживали в аликвотах, достаточных для однократной иммунизации экспериментальных групп. Мышей ($n = 30$) иммунизировали подкожно в область холки в течение 3–4 недель 2–3 раза в неделю. На 30–40-й день сенсибилизацию прекращали (три эксперимента). Контрольным мышам вводили только ФР. Кровь забирали из орбитального синуса глаза под анестезией изофлураном. Собранную сыворотку хранили при температуре -20°C до использования.

Из каждой группы мышей умерщвляли перикардической дислокацией на дни 33, 46, 55, 61, 67, 76, 83 и 88 (рис. 1А). Холку, подмышечные ЛУ, селезенку и костный мозг собирали, гомогенизировали, трижды промывали физиологическим раствором и переносили в питательную среду. Клетки селезенки и костного мозга обрабатывали 0,86% буфером NH_4Cl (рН 7,2) и промывали.

Культуры *in vitro*

ЛУ, спленоциты и клетки костного мозга от иммунных и интактных мышей высевали из расчета 5×10^6 /лунку на 24-луночные планшеты (Costar, США). Суспензия холки содержала менее $0,2 \times 10^6$ /мышь. Все собранные клетки холки, включая стромальные и жировые, высевали в лунку. Клетки инкубировали в RPMI-1640 с добавлением 10%-ной фетальной телячьей сыворотки, пенициллина, стрептомицина и L-глутамина (НПП «ПанЭко», Россия) с добавлением 50 мкг/мл ЛПС. Клетки инкубировали в течение 5 дней; надосадочные жидкости (НЖ) собирали, центрифугировали и замораживали до исследования.

Иммуноферментный анализ

Растворы белков Gal d1, Gal d2, Gal d3 наносили по 5 мкг/мл на 96-луночные планшеты (Corning, Merck KGaA, Дармштадт, Германия) на ночь при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Планшеты трижды промывали ФР с фосфатным буфером (ФБ), содержащим 0,05% Твин-20, между всеми инкубациями. Для блокирования неспецифического связывания использовали ФБ с 2% бычьего альбумина. Сыворотку добавляли в разных разведениях. Культуральные супернатанты добавляли в количестве 200 мкл/лунку без дополнительного блокирующего буфера. Планшеты инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре или ночь. Для выявления IgE и IgG использовали соответствующие вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена (Abscam, Великобритания), после промывки планшетов. Реакцию регистрировали с использованием 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Оптическую плотность при 450 нм определяли с помощью спектрофотометра MultiScan FC (Thermo Scientific, США). Титры в сыворотке крови оценивали путем приближения к фону, превышающего 3 стандартных отклонения от

фона. Результаты анализа НЖ показаны в виде оптической плотности (O.D. 450 нм).

Статистический анализ

Графики были созданы с использованием программного обеспечения MS Excel. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM, по крайней мере для трех независимых экспериментов, или как один репрезентативный эксперимент из трех. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента. Уровни значимости $p < 0,05$ считались статистически достоверными.

Результаты и обсуждение

Характеристика иммунного ответа на белки Gal d в низкодозовой модели аллергии

Мышей иммунизировали в холку 3 раза в неделю по 300 нг/мышь эквимольной смесью белков Gal d1 (28 кДа), Gal d2 (44 кДа) и Gal d3 (78 кДа) (Gal d) в ФР (рис. 1А, Б). Gal d1 образует стабильные димеры, что было визуализировано с помощью денатурирующего гель-электрофореза, и его молекулярную массу (MW) можно оценить как 56 кДа.

Сенсибилизацию проводили 9–10 раз в зависимости от эксперимента до образования IgE, а затем прекращали вводить аллергены. Уровень IgE и IgG оценивали в динамике в течение 2 месяцев после прекращения введения аллергена (рис. 1Б, В). Общая доза аллергенной нагрузки на мышь составила 2,7–3 мкг (рис. 1В). Титры сыворотки крови анализировали методом ИФА против индивидуальных белков.

На рисунке 1Г и Д приведена динамика ответов IgE и IgG на белки Gal d. Результаты показали, что во время сенсибилизации индуцировались наиболее высокие титры IgE к Gal d2, белку с условно наименьшей массой ($p < 0,05$, t-критерий). После прекращения стимуляции титры IgE ко всем белкам Gal d снижались в течение 20 дней и далее оставались стабильными на низком уровне (титры составляли 200–600) в течение 2 месяцев. При этом поменялось доминирование: более высокие титры регистрировали для высокомолекулярного белка Gal d3 (рис. 1Г).

Реакция IgG на все аллергены Gal d была низкой вплоть до 50 дня (рис. 1Д, 33-й день). Титры IgG к Gal d3, но не к Gal d1 и Gal d 2, резко увеличивались, начиная с 60 дня (30 дней после прекращения сенсибилизации).

Суммарные данные показали, что через месяц после окончания сенсибилизации доминировал как IgG, так и IgE ответ на высокомолекулярный аллерген Gal d3. При этом титры IgE оставались низкими, а титры IgG резко выросли, что свидетельствует о формировании IgG^+B -клетки памяти.

Трафик В-клеток, продуцирующих Gal d-специфический IgE

Анализ аллерген-специфических иммуноглобулинов в крови не дает информации о месте переключения В-клеток на IgE или

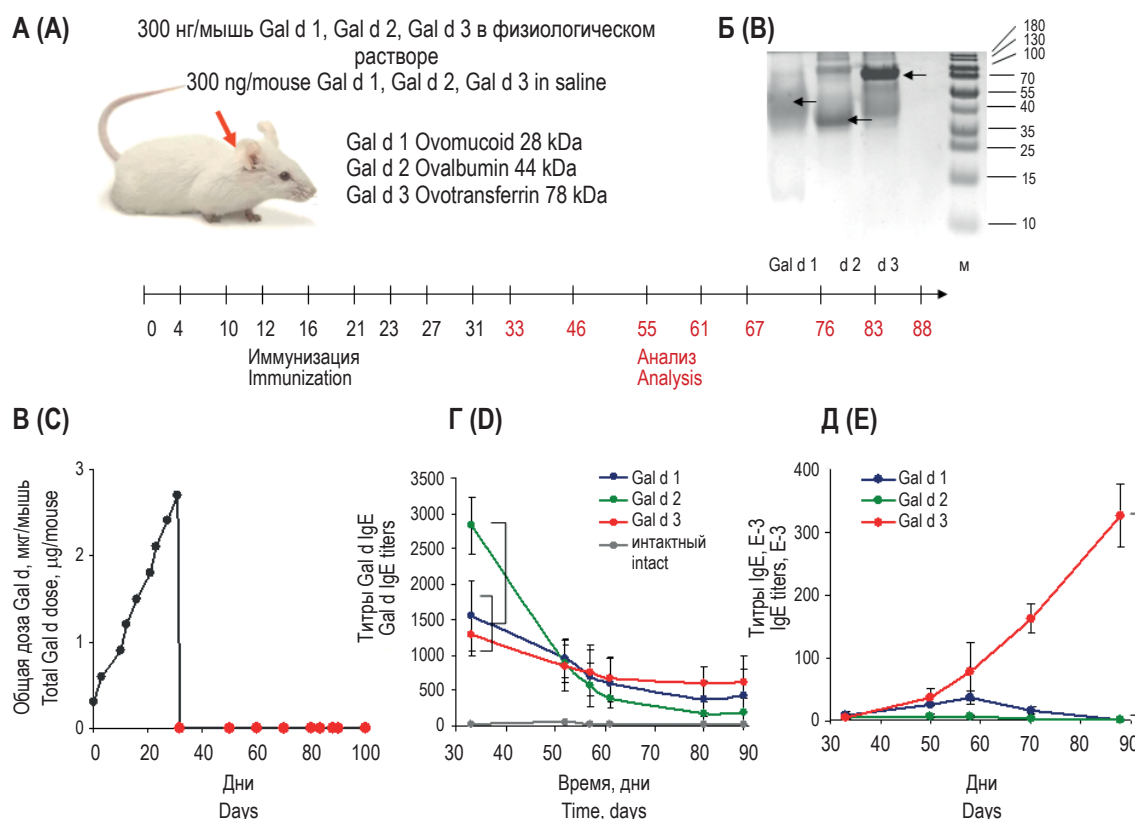


Рисунок 1. Gal d IgE и IgG-ответ в модели аллергии на низкие дозы

Примечание. А – схема эксперимента: мышам BALB/c вводили 9 раз по 300 нг/инъекция/мышь эквимоларной смеси Gal d 1, 2, 3 в физиологическом растворе в область холки (черные даты на шкале). Начиная с 33-го дня сенсibilизацию прекращали и анализировали иммунный ответ (красные даты на шкале). Б – денатурирующий 10%-ный гель-электрофорез белков Gal d. В – общая доза аллергенов на мышь (черные точки) и даты проведения анализа (красные точки). Г, Д – титры IgE (д) и IgG (е) в сыворотке крови мышей к белкам Gal d1 (синие символы), Gal d2 (зеленые символы), Gal d3 (красные символы) в динамике иммунного ответа памяти. Значимые различия отмечены скобками ($p < 0,05$, t-критерий). Приведены результаты одного репрезентативного эксперимента из трех.

Figure 1. Gal d IgE and IgG response in a low dose allergy model

Note. A, experimental scheme: BALB/c mice were injected 9 times with 300 ng/injection /mouse equimolar mixture Gal d 1, 2, 3 in saline solution in the withers area (black dots on the scale). Starting from day 33, sensitization was discontinued and the immune response was analyzed (red dots on the scale). B, denaturing 10% gel electrophoresis of Gal proteins d. C, total dose of allergens per mouse (black dots) and dates of analysis (red dots). D, E, titers of IgE (d) and IgG (e) in the blood serum of mice to the proteins Gal d1 (blue symbols), Gal d2 (green symbols), Gal d3 (red symbols) in the dynamics of the immune response of memory. Significant differences are marked with parentheses ($p < 0.05$, t-criterion). The results of one representative experiment out of three are presented.

IgG изотипы. Для выяснения этого вопроса клетки холки, ЛУ, селезенки и костного мозга сенсibilизированных мышей стимулировали *in vitro* ЛПС и собирали НЖ. Анализ IgE и IgG в НЖ показал присутствие IgE преимущественно в холке во время сенсibilизации и в течение 20-30 дней после отмены (рис. 2А). Титры IgE к Gal d1 и Gal d2 были достоверно выше, чем титры к Gal d3-специфичных IgE ($p < 0,05$, t-критерий), что коррелирует с уровнем IgE в крови в эти сроки. Следует отметить, что все культуры, кроме холки, содержали 5×10^6 клеток/мл. Количество лимфоидных клеток в холке не превышало $0,2 \times 10^6$ на мышь. Уровень IgE в НЖ снижался до нормы к 80-90-му дню.

Анализ клеток дренирующих ЛУ показал отсутствие накопления Gal d специфичных IgE⁺В-

клеток в ЛУ (рис. 2Б). Были обнаружены низкие уровни IgE к Gal d1 и Gal d3, но не к Gal d2, достоверно отличающиеся от контрольных культур. Возможно, что IgE⁺В-клетки мигрируют в другие лимфоидные органы либо погибают в ЛУ.

Продукция IgE к Gal d1, но не к Gal d2 и Gal d3 после отмены сенсibilизации была зарегистрирована в селезенке (рис. 2В). В костном мозге IgE⁺В-клетки не появлялись до 60-го дня (рис. 2Г).

Начиная с 60-го дня (30 дней после отмены сенсibilизации), IgE⁺В-клетки появились в селезенке и, в меньшем количестве, в костном мозге (рис. 2В, Г).

Суммируя полученные данные, показали, что основное место переключения В-клеток на синтез IgE происходит локально в месте по-

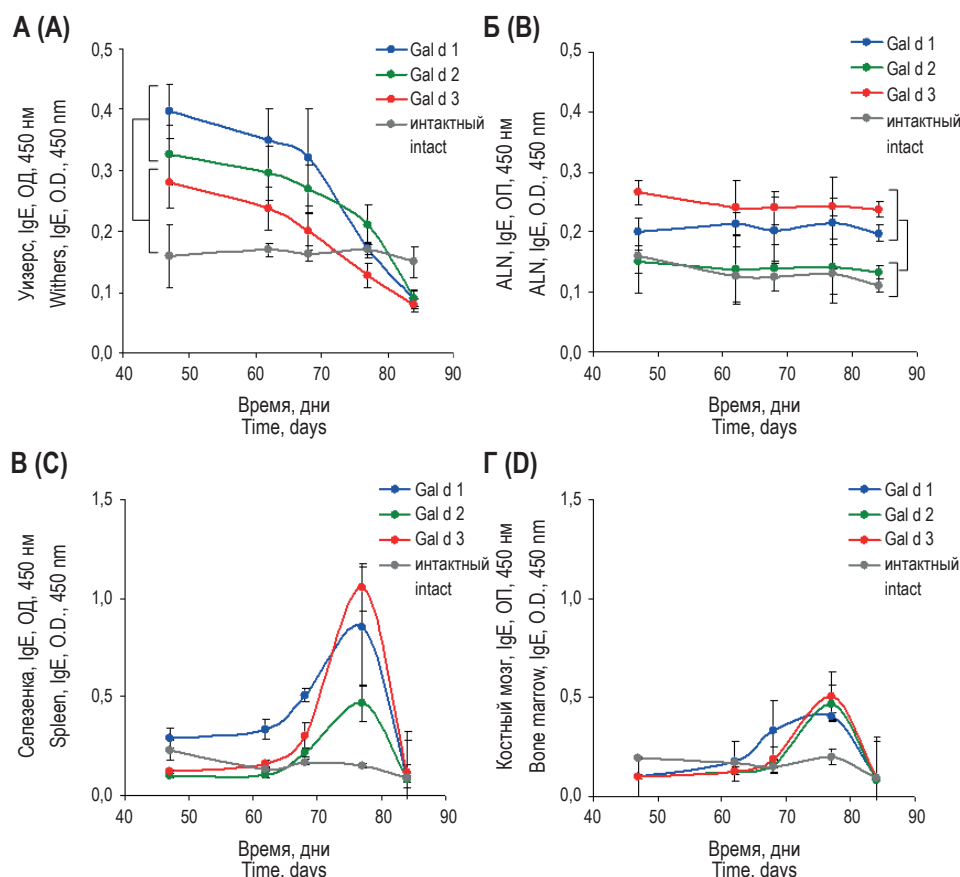


Рисунок 2. Трафик Gal-специфических IgE⁺B-клеток

Примечание. Клетки холки (А), подмышечных лимфатических узлов (АЛН, Б), селезенки (В) и костного мозга (Г) иммунных и intactных мышей стимулировали *in vitro* 50 мкг/мл ЛПС и инкубировали в течение 5 дней. IgE, специфические к Gal d 1, 2, 3, анализировали в динамике иммунного ответа. Скобками указаны достоверные отличия от intactного контроля (t-критерий, $p < 0,05$).

Figure 2. Traffic of Gal-specific IgE⁺B cells

Note. Cells of the withers (A), axillary lymph nodes (ALN, B), spleen (C) and bone marrow (D) of immune and intact mice were stimulated *in vitro* with 50 μ g/mL of LPS and incubated for 5 days. IgE specific to Gal d 1, 2, 3 were analyzed in the dynamics of the immune response. Significant differences from the intact control are indicated in parentheses (t-test, $p < 0.05$).

падения аллергенов. Наблюдается трафик Gal d-специфических IgE⁺B-клеток в селезенку, где в течение месяца происходит стимуляция этих клеток, при этом наблюдается максимальная продукция IgE уже к Gal d 3. Именно такое доминирование титров IgE (Gal d3 > Gal d1 > Gal d2) наблюдается и в крови на поздних сроках (рис. 1Г, рис. 2В).

Соответственно наблюдается двухфазный ответ. Во время сенсибилизации (30-40 дней) наблюдается локальное (в холке) переключение В-клеток на синтез IgE в ЭФФ с доминированием ответа в ряду Gal d1 ≈ Gal d2 > Gal d3 и миграция части В-клеток в селезенку (возможно, через ЛУ). После отмены сенсибилизации часть В-клеток в холке, по-видимому, погибает, а часть мигрирует в селезенку, где формируются ЭФФ. В селезенке в ЭФФ IgE⁺B-клетки пролиферируют. При этом меняется доминирование ответа как в НЖ, так и в крови (Gal d3 ≈ Gal d1 > Gal d2) с преимуществом уже Gal d3 специфических В-клеток. Продукция

IgE заканчивалась к 80-90-му дню, что соответствует времени жизни IgE⁺B-клеток второй фазы в 30 дней.

Закключение

Аллергией I типа страдает до 30% населения стран с высоким уровнем гигиены. Эволюционно IgE ответ формировался как протективный против многоклеточных паразитов. Механизмы формирования IgE антител до сих пор остаются спорными. Основной особенностью аллергического ответа является попадание на слизистые оболочки млекопитающих низких количеств чужеродных белков. Барьеры тела в норме эффективно защищают внутреннее пространство от окружающей среды. При генетической предрасположенности, вероятно, ассоциированной со структурой слизистых оболочек, аллергены в низком и очень низком количестве попадают в подслизистое пространство. В данной работе использована мо-

дель низкодозовой аллергии на мышах предрасположенной к формированию гуморального ответа линии BALB/c. Показали, что у мышей при длительном введении аллергенов в нанограммовых количествах и без адъювантов локально вместе введения формируются IgE и IgG к введенным белкам. После окончания сенсибилизации (например, окончание периода цветения или соблюдения элиминационной диеты) аллергический ответ затухает, но формируется ответ памяти, причем на один-два аллергена из пула белков, в нашей модели IgE ответ памяти формировался на высокомолекулярный белок Gal d 3. При повторной встрече с аллергеном иммунная реакция возобновляется. Нами ранее показано, что в сы-

воротках больных с аллергией практически нет IgG к этим белкам. Это позволяет предположить формирование самоподдерживающейся аллергической реакции с постепенным вовлечением других белков из-за локальной ниши, обогащенной цитокинами и хемокинами, способствующими активации В-клеток другой специфичности. Аллерген-специфическая терапия направлена на индукцию IgG ответа, что позволяет остановить цикл активации на конкретный аллерген.

Благодарности

Выражаем благодарность Анне Долговой (Санкт-Петербургский институт Пастера, Санкт-Петербург, Россия) за предоставленные аллергены.

Список литературы / References

1. Baba S., Kondo K., Toma-Hirano M., Kanaya K., Suzukawa K., Ushio M., Suzukawa M., Ohta K., Yamasoba T. Local increase in IgE and class switch recombination to IgE in nasal polyps in chronic rhinosinusitis. *Clin. Exp. Allergy*, 2014, Vol. 44, no. 5, pp. 701-712.
2. Blázquez A.B., Berin M.C. Gastrointestinal dendritic cells promote Th2 skewing via OX40L. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 7, pp. 4441-4450.
3. Caraballo L., Valenta R., Acevedo N., Zakzuk J. Are the terms major and minor allergens useful for precision allergology? *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 651500. doi: 10.3389/fimmu.2021.651500.
4. Chen Q., Xie M., Liu H., Dent A.L. Development of allergen-specific IgE in a food-allergy model requires precisely timed B cell stimulation and is inhibited by Fgl2. *Cell Rep.*, 2022, Vol. 39, no. 13, 110990. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110990.
5. Chinthrajah R.S., Hernandez J.D., Boyd S.D., Galli S.J., Nadeau K.C. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 137, no. 4, pp. 984-997.
6. Chu D.K., Llop-Guevara A., Walker T.D., Flader K., Goncharova S., Boudreau J.E., Moore C.L., Seunghyun I.T., Wasserman S., Coyle A.J., Kolbeck R., Humbles A.A., Jordana M. IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, no. 1, pp. 187-200.e1-8.
7. Feldman S., Kasjanski R., Poposki J., Hernandez D., Chen J.N., Norton J.E., Suh L., Carter R.G., Stevens W.W., Peters A.T., Kern R.C., Conley D.B., Tan B.K., Shintani-Smith S., Welch K.C., Grammer L.C., Harris K.E., Kato A., Schleimer R.P., Hulse K.E. Chronic airway inflammation provides a unique environment for B cell activation and antibody production. *Clin. Exp. Allergy*, 2017, Vol. 47, no. 4, pp. 457-466.
8. Gars E., Butzmann A., Ohgami R., Balakrishna J.P., O'Malley D.P. The life and death of the germinal center. *Ann. Diagn. Pathol.*, 2020, Vol. 44, 151421. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2019.151421.
9. Gevaert P., Nouri-Aria K.T., Wu H., Harper C.E., Takhar P., Fear D.J., Acke F., de Ruyck N., Banfield G., Kariyawasam H.H., Bachert C., Durham S.R., Gould H.J. Local receptor revision and class switching to IgE in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Allergy*, 2013, Vol. 68, no. 1, pp. 55-63.
10. Hochwallner H., Alm J., Lupinek C., Johansson C., Mie A., Scheynius A., Valenta R. Transmission of allergen-specific IgG and IgE from maternal blood into breast milk visualized with microarray technology. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 5, pp. 1213-1215.
11. Kuroda E., Ozasa K., Temizoz B., Ohata K., Koo C.X., Kanuma T., Kusakabe T., Kobari S., Horie M., Morimoto Y., Nakajima S., Kabashima K., Ziegler S.F., Iwakura Y., Ise W., Kurosaki T., Nagatake T., Kunisawa J., Takemura N., Uematsu S., Hayashi M., Aoshi T., Kobiyama K., Coban C., Ishii K.J. Inhaled fine particles induce alveolar macrophage death and interleukin-1 α release to promote inducible bronchus-associated lymphoid tissue formation. *Immunity*, 2016, Vol. 45, no. 6, 1299-1310.
12. Leonardi A., Borghesan F., Faggian D., Plebani M. Microarray-based IgE detection in tears of patients with vernal keratoconjunctivitis. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2015, Vol. 26, no. 7, pp. 641-645.
13. MacLennan I.C., Toellner K.M., Cunningham A.F., Serre K., Sze D.M., Zúñiga E., Cook M.C., Vinuesa C.G. Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.*, 2003, Vol. 194, pp. 8-18.
14. Manolova V., Flace A., Bauer M., Schwarz K., Saudan P., Bachmann M.F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 5, pp. 1404-1413.
15. Neeland M.R., Andorf S., Manohar M., Dunham D., Lyu S.C., Dang T.D., Peters R.L., Perrett K.P., Tang M.L.K., Saffery R., Koplin J.J., Nadeau K.C. Mass cytometry reveals cellular fingerprint associated with

IgE+ peanut tolerance and allergy in early life. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 1091. doi: 10.1038/s41467-020-14919-4.

16. Newman R., Tolar P. Chronic calcium signaling in IgE⁺ B cells limits plasma cell differentiation and survival. *Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 12, pp. 2756-2771.e10.

17. Pomés A., Davies J.M., Gadermaier G., Hilger C., Holzhauser T., Lidholm J., Lopata A.L., Mueller G.A., Nandy A., Radauer C., Chan S.K., Jappe U., Kleine-Tebbe J., Thomas W.R., Chapman M.D., van Hage M., van Ree R., Vieths S., Raulf M., Goodman R.E.; WHO IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Mol. Immunol.*, 2018, Vol. 100, pp. 3-13.

18. Saunders S.P., Ma E.G.M., Aranda C.J., Curotto de Lafaille M.A. Non-classical B cell memory of allergic IgE responses. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 715. doi: 10.3389/fimmu.2019.00715.

19. Shamji M.H., Valenta R., Jardetzky T., Verhasselt V., Durham S.R., Würtzen P.A., van Neerven R.J.J. The role of allergen-specific IgE, IgG and IgA in allergic disease. *Allergy*, 2021, Vol. 76, no. 12, pp. 3627-3641.

20. Svirshchevskaya E., Fattakhova G., Khlgtian S., Chudakov D., Kashirina E., Ryazantsev D., Kotsareva O., Zavriev S. Direct versus sequential immunoglobulin switch in allergy and antiviral responses. *Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 170, pp. 31-38.

21. Takeda K., Gelfand E.W. Mouse models of allergic diseases. *Curr. Opin. Immunol.*, 2009, Vol. 21, no. 6, pp. 660-665.

22. Thierry G.R., Kuka M., De Giovanni M., Mondor I., Brouilly N., Iannacone M., Bajénoff M. The conduit system exports locally secreted IgM from lymph nodes. *J. Exp. Med.*, 2018, Vol. 215, no. 12, pp. 2972-2983.

Авторы:

Фаттахова Г.В. — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Макарова А.О. — студентка бакалавриата ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; инженер-исследователь отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Коновалова М.В. — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Коцарева О.Д. — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Каширина Е.И. — к.б.н., младший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Окара П.С. — студентка бакалавриата ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Матушевская Е.В. — профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Свиричевская Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Fattakhova G.V., PhD, MD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Makarova A.O., Undergraduate Student, Lomonosov Moscow State University; Research Engineer of the Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Konovalova M.V., PhD, MD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kotsareva O.D., PhD, MD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kashirina E.I., PhD, MD (Biology), Junior Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Okara P.S., Undergraduate Student, Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, Russian Federation

Matushevskaya E.V., Professor, Department of Dermatovenereology and Cosmetology, Institute of Advanced Training, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Svirshchevskaya E.V., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 24.03.2024

Отправлена на доработку 25.03.2024

Принята к печати 26.03.2024

Received 24.03.2024

Revision received 25.03.2024

Accepted 26.03.2024

АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ И ОПЫТ ЛЕЧЕНИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА В МОНГОЛИИ

Бережанский П.В.¹, Тувшинбаяр Б.¹, Сангидорж Б.², Ускова Т.Р.¹,
Татаурщикова Н.С.¹

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

² Национальный дерматологический центр Монголии, г. Улан-Батор, Монголия

Резюме. Аллергические заболевания респираторного тракта (аллергический ринит и бронхиальная астма) являются ведущей патологией в терапевтической практике. Результаты мета-анализа в Восточноазиатском регионе показали, что общая распространенность бронхиальной астмы и аллергического ринита с бронхиальной астмой составила 10,17% и 38,97% соответственно. На территории Монголии произрастают 2883 вида растений, относящихся к 662 родам, 128 семействам. В связи с этим, учитывая климатогеографические особенности Монголии, сезон цветения и паллиаций является длительным, что сказывается на качестве жизни пациентов с аллергическими заболеваниями.

Цель исследования — проанализировать распространенность и заболеваемость аллергическим ринитом и бронхиальной астмой в Монголии и представить опыт лечения препаратом Антиполлин.

Исследование проведено в г. Улан-Батор, г. Дархан и г. Сухэ-Батор за 2019-2022 гг. На основании полученных данных были рассчитаны следующие статистические показатели: заболеваемость (кумулятивная инцидентность) на 1000 пациентов, распространенность (превалентность) для конкретных годовых показателей и возрастных групп.

Определена кумулятивная инцидентность аллергического ринита на IV квартал 2022 года составила от 28,9‰ до 43,92‰, кумулятивная инцидентность бронхиальной астмы составила от 20,16‰ до 37,2‰, в то время как в некоторых возрастных подгруппах данный показатель превышает 50‰. Установлено, что на 2022 год в г. Улан-Батор — 4,39% и 2,66%, в г. Дархан — 2,89% и 2,02%, в г. Сухэ-Батор — 2,91% и 3,72%, пациентов имели диагноз «аллергический ринит» и «бронхиальная астма» соответственно. В г. Улан-Батор и г. Дархан количество пациентов, состоящих на учете с аллергическим ринитом, в 1,5 раза выше, чем количество пациентов с бронхиальной астмой, но при этом в г. Сухэ-Батор отмечается противоположная тенденция.

Преvalентность в г. Сухэ-Батор по бронхиальной астме гораздо выше, чем в других городах, выше, чем по АР, и с взрослением населения данный показатель только увеличивается: группа 0-10 лет — преvalентность бронхиальной астмы — 12,72‰, что в 2 раза выше показателя в г. Дархане — 6,9‰ и в 1,5 раза выше, чем в г. Улан-Баторе — 8,1‰.

Адрес для переписки:

Бережанский Павел Вячеславович
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы»
143030, Россия, Московская обл.,
Одинцовский г. о., с. Успенское, 34, кв. 56.
Тел.: 8 (915) 145-50-13.
E-mail: p.berezhanskiy@mail.ru

Address for correspondence:

Pavel V. Berezhanskiy
P. Lumumba People's Friendship University of Russia
34 Uspesnkoe Village, Apt 56
Odintsovo District, Moscow Region
143030 Russian Federation
Phone: +7 (915) 145-50-13.
E-mail: p.berezhanskiy@mail.ru

Образец цитирования:

П.В. Бережанский, Б. Тувшинбаяр, Б. Сангидорж,
Т.Р. Ускова, Н.С. Татаурщикова «Анализ
распространенности и опыт лечения аллергических
заболеваний респираторного тракта в Монголии»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4.
С. 741-748. doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16870

© Бережанский П.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

P.V. Berezhansky, B. Tuvshinbayar, B. Sangidorzh,
T.R. Uskova, N.S. Tataurshchikova "Analysis of
the prevalence and experience of treatment of allergic diseases
of the respiratory tract in Mongolia", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4,
pp. 741-748.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16870

© Berezhansky P.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-AOT-16870

Учитывая климатогеографические, популяционные и эпидемиологические особенности Монголии, применение Антиполлина для проведения сублингвальной иммунотерапии является оптимальным решением, способным улучшить качество жизни тысяч пациентов, страдающих аллергическими заболеваниями респираторного тракта.

Ключевые слова: аллергический ринит, бронхиальная астма, факторы риска, заболеваемость, аллергические заболевания, аллерген-специфическая иммунотерапия

ANALYSIS OF THE PREVALENCE AND EXPERIENCE OF TREATMENT OF ALLERGIC DISEASES OF THE RESPIRATORY TRACT IN MONGOLIA

Berezhansky P.V.^a, Tuvshinbayar B.^a, Sangidorzh B.^b, Uskova T.R.^a, Tataurshchikova N.S.^a

^a P. Lumumba People's Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^b National Dermatology Center of Mongolia, Ulaanbaatar, Mongolia

Abstract. Allergic diseases of the respiratory tract (allergic rhinitis and bronchial asthma) are the leading pathology in therapeutic practice. The results of a meta-analysis in the East Asian region showed that the overall prevalence of bronchial asthma and allergic rhinitis with bronchial asthma was 10.17% and 38.97%, respectively. On the territory of Mongolia there are 2883 plant species belonging to 662 genera and 128 families. In this regard, given the climatic and geographical features of Mongolia, the flowering and pollination season is long, which affects the quality of life of patients with allergic diseases. The purpose of the study is to analyze the prevalence and incidence of allergic rhinitis and bronchial asthma in Mongolia and present the experience of treatment with Antipollin.

The study was conducted in Ulaanbaatar, Darkhan and Sukhbaatar for 2019-2022. Based on the data obtained, the following statistical indicators were calculated: incidence (cumulative incidence) per 1000 patients, prevalence (prevalence) for specific annual indicators and age groups.

The cumulative incidence of allergic rhinitis for the fourth quarter of 2022 was determined to be from 28.9‰ to 43.92‰, the cumulative incidence of bronchial asthma was from 20.16‰ to 37.2‰, while in some age subgroups this figure exceeds 50‰. Determined that for 2022 in Ulaanbaatar – 4.39% and 2.66%, in Darkhan – 2.89% and 2.02%, in Sukhbaatar – 2.91% and 3.72% of patients were diagnosed with allergic rhinitis and bronchial asthma, respectively. In the cities of Ulaanbaatar and Darkhan, the number of patients registered with allergic rhinitis is 1.5 times higher than the number of patients with bronchial asthma, but in the city of Sukhbaatar the opposite trend is observed. The prevalence of bronchial asthma in the city of Sukhbaatar is much higher than in other cities, higher than in the AR, and as the population ages, this indicator only increases in the group 0 – 10 years – the prevalence of bronchial asthma is 12.72‰, which 2 times higher than the figure in Darkhan – 6.9‰ and 1.5 times higher than in Ulaanbaatar – 8.1‰.

Taking into account the climatic, geographic, population and epidemiological characteristics of Mongolia, the use of Antipollin for sublingual immunotherapy is the optimal solution that can improve the quality of life of thousands of patients suffering from allergic diseases of the respiratory tract.

Keywords: allergic rhinitis, asthma, risk factors, morbidity, allergic diseases, allergen-specific immunotherapy

Введение

В настоящее время сохраняется тенденция к значительному росту аллергических заболеваний, особенно среди детей [2, 11]. Наибольшую распространенность и обращаемость в амбулаторной практике составляют пациенты с аллер-

гическим ринитом (АР) и бронхиальной астмой (БА) [14], что является глобальной проблемой здравоохранения и требует дальнейшего изучения региональных особенностей, разработки новых персонифицированных подходов к разным фенотип-ориентированным группам пациентов.

Неуклонный рост аллергических заболеваний, в том числе АР и БА в Монголии свидетельствует о реализации мировых тенденций роста аллергопатологии, что также подтверждается публикациями авторов Азиатско-Тихоокеанского региона. Результаты мета-анализа в Восточноазиатском регионе, показали, что общая распространенность БА и АР+БА составила 10,17% и 38,97% соответственно [13]. Распространенность БА среди всего населения в настоящее время оценивается в 20,9%, тогда как среди взрослого населения (18 лет и старше) она составляет 15,6% [12]. Эти значения намного выше, чем распространенность БА в предыдущем популяционном исследовании, проведенном в 2000-х годах в Монголии, когда были получены следующие показатели заболеваемости — г. Улан-Батор — 2,1%; сельские города — 2,4%; деревни — 1,1% населения [15]. В Монголии в настоящее время сезонный аллергический ринит занимает ведущее место среди аллергических заболеваний [5]. Одним из самых значимых аллергенов у пациентов с АР и БА в Монголии считается пыльца рода амброзии [9].

В соответствии с прогнозом экспертов ЕААСИ, тенденция к росту распространенности аллергических заболеваний, вызванных сенсибилизацией к аэроаллергенам, будет нарастать. Это связано с климатическими и социальными изменениями, что в свою очередь приведет к нарастанию аллергенного потенциала пылевых зерен, увеличению количества пыльцы и распространению ареалов пыления причинно-значимых растений [10].

Лечение и профилактика аллергических заболеваний основана, в первую очередь, на элиминации причинно-значимого аллергена, а также на медикаментозных методах воздействия, которые в основном направлены на устранение симптомов, а не на устранение причины заболевания. В связи с этим важным направлением, особенно у пациентов с пыльцевой сенсибилизацией, является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), которая направлена на изменение реакции иммунной системы на аллергены и формирование долгосрочной толерантности к ним [4].

На основании проведенного клинико-эпидемиологического анализа популяции в трех крупных городских центрах Монголии представлено обоснование применения АСИТ в различных возрастных группах препаратом Антиполлин (ТОО «Бурли», Казахстан), который представлен более чем 20 видами лечебных аллергенов.

На территории Монголии произрастают 2883 вида растений, относящихся к 662 родам, 128 семействам. Из них 203 вида (7,2% всего видового разнообразия страны) из 98 родов (14,8%) и 31 семейства (24,2%) могут вызвать аллергию. В связи

с этим, сезон цветения и палинации в Монголии, благодаря климатогеографическим особенностям, является более длительным, чем во многих других странах.

Учитывая вышеизложенное, очевидным является необходимость проведения широкомасштабных региональных исследований по заболеваемости и распространенности аллергических заболеваний. Комплексный анализ инцидентности и превалентности АР и БА на конкретных территориях за несколько лет позволит прогнозировать развитие заболевания и разработать персонализированные мероприятия по эффективной лечебно-профилактической работе [1].

Цель исследования — проанализировать распространенность и заболеваемость аллергическим ринитом и бронхиальной астмой в Монголии и представить опыт лечения препаратом Антиполлин.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе Национального центра Дерматологии Министерства здоровья и спорта Монголии г. Улан-Батора. Ретроспективное исследование было проведено за 2019-2022 гг. на основании статистических показателей работы медицинского учреждения, а именно количество прикрепленного к медицинскому учреждению населения на конец отчетного года, динамика численности населения с установленными диагнозами «АР» и «БА», а также половозрастной состав прикрепленного населения.

В работе проводился расчет показателей инцидентности (заболеваемости) и превалентности (распространенности) в ‰ для каждого года оценки каждого учреждения в отдельности. Учитывая большое количество статистических показателей в работе, проведены расчеты на IV квартал 2022 года.

Статистический и эпидемиологический анализ проводился посредством ReviewManager 5.3.5 и пакета компьютерных программ Stata/MP 14.0.

Результаты и обсуждение

На базах всех медицинских учреждений г. Улан-Батора, г. Дархан и г. Сухэ-Батора, включенных в анализ за 2019-2022 гг., отмечался естественный прирост населения. В таблице 1 и 2 представлены статистические данные об инцидентности и превалентности АР и БА к IV кварталу 2022 г.

Исходя из представленных данных, было установлено, что на 2022 год в г. Улан-Батор — 4,39% и 2,66%, в г. Дархан — 2,89% и 2,02%, в г. Сухэ-Батор — 2,91% и 3,72%, пациентов имели диагноз «АР» и «БА» соответственно. При оценке статистических данных за анализируемые пе-

ТАБЛИЦА 1. ДАННЫЕ ПОПУЛЯЦИОННЫХ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АР НА IV КВАРТАЛ 2022 ГОДА

TABLE 1. DATA ON POPULATION AND EPIDEMIOLOGICAL INDICATORS OF AR FOR THE FOURTH QUARTER OF 2022

Учреждение наблюдения Surveillance institution	Прикрепленное население Attached population	Динамика численности прикрепленного населения за последний год Dynamics of the attached population over the past year	Кумулятивная инцидентность Cumulative incidence	Превалентность Prevalence
г. Улан-Батор Ulaanbaatar	160897	+8459	531	7067
г. Дархан Darkhan	149124	+4684	487	4310
г. Сухэ-Батор Sukhbaatar city	101204	+7545	384	2946

ТАБЛИЦА 2. ДАННЫЕ ПОПУЛЯЦИОННЫХ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БА НА IV КВАРТАЛ 2022 ГОДА

TABLE 2. DATA ON POPULATION AND EPIDEMIOLOGICAL INDICATORS OF ASTHMA FOR THE FOURTH QUARTER OF 2022

Учреждение наблюдения Surveillance institution	Прикрепленное население Attached population	Динамика численности прикрепленного населения за последний год Dynamics of the attached population over the past year	Кумулятивная инцидентность Cumulative incidence	Превалентность Prevalence
г. Улан-Батор Ulaanbaatar	160897	+8459	408	4275
г. Дархан Darkhan	149124	+4684	364	3007
г. Сухэ-Батор Sukhbaatar city	101204	+7545	403	3765

риоды было выявлено, что распространенность ежегодно увеличивалась на всех изучаемых территориях на 0,3-0,8%, например, в г. Улан-Баторе в 2019 г. — 2,61% пациентов имели диагноз «АР» и 1,7% имели «БА», в 2020 г. — 3,02% и 1,96%, в 2021 г. — 3,87% и 2,34%, в 2021 г. — 4,04% и 2,54% соответственно. На всех территориях отмечается повышение доступности и качества специализированной аллергологической помощи в связи с формированием аллергологической службы регионов.

В г. Улан-Батор и г. Дархан количество пациентов, состоящих на учете с АР, в 1,5 раза выше, чем количество пациентов с БА, но при этом в г. Сухэ-Батор отмечается противоположная тенденция. Возможно, это связано со сложной маршрутизацией, удаленностью горных поселений и низкой кадровой укомплектованностью аллергологами-иммунологами поликлинических отделений.

Впервые установленный диагноз «АР» в 2022 году имели по 0,33% пациентов, проживаю-

щих в г. Улан-Батор и г. Дархан, а в г. Сухэ-Батора — 0,38% пациентов, а впервые верифицированную БА в 2022 году — 0,25% пациентов, проживающих в г. Улан-Батор, в г. Дархан — 0,24%, в г. Сухэ-Батора — 0,4% пациентов соответственно.

В ходе работы был проведен гендерно-возрастной анализ, полученные результаты представлены в таблице 3. Диагноз «АР» чаще верифицировался у лиц мужского пола — 8453 (59,02%) человек, женского пола — 5870 (40,98%) человек. Выявлено, что в группе пациентов до 18 лет АР чаще определялся у девочек, тогда как в более старшей возрастной группе он чаще встречается у лиц мужского пола. В то же время при БА отмечается обратная тенденция (табл. 4). Гендерный состав группы пациентов с БА имеет следующие характеристики: лица мужского пола — 5419 (49,05%) человек, лица женского пола — 5628 (50,95%) человек.

Кумулятивная инцидентность и превалентность АР и БА в целом является ниже, чем среднестатистические данные международных

исследований, что может быть связано с гиподиагностикой заболеваний и низкой доступностью врачей-специалистов.

Распространенность АР г. Улан-Батор на IV квартал 2022 года составляла 43,92‰, в г. Дархан — 28,9‰, в г. Сухэ-Батор — 29,11‰, а БА в г. Улан-Батор составляла 26,57‰, в г. Дархан — 20,16‰, в г. Сухэ-Батор — 37,2‰. Учитывая высокую гетерогенность популяции включенных в исследование было решено провести оценку основных эпидемиологических показателей в различных возрастных группах, что позволит более избирательно подойти к формированию лечебно-профилактических рекомендаций, что представлено в таблице 5.

Распространенность во многих возрастных группах выше средних показателей по региону, а также выявлено, что с взрослением населения увеличивается и инцидентность по АР и БА, что отражает низкую верификацию аллергических заболеваний в более раннем возрасте. Представленные данные позволяют сделать заключение о том, что верификация диагноза «АР» происходит в более старшем возрасте, а БА в большинстве случаев устанавливается в более ранних возрастах. На изучаемых территориях имеет место быть высокая настороженность врачей на выявление БА на более ранних сроках, что подтверждается статистическими показателями в таблице 5. При этом превалентность в г. Сухэ-Батор по БА гораздо выше, чем в других городах, и выше, чем

ТАБЛИЦА 3. ГЕНДЕРНЫЙ СОСТАВ ГРУППЫ С АР НА IV КВАРТАЛ 2022 ГОДА

TABLE 3. GENDER COMPOSITION OF THE GROUP WITH AR FOR THE FOURTH QUARTER OF 2022

Регион Region	Мужской пол Male	Женский пол Female	Всего Total
г. Улан-Батор Ulaanbaatar	3466	3601	7067
г. Дархан Darkhan	2891	1419	4310
г. Сухэ-Батор Sukhbaatar city	2096	850	2946

ТАБЛИЦА 4. ГЕНДЕРНЫЙ СОСТАВ ГРУППЫ С БА НА IV КВАРТАЛ 2022 ГОДА

TABLE 4. GENDER COMPOSITION OF THE GROUP WITH ASTHMA FOR THE FOURTH QUARTER OF 2022

Регион Region	Мужской пол Male	Женский пол Female	Итого Total
г. Улан-Батор Ulaanbaatar	1845	2430	4275
г. Дархан Darkhan	1737	1270	3007
г. Сухэ-Батор Sukhbaatar city	1837	1928	3765

ТАБЛИЦА 5. ПРЕВАЛЕНТНОСТЬ АР И БА НА ИЗУЧАЕМЫХ ТЕРРИТОРИЯХ В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ПОДГРУППАХ НА 1000 ПАЦИЕНТОВ, ‰ (АР/БА)

TABLE 5. PREVALENCE OF AR AND ASTHMA IN THE STUDY AREAS IN VARIOUS AGE SUBGROUPS PER 1000 PATIENTS, ‰ (AR/ASTHMA)

Регион Region	0-10 лет 0-10 years	11-18 лет 11-18 years	19-35 лет 19-35 years	36 и старше 36 and older
г. Улан-Батор Ulaanbaatar	13,93/8,10	43,95/21,20	47,82/31,41	69,98/45,57
г. Дархан Darkhan	8,6/6,9	24,12/16,12	24,30/23,08	58,58/34,54
г. Сухэ-Батор Sukhbaatar city	8,62/12,72	20,63/34,63	36,58/36,65	50,61/64,80

по АР, а с взрослением населения данный показатель только увеличивается: группа 0-10 лет — превалентность БА — 12,72‰, что в 2 раза выше показателя в г. Дархан — 6,9‰ и в 1,5 раза выше, чем в г. Улан-Батор — 8,1‰. Такие же тенденции сохраняются и по остальным возрастным группам. В г. Сухэ-Батор требуется дальнейшее изучение данного вопроса, с определением особенностей региона, факторов риска, доступности оказания медицинской помощи и, на основании полученных данных, разработать маршрутизацию пациентов на лечебно-профилактический этап оказания медицинской помощи. На других территориях следует уделить большее внимания верификации и профилактики реализации АР.

Как известно, более 70% пациентов с АР в будущем реализуют БА. Важным критерием в нашем исследовании была оценка показателя — процент перехода АР в БА. В ходе анализа было выявлено, что на IV квартал 2022 года (4 года наблюдений) кумулятивная инцидентность БА среди пациентов, реализовавших второй шаг «атопического марша — с АР на БА», составила в г. Улан-Батор — 0,32%, в г. Дархан — 0,38%, в г. Сухэ-Батор — 0,67% пациентов. Полученные результаты представлены на рисунке 1. Данные представлены в ‰.

Результаты анализа свидетельствуют о том, что в г. Сухэ-Батор отмечается высокая инцидентность БА во всех возрастных группах, при этом определяется и высокий показатель (выше,

чем в других регионах, в 2 раза) реализации БА на фоне АР, что может свидетельствовать о недостаточности профилактических мероприятий в данном регионе.

Одним из самых значимых аллергенов в Монголии, а в г. Сухэ-Батор особенно, считается род Полынь *Artemisia* из семейства Астровых *Asteraceae*. Род полынь (полынь Сиверса *Artemisia siversiana* и полынь крупноголовчатая *A. macrocephala*), а также растения семейства Маревых (*Chenopodiaceae*), как источник аллергенной пыльцы играет ведущую роль в возникновении аллергических заболеваний респираторного тракта в Монголии.

Многие из этих видов имеют широкое распространение, встречаются в населенных пунктах и их распространенность прямо коррелирует с превалентностью БА и АР в данных регионах, что отражено в анализе в таблице 5. Перспективным методом терапии с высоким профилем безопасности у пациентов с аэросенсибилизацией является АСИТ. Было доказано, что сублингвальная иммунотерапия (СЛИТ) эффективна в снижении аллергических симптомов и улучшении качества жизни пациентов. Препаратом выбора с широким терапевтическим профилем, учитывая разнообразие пыльцевых аллергенов в Монголии, является Антиполлин для проведения сублингвальной иммунотерапии [6].

В настоящее время накоплен значительный объем клинических данных, свидетельствующих

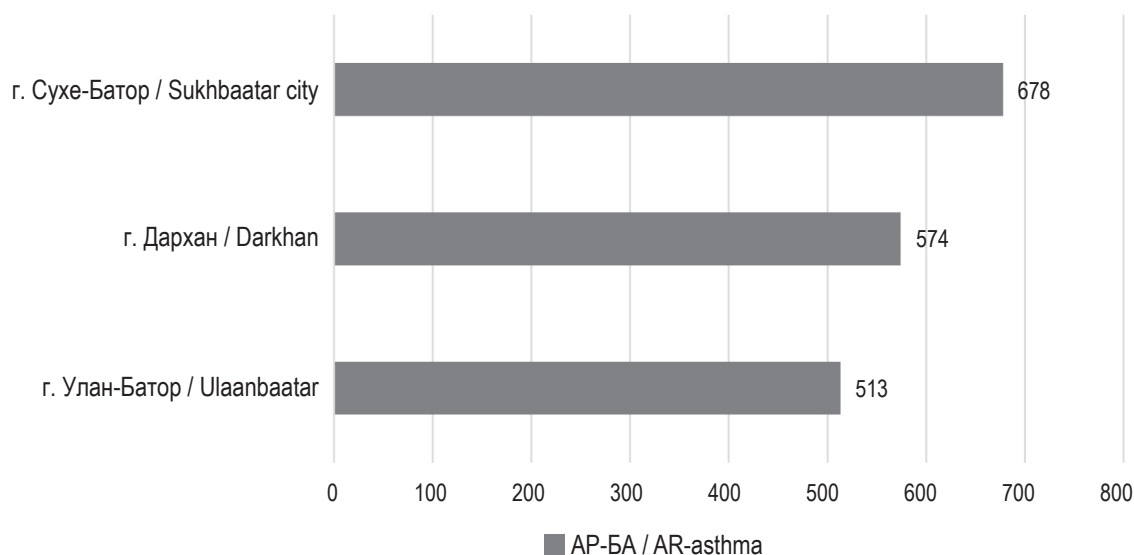


Рисунок 1. Относительное количество пациентов с верифицированным диагнозом «АР», реализовавшие БА за 2019-2022 гг. на изучаемых территориях, количество

Figure 1. Relative number of patients with a verified diagnosis of AR who developed asthma in 2019-2022 in the study areas, quantity

о высоком профиле эффективности и безопасности Антиполлина для проведения СЛИТ [3].

В доступных исследованиях сравнивалась эффективность различных сочетаний СЛИТ с препаратом Антиполлина в качестве основы для контроля обострений и снижения превалентности на территории Монголии. Результаты данного и других исследований продемонстрировали значительное улучшение состояния пациентов и их качества жизни в группах наблюдения [7].

В другом исследовании предоставлены данные об эффективности и целесообразности применения Антиполлина у пациентов с аллергическими заболеваниями респираторного тракта. Антиполлин продемонстрировал преимущества в отношении стандартизации, цены и градиента дозирования антигена (от 0,0001 PNU в начале курса до 1000 PNU по завершении) на территории Монголии [8].

Выводы

Анализ инцидентности и превалентности АР и БА рекомендован Всемирной организацией здравоохранения для формирования лечебно-профи-

лактических мероприятий на конкретной территории. В нашем исследовании во всей Монголии кумулятивная инцидентность АР составила от 28,9‰ до 43,92‰, кумулятивная инцидентность БА составила от 20,16‰ до 37,2‰ в то время как в некоторых возрастных подгруппах данный показатель превышает 50‰. Выявленные различия между показателями на исследуемых базах позволяют судить о возможно существовании климатогеографических особенностей и разных организационно-профилактических подходов при формировании аллергологической помощи на конкретных территориях. Представленный анализ может служить основой для формирования новых лечебно-профилактических программ. Возможно, требуется провести более широкий анализ с включением всей популяции населения проживающих в Монголии.

Учитывая климатогеографические, популяционные и эпидемиологические особенности Монголии, применение Антиполлина для проведения АСИТ является оптимальным решением, способным улучшить качество жизни пациентов, страдающих аллергическими заболеваниями респираторного тракта.

Список литературы / References

1. Бережанский П.В. Выявление факторов риска аллергического ринита у детей разного возраста, проживающих в центральном федеральном округе // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки, 2022. № 10. С. 167-182. [Berezhansky P.V. Identification of risk factors for the occurrence of rhinitis in children of different ages living in the Central Federal District. *Sovremennaya nauka: aktualnyye problemy teorii i praktiki. Seriya: Yestestvennyye i tekhnicheskiye nauki = Modern Science: Current Problems of Theory and Practice. Series: Natural and Technical Sciences*, 2022, no. 10, pp. 167-182. (In Russ.)]
2. Буйнова С.Н., Черняк Б.А. Динамика распространенности аллергического ринита у детей г. Иркутска // Российский аллергологический журнал, 2019. Т. 16, № 1S. С. 42-44. [Buinova S.N., Chernyak B.A. Dynamics of the prevalence of allergic rhinitis in children of Irkutsk. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2019, Vol. 16, no. 1S, pp. 42-44. (In Russ.)]
3. Жукова Н.В., Килесса В.В., Костюкова Е.А., Шкадова М.Г. Аллерген-специфическая иммунотерапия // Крымский терапевтический журнал, 2021. № 3. С. 11-16. [Zhukova N.V., Kilessa V.V., Kostyukova E.A., Shkadova M.G. Allergen-specific immunotherapy. *Krymskiy terapevticheskiy zhurnal = Crimean Therapeutic Journal*, 2021, no. 3, pp. 11-16. (In Russ.)]
4. Козулина И.Е., Павлова К.С., Курбачева О.М., Клиническая эффективность подкожной и сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии аллергического ринита и конъюнктивита // Российский аллергологический журнал, 2016. № 6. С.62-68. [Kozulina I.E., Pavlova K.S., Kurbacheva O.M. Clinical effectiveness of subcutaneous and sublingual allergen-specific immunotherapy for allergic rhinitis and conjunctivitis. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2016, no. 6, pp. 62-68. (In Russ.)]
5. Крылова Т.А., Завалий М.А., Балабанцев А.Г. Дифференциальная диагностика аллергического и неаллергического хронического ринита // Практическая медицина, 2015. № 2 (87). С. 13-18. [Krylova T.A., Zavaliy M.A., Balabantsev A.G. Differential diagnosis of allergic and non-allergic chronic rhinitis. *Prakticheskaya meditsina = Journal of Practical Medicine*, 2015, no. 2 (87), pp. 13-18. (In Russ.)]
6. Татаурщикова Н.С., Максимова А.В. Аллерген-специфическая иммунотерапия: поиск эффективных решений // Эффективная фармакотерапия, 2023. № 19 (26). С. 34-42. [Tataurshchikova N.S., Maksimova A.V. Allergen-specific immunotherapy: search for effective solutions. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2023, no. 19 (26), pp. 34-42. (In Russ.)]
7. Татаурщикова Н.С., Сангидорж Б. Локальная иммунотерапия в лечении пациентов с вирус-ассоциированным аллергическим ринитом // Вестник оториноларингологии, 2017. № 6 (82). С. 60-62. [Tataurshchikova N.S., Sangidorzh B. The role of local immunotherapy in the treatment of the patients presenting

with virus-associated allergic rhinitis. *Vestnik otorinolaringologii = Russian Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2017, no. 6 (82), pp. 60-62. (In Russ.)]

8. Татаурщикова Н.С. Особенности применения таблетированной СЛИТ препаратом Антиполлинулиц с респираторной аллергией // Аллергология и иммунология, 2014. № 15 (3). С. 177-180. [Tataurshchikova N.S. Features of the use of tableted Antipollin tablets in people with respiratory allergies. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2014. № 15 (3), pp. 177-180. (In Russ.)]

9. Терехина Т.А. Карантинные сорные растения Южной Сибири // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. XIV Международная научно-практическая конференция. Барнаул, 2015. С. 41-46. [Terekhina T.A. Quarantine weeds of the South Siberia. Problems of botany in the South Siberia and Mongolia. XIV International Scientific and Practical Conference. Barnaul, 2015, pp. 41-46. (In Russ.)]

10. Calderon M.A., Demoly P., van Wijk R.G., Bousquet J., Sheikh A., Frew A., Scadding G., Bachert C., Mallon H.J., Valenta R., Bilo B., Nieto A., Akdis C., Just J., Vidal C., Varga E.M., Alvarez-Cuesta E., Bohle B., Bufe A., Canonica W.G., Cardona V., Dahl R., Didier A., Durham S.R., Eng P., Fernandez-Rivas M., Jacobsen L., Jutel M., Kleine-Tebbe J., Klimek L., Lötvald J., Moreno C., Mosges R., Muraro A., Niggemann B., Pajno G., Passalacqua G., Pfaar O., Rak S., Senna G., Senti G., Valovirta E., van Hage M., Virchow J.C., Wahn U., Papadopoulos N. EAACI: A European Declaration on immunotherapy. Designing the future of allergen specific immunotherapy. *Clin. Transl. Allergy*, 2012, Vol. 2, no. 1, 20. doi: 10.1186/2045-7022-2-20.

11. Luo Z., Akdis F. The past, present, and future of allergic diseases in China. *Allergy*, 2022, Vol. 77, no. 2, pp. 354-356.

12. Penagos M., Compalati E., Tarantini F., Baena-Cagnani R., Huerta J., Passalacqua G., Walter G. Canonica Efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis in pediatric patients 3 to 18 years of age: a meta – analysis of randomized, placebo – controlled, double – blind trials. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2006, Vol. 97, no. 2, pp. 141-148.

13. Shen Y., Zeng J., Hong S., Kang H. Prevalence of allergic rhinitis comorbidity with asthma and asthma with allergic rhinitis in China: A meta-analysis. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 2019, Vol. 37, no. 4, pp. 220-225.

14. Tataurshchikova N.S., Berezhansky P.V. Some features of the key phenotypes of allergic rhinitis among children in a metropolis. In book: Advanced Technologies for Sustainable Development of Urban Green Infrastructure, 2021, pp. 202-208.

15. Viinanen A., Munhbayarlah S., Zevgee T., Narantsetseg L., Naidansuren Ts., Koskenvuo M., Helenius H., Terho E.O. Prevalence of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and allergic sensitization in Mongolia. *Allergy*, 2005, Vol. 60, no. 11, pp. 1370-1377.

Авторы:

Бережанский П.В. — к.м.н., ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Тувшинбаяр Б. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Сангидорж Б. — к.м.н., заведующая лабораторией аллергологии Национального дерматологического центра Монголии, г. Улан-Батор, Монголия

Ускова Т.Р. — лаборант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Татаурщикова Н.С. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Authors:

Berezhansky P.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, P. Lumumba People's Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Tuvshinbayar B., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, P. Lumumba People's Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Sangidorzh B., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Allergology, National Dermatology Center of Mongolia, Ulaanbaatar, Mongolia

Uskova T.R., Laboratory Assistant, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, P. Lumumba People's Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Tataurshchikova N.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, P. Lumumba People's Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 01.04.2024

Отправлена на доработку 03.04.2024

Принята к печати 04.04.2024

Received 01.04.2024

Revision received 03.04.2024

Accepted 04.04.2024

РОЛЬ CD20⁺T-ЛИМФОЦИТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Глебездина Н.С.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал
ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»,
г. Пермь, Россия*

Резюме. CD3⁺CD20⁺T-лимфоциты представляют собой популяцию клеток, которая наряду со стандартными T-клеточными маркерами экспрессирует нетипичную мембранную молекулу CD20 (традиционный B-клеточный маркер). Эти клетки идентифицированы не так давно и в настоящий момент активно изучаются. В норме они составляют до 3-5% компартмента CD3⁺T-клеток в периферической крови человека, а также обнаружены в первичных и вторичных лимфоидных органах, в спинномозговой жидкости, тканях головного мозга и печени. У здоровых людей CD3⁺CD20⁺T-клетки гетерогенны и содержат меньшую долю CD4⁺ клеток, но продуцируют более высокие уровни GM-CSF, IFN γ , IL-17, TNF α , IL-4, IL-10, молекул адгезии и хемокиновых рецепторов, чем CD3⁺CD20⁻T-клетки, что указывает на высокоактивированный провоспалительный фенотип со свойствами, потенциально способствующими их патогенной инфильтрации в ЦНС. Недавними исследованиями установлено патогенное поведение CD3⁺CD20⁺T-клеток при широком спектре заболеваний, включая гематологические и негематологические CD20⁺T-клеточные злокачественные новообразования и ВИЧ, а также аутоиммунные патологии, в частности рассеянный склероз — инвалидизирующее воспалительное нейродегенеративное заболевание, которое сопровождается поражением миелиновой оболочки нервных волокон. CD20-позитивные T-клетки выявляются у больных рассеянным склерозом в периферической крови, спинномозговой жидкости (встречаются с частотой, сходной с частотой B-клеток, и демонстрируют корреляцию с тяжестью заболевания) и белом веществе головного мозга. Показано, что CD20-позитивные T-лимфоциты в периферической крови пациентов с рассеянным склерозом продуцируют высокие уровни IFN γ и IL-17A, которые являются двумя провоспалительными цитокинами, участвующими в патогенезе этого заболевания. Возможно, что CD20⁺T-клетки представляют собой отдельную субпопуляцию клеток Th17, так называемых Th1-поляризованных Th17, которые являются продуктом редифференцировки клеток Th17 в Th1 и сочетают фенотипические характеристики обеих популяций. И экспрессия CD20 может являться потенциальным маркером, определяющим целевую

Адрес для переписки:

Глебездина Наталья Сергеевна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-84-31.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: glebezдина_n@mail.ru

Address for correspondence:

Natalia S. Glebezдина
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-84-31.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: glebezдина_n@mail.ru

Образец цитирования:

Н.С. Глебездина «Роль CD20⁺T-лимфоцитов в патогенезе рассеянного склероза» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 749-754.
doi: 10.15789/1563-0625-ROC-16676

© Глебездина Н.С., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.S. Glebezдина "Role of CD20⁺T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 749-754.
doi: 10.15789/1563-0625-ROC-16676

© Glebezдина N.S., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-ROC-16676

субпопуляцию таких патогенных Т-клеток, а также служить мишенью для терапии аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: $CD20^+$ Т-лимфоциты, Th1, Th17, Th1-поляризованные Th17, $IFN\gamma$, IL-17A, аутоиммунные заболевания, рассеянный склероз

ROLE OF $CD20^+$ T LYMPHOCYTES IN THE PATHOGENESIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

Glebezdina N.S.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. $CD3^+CD20^+$ T lymphocytes are a population of T cells that, along with standard T cell markers, express the atypical membrane molecule CD20 (a traditional B cell marker). These cells were identified not so long ago and are currently being actively studied. Normally, they constitute up to 3-5% of the $CD3^+$ T cell compartment in human peripheral blood, and are also found in primary and secondary lymphoid organs, cerebrospinal fluid, brain tissue and liver. In healthy individuals, $CD3^+CD20^+$ T cells are heterogeneous and contain a lower proportion of $CD4^+$ cells, but produce higher levels of GM-CSF, $IFN\gamma$, IL-17, TNF α , IL-4, IL-10, adhesion molecules and chemokine receptors than $CD3^+CD20^-$ T cells, indicating a highly activated proinflammatory phenotype with properties potentially promoting their pathogenic infiltration into the CNS. Recent studies have established the pathogenic behavior of $CD3^+CD20^+$ T cells in a wide range of diseases, including hematological and non-hematological $CD20^+$ T cell malignancies and HIV, as well as autoimmune pathologies, in particular multiple sclerosis, a disabling inflammatory neurodegenerative disease that is accompanied by damage to the myelin sheath nerve fibers. CD20 positive T cells are detected in patients with multiple sclerosis in the peripheral blood, cerebrospinal fluid (occur at a frequency similar to that of B cells and show a correlation with disease severity) and white matter of the brain. CD20 positive T lymphocytes in the peripheral blood of patients with multiple sclerosis have been shown to produce high levels of $IFN\gamma$ and IL-17A, which are two proinflammatory cytokines involved in the pathogenesis of this disease. It is possible that $CD20^+$ T cells represent a separate subpopulation of Th17 cells, the so-called Th1-polarized Th17, which are the product of redifferentiation of Th17 cells into Th1 and combine the phenotypic characteristics of both populations. And the expression of CD20 T cells may be a valuable marker that determines the target subpopulation of such pathogenic T cells, as well as serve as a target for therapy of autoimmune diseases.

Keywords: $CD20^+$ T lymphocytes, Th1, Th17, Th1-polarized Th17, $IFN\gamma$, IL-17A, autoimmune diseases, multiple sclerosis

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 124020500027-7.

Введение

Рассеянный склероз (РС) — хроническое аутоиммунное заболевание нервной системы, при котором поражается миелиновая оболочка проводников головного и спинного мозга [12]. В развитие РС, наряду с В-клетками, вовлече-

ны различные подтипы Т-клеток, в первую очередь — Т-хелперы 1-го типа (Th1) и Т-хелперы 17 типа (Th17), продуцирующие $IFN\gamma$ и IL-17 соответственно и опосредующие воспаление, повреждение нервов и возникновение иммунных инфильтратов в головном мозге [6, 7]. Уровень IL-17 в крови у пациентов с РС повышен и коррелирует с тяжестью заболевания [7]. Активно велись исследования по использованию моноклональных антител к IL-17A в лечении рецидивирующе-ремиттирующей формы РС [6]. Th17-

опосредованное воспаление характеризуется рекрутированием нейтрофилов в ЦНС и гибелью нейронов [7]. Однако работы последних лет показывают, что патогенным потенциалом обладает не вся популяция Th17, а Th1-поляризованные Th17 — продукты редифференцировки клеток Th17 в Th1, появление которых обусловлено высокой пластичностью Th17-клеток [3, 7]. Благодаря такой трансформации Th1-поляризованные Th17 сочетают фенотипические характеристики обеих популяций [1, 3]. Эти клетки выявляют и у здоровых доноров, но интерес к данной популяции обусловлен в первую очередь присутствием (и существенным превалированием — до 60%) их в очагах воспаления при рассеянном склерозе, саркоидозе, ревматоидном артрите, воспалительном заболевании кишечника, причем доказан их вклад в развитие данных патологий [1, 11]. Роль этих клеток в патогенезе аутоиммунных заболеваний и их уникальные свойства пока изучены недостаточно. Потенциальным маркером таких популяций может служить CD20 на Т-лимфоцитах, поскольку не так давно обнаруженная популяция CD3⁺CD20⁺Т-клеток также продуцирует высокие уровни IFN γ и/или IL-17A [13], проявляя патогенное поведение, особенно при аутоиммунных заболеваниях, в частности при РС [8, 9, 10]. В связи с этим, целью настоящей работы было оценить роль субпопуляции CD20-позитивных Т-лимфоцитов при РС.

Материалы и методы

Поиск литературы о CD20⁺Т-клетках, их взаимосвязи с аутоиммунными заболеваниями, в том числе с РС, проводился в базе данных PubMed с использованием соответствующих ключевых слов, без ограничения по языку и дате публикации.

Результаты и обсуждение

CD3⁺CD20⁺Т-клетки — популяция CD3⁺Т-клеток, коэкспрессирующих маркер В-клеток CD20 [2, 9, 14]. Т-клеточное происхождение CD20-позитивных Т-клеток неоднократно было продемонстрировано с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени путем обнаружения мРНК, кодирующей CD20, в этой популяции клеток, но не в CD20⁻ Т-клетках [13, 14]. CD20-позитивные Т-лимфоциты характеризуются отсутствием других типичных для В-клеток молекул, таких как CD19, CD40, IgD и IgM, но в то же время экс-

прессируют высокие уровни $\alpha\beta$ Т-клеточного рецептора, рецептора IL-7, CD28, CD27, CD49d, низкие уровни $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора, CCR7, CD38 и CD69 [4, 13, 14, 15]. Также они несут другие маркеры Т-клеток, такие как CD2, CD5, CD4 или CD8 [8, 9]. CD20⁺Т-клетки человека могут быть как HLA-DR-положительными, так и отрицательными и могут экспрессировать либо CD45RA, либо CD45RO [8], что указывает на различную роль этих клеток. Однако преимущественно CD3⁺CD20⁺Т-клетки обладают фенотипическими особенностями клеток памяти и могут секретировать большое количество цитотоксических гранул, таких как перфорин и гранзим, поскольку содержат больше CD8⁺ клеток (~ 60-70%), чем CD3⁺CD20⁻Т-клетки [4].

У здоровых людей CD3⁺CD20⁺Т-клетки составляют от 1% до 6% Т-клеточного компартмента в периферической крови и являются гетерогенными, поскольку содержат меньшую долю CD4⁺клеток, но продуцируют более высокие уровни IFN γ и/или IL-17A, чем CD3⁺CD20⁻Т-клетки [8]. Данная субпопуляция может быть обнаружена в тимусе, костном мозге, вторичных лимфоидных органах, спинномозговой жидкости (СМЖ), даже при отсутствии воспаления, тканях головного мозга и печени [5, 13, 15].

Происхождение CD3⁺CD20⁺Т-клеток у человека является спорным, и онтогенез этих клеток все еще устанавливается. Существуют следующие предположения по этому вопросу. Установлено, что экспрессия белка CD20 отсутствует на Т-клетках пуповинной крови человека, а появление CD3⁺CD20⁺Т-клеток в крови на более поздних стадиях развития может быть обусловлено трогицитозом — быстрым межклеточным переносом фрагментов мембраны и связанных с ними внутри- и трансмембранных белков во время межклеточного контакта [4]. У мышей CD20⁺Т-клетки появляются в селезенке только после 2-й недели жизни [9]. У людей Т-клетки, экспрессирующие CD20, обнаруживаются в тимусе младенцев младше 3 месяцев [13, 14]. В своих работах de Vries и соавт. (2015), а также Ochs и соавт. (2022) показали увеличение экспрессии CD20 на Т-клетках при совместном культивировании линий Т- и В-клеток, причем для переноса CD20 в Т-клетки был необходим именно прямой контакт с В-клетками [4, 9]. *In vitro* Т-клетки могут приобретать CD20 от В-клеток в течение нескольких минут [4]. Однако неясно, почему Т-клетки селективны только в отношении CD20,

а не каких-либо других поверхностных маркеров В-клеток [9]. В любом случае, вероятно, взаимодействие В- и Т-клеток приводит к презентации антигена, последующей активации Т-клеток и дифференцировке на субпопуляции клеток памяти и эффекторов [8].

Также существует мнение, что повышенная экспрессия CD20 на CD3⁺Т-клетках может происходить из-за клональной экспансии самих CD3⁺CD20⁺Т-клеток, в том числе при неопластических CD20⁺Т-клеточных злокачественных новообразованиях, которые представляют собой неопластическую трансформацию нормальной субпопуляции CD20⁺Т-клеток, а не aberrantную экспрессию антигена [2, 9]. Показано, что при культивировании очищенных Т-клеток с митогеном и IL-2, доля CD20⁺Т-клеток значительно увеличивалась. После стимуляции CD3⁺CD20⁺Т-клетки продуцируют высокие уровни цитокинов (IL-17, IFN γ и TNF α), которые способствуют патогенезу аутоиммунных заболеваний [2].

Предполагается, что CD20 функционирует как часть комплекса, который формирует или контролирует поступление кальция в клетки. Приток внеклеточного Ca²⁺ в Т-клетки обеспечивает запуск кальций-зависимых процессов, таких как активация клеток, пролиферация, апоптоз и NFAT/NF κ B-индуцированная продукция цитокинов IFN γ и TNF α . Именно этот иммунологический профиль CD20⁺Т-клеток (увеличение притока Ca²⁺, повышенная восприимчивость к апоптозу за счет более высокой экспрессии CD95 (Fas/APO-1), увеличение продукции IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, CCL2, TGF- β и TNF α по сравнению с CD20⁻Т-клетками) определяет центральную роль CD20⁺Т-клеток в воспалении тканей [4, 13, 14, 15]. О чем и свидетельствуют многие исследования, выявившие патогенное поведение CD3⁺CD20⁺Т-клеток при широком спектре заболеваний, включая гематологические и негематологические злокачественные новообразования и ВИЧ, а также аутоиммунные патологии [2, 4, 8, 15].

Особенно отчетливый провоспалительный фенотип с патогенными свойствами CD20⁺Т-клеток проявляется у пациентов с рассеянным склерозом [10]. Исследования выявляют наличие этих клеток в периферической крови (особенно у пациентов с первично-прогрессирующим РС и ремиттирующим РС), СМЖ (встречаются с частотой, сходной с частотой В-клеток) и белом веществе головного мозга больных РС [14].

CD20⁺Т-клетки демонстрируют большую миграцию в СМЖ, чем CD20⁻Т-клетки, где их количество коррелирует с тяжестью заболевания [5]. В периферической крови больных РС отмечается повышенное процентное содержание как CD4⁺, так и CD8⁺CD20⁺Т-клеток (примерно 5-15%), продуцирующих высокие уровни IFN γ и IL-17, проявляя сходную цитокиновую характеристику с лимфоцитами Th1/Th17, и способствующих тем самым невропатологии, по сравнению со здоровыми донорами [13, 14]. Также значительно более высокая доля CD20⁺Т-клеток в периферической крови демонстрировала экспрессию хемокиновых рецепторов и молекул адгезии, таких как CCR2, CCR6, CXCR3, CXCR6, CCR5 [5]. Разнообразие цитокинов указывает на большой воспалительный и иммуномодулирующий функционал этих клеток [8].

CD8⁺CD20⁺Т-клетки отличаются от CD4⁺CD20⁺Т-клеток более высокой долей пролиферирующих клеток, меньшим процентом клеток, склонных к апоптозу, большей долей клеток, продуцирующих IFN γ , а также разницей в экспрессии хемокиновых рецепторов [14]. CD4⁺CD20⁺ же Т-клетки демонстрируют большую продукцию IL-17 [10]. Однако функциональные различия между этими двумя популяциями клеток детально не исследованы. Кроме того, неясно, программируются ли IL-17-секретирующие CD20⁺Т-клетки классическим фактором транскрипции Th17-клеток – RORC [10]. Лишь около четверти Т-клеток, секретирующих IL-17, экспрессируют CD20, что делает их субпопуляцией, которая, вероятно, перекрывается с классическими клетками Th17. Каким образом эти CD20⁺IL-17⁺ клетки фенотипически и функционально отличаются от CD20⁺IL-17⁻ секретирующих Т-клеток, неясно, и пока нет опубликованных исследований, способных ответить на этот вопрос. Возможно, CD3⁺CD20⁺Т-клетки представляют собой продукт трансформации популяции Th17. Речь может идти о Th1-поляризованных Th17 – результате редифференцировки клеток Th17 в Th1, появление которых обусловлено высокой пластичностью и гетерогенностью Th17-клеток [1, 3]. Th1-поляризованные Th17 сочетают фенотипические характеристики обеих популяций, обладают высоким провоспалительным потенциалом, а также уникальной способностью преодолевать гистогематические барьеры [1, 3]. Допустимо предположить, что маркером таких популяций и

может служить CD20 на Т-лимфоцитах, поскольку CD3⁺CD20⁺Т-клетки также продуцируют высокие уровни IFN γ и/или IL-17A [13]. Тем более что CD20 является мишенью для истощения не только CD20-положительных В-лимфоцитов, но и CD20⁺Т-клеток [5, 10].

Заключение

Таким образом, CD20⁺Т-клетки представляют собой небольшую высокоактивированную субпопуляцию со значительно усиленной продукцией цитокинов даже в состоянии покоя, де-

монстрируют богатое разнообразие хемокиновых рецепторов, помогающих CD20⁺Т-клеткам достигать органов-мишеней, и играют значительную роль в провоспалительных процессах [5]. Дальнейшая характеристика поверхностных и функциональных маркеров субпопуляции CD3⁺CD20⁺Т-клеток может быть полезной для разработки новых терапевтических стратегий, главным образом для пациентов с прогрессирующим рассеянным склерозом, а также для оценки патофизиологических эффектов высокоэффективной анти-CD20-терапии.

Список литературы / References

1. Куклина Е.М., Глебездина Н.С. Маркеры Th1-поляризованных клеток Th17 (обзор литературы) // *Acta Biomedica Scientifica*, 2023. Т. 8, № 3. С. 55-62. [Kuklina E.M., Glebezdina N.S. Markers of Th1 polarized Th17 cells (literature review). *Acta Biomedica Scientifica = Acta Biomedica Scientifica*, 2023, Vol. 8, no. 3, pp. 55-62.]
2. Chen Q., Yuan S., Sun H., Peng L. CD3(+)CD20(+) T cells and their roles in human diseases. *Hum. Immunol.*, 2019, Vol. 80, no. 3, pp. 191-194.
3. Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 8, pp. 989-998.
4. de Bruyn M., Wiersma V.R., Wouters M.C.A., Samplonius D.F., Klip H.G., Helfrich W., Nijman H.W., Eggleton P., Bremer E. CD20⁺ T cells have a predominantly Tc1 effector memory phenotype and are expanded in the ascites of patients with ovarian cancer. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 4, no. 4, e999536. doi: 10.1080/2162402X.2014.999536.
5. Gingele S., Skripuletz T., Jacobs R. Role of CD20⁺ T cells in multiple sclerosis: implications for treatment with ocrelizumab. *Neural. Regen. Res.*, 2020, Vol. 15, no. 4, pp. 663-664.
6. Havrdova E., Belova A., Goloborodko A., Tisserant A., Wright A., Wallstroem E., Garren H., Maguire R.P., Johns D.R. Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. *J. Neurol.*, 2016, Vol. 263, no. 7, pp. 1287-1295.
7. Jadidi-Niaragh F., Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand. J. Immunol.*, 2011, Vol. 74, no. 1, pp. 1-13.
8. Lee A.Y.S. CD20⁺ T cells: an emerging T cell subset in human pathology. *Inflamm. Res.*, 2022, Vol. 71, no. 10-11, pp. 1181-1189.
9. Ochs J., Nissimov N., Torke S., Freier M., Grondey K., Koch J., Klein M., Feldmann L., Gudd C., Bopp T., Häusser-Kinzel S., Weber M.S. Proinflammatory CD20⁺ T cells contribute to CNS-directed autoimmunity. *Sci. Transl. Med.*, 2022, Vol. 14, no. 638, eabi4632. doi: 10.1126/scitranslmed.abi4632.
10. Quendt C., Ochs J., Häusser-Kinzel S., Häusler D., Weber M.S. Proinflammatory CD20(+) T cells are differentially affected by multiple sclerosis therapeutics. *Ann. Neurol.* 2021, Vol. 90, no. 5, pp. 834-839.
11. Ramstein J., Broos C.E., Simpson L.J., Ansel K.M., Sun S.A., Ho M.E., Woodruff P.G., Bhakta N.R., Christian L., Nguyen C.P., Antalek B.J., Benn B.S., Hendriks R.W., van den Blink B., Kool M., Koth L.L. IFN- γ -producing T-helper 17.1 cells are increased in sarcoidosis and are more prevalent than T-helper type 1 cells. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2016, Vol. 193, no. 11, pp. 1281-1291.
12. Reich D.S., Lucchinetti C.F., Calabresi P.A. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 2018, Vol. 378, no. 2, pp. 169-180.
13. Schuh E., Berer K., Mulazzani M., Feil K., Meinl I., Lahm H., Krane M., Lange R., Pfannes K., Subklewe M., Gürkov R., Bradl M., Hohlfeld R., Kümpfel T., Meinl E., Krumbholz M. Features of human CD3⁺CD20⁺ T cells. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 197, no. 4, pp. 1111-1117.

14. von Essen M.R., Ammitzboll C., Hansen R.H., Petersen E.R.S., McWilliam O., Marquart H.V., Damm P., Sellebjerg F. Proinflammatory CD20⁺ T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Brain*, 2019, Vol. 142, no. 1, pp. 120-132.

15. Wilk E., Witte T., Marquardt N., Horvath T., Kalippke K., Scholz K., Wilke N., Schmidt R.E., Jacobs R. Depletion of functionally active CD20⁺ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheum.*, 2009, Vol. 60, no. 12, pp. 3563-3571.

Автор:

Глебездина Н.С. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Author:

Glebezina N.S., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 28.03.2024
Принята к печати 31.03.2024

Received 28.03.2024
Accepted 31.03.2024

ДИСБАЛАНС МЕЖДУ Т-ХЕЛПЕРАМИ 17-ГО ТИПА И Т-РЕГУЛЯТОРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ САРКОИДОЗА

Эльгухари А.С.¹, Лазарева Н.М.², Баранова О.П.³, Кудрявцев И.В.^{3,4},
Сесь Т.П.³, Илькович М.М.³, Тотолян Арег А.^{3,5}

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Саркоидоз — это полисистемное воспалительное заболевание неизвестной этиологии, при котором формируются неказеозные гранулемы. Они чаще всего обнаруживаются в легочной ткани. Фенотипы саркоидоза разделяются по особенностям течения на острую и хроническую формы. У пациентов с хроническим саркоидозом прогноз обычно менее благоприятный с риском развития фиброза легких. Известно, что при саркоидозе происходит активация Т-клеток, которые высвобождают различные хемокины и цитокины, стимулирующие воспалительный процесс. В настоящее время особое внимание уделяется роли Th17 и Treg в патогенезе саркоидоза. Цель нашего исследования заключалась в изучении роли соотношения между Th17 и Treg при хроническом течении саркоидоза. Были исследованы образцы плазмы периферической крови больных хроническим саркоидозом (ХС) (n = 101) и условно здоровых лиц (УЗ) (n = 40). Мы определили уровни Th17 и Treg (% от общего числа лимфоцитов) методом проточной цитофлуориметрии. Измеряли содержание цитокинов (пг/мл) IL-17A и IL-10 методом мультиплексного анализа по технологии Luminex xMap. Следующим этапом проведенного нами исследования было изучение взаимосвязи между соотношением Th17/Treg и клиническими показателями тяжести заболевания. Мы проанализировали корреляции между соотношением Th17/Treg и уровнями активности АПФ в периферической крови, значениями ОФВ1 (%), проявлением фиброза, а также наличием системных поражений саркоидоза у больных ХС. Мы обнаружили повышение уровня Th17 (p = 0,028) и снижение уровня Treg (p = 0,026) у больных ХС по сравнению с группой УЗ. Кроме того, отмечено повышение соотношения Th17/Treg (p = 0,003) и со-

Адрес для переписки:

Эльгухари Амро Самир Фавзи Омар
Университет ИТМО
191002, Россия, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9.
Тел.: 8 (911) 112-20-98.
E-mail: amr.s.f.o@gmail.com

Address for correspondence:

Amro Samir Fawzi Omar Elgouhari
ITMO University
9 Lomonosov St
St. Petersburg
191002 Russian Federation.
Phone: +7 (911) 112-20-98.
E-mail: amr.s.f.o@gmail.com

Образец цитирования:

А.С. Эльгухари, Н.М. Лазарева, О.П. Баранова,
И.В. Кудрявцев, Т.П. Сесь, М.М. Илькович,
Арег А. Тотолян «Дисбаланс между Т-хелперами 17-го
типа и Т-регуляторными клетками при хроническом
течении саркоидоза» // Медицинская иммунология,
2024. Т. 26, № 4. С. 755-764.
doi: 10.15789/1563-0625-DOT-16797

© Эльгухари А.С. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.S. Elgouhari, N.M. Lazareva, O.P. Baranova,
I.V. Kudryavtsev, T.P. Ses, M.M. Ilkovich, Areg A. Totolian
“Dysregulation of Th17 and regulatory T Cells in chronic
pulmonary sarcoidosis: a potential biomarker for disease
management”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 755-764.
doi: 10.15789/1563-0625-DOT-16797

© Elgouhari A.S. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-DOT-16797

отношения IL-17A/IL-10 ($p < 0,001$) у больных ХС по сравнению с группой УЗ. Также, наблюдалась положительная корреляция между соотношением Th17/Treg и уровнями активности АПФ ($p = 0,018$), проявлением фиброза ($p = 0,019$), а также с наличием системных поражений у больных ХС ($p = 0,016$). С другой стороны, отмечалась отрицательная корреляция ($p = 0,021$) между значениями ОФВ1 (%) и соотношением Th17/Treg. Наши результаты свидетельствуют об увеличении соотношения Th17/Treg, а также соотношения их основных цитокинов у больных с хроническим течением саркоидоза, что может подчеркнуть их роль в качестве биомаркера тяжести течения и прогноза хронического саркоидоза. На молекулярном уровне баланс между Treg и Th17 поддерживается транскрипционными факторами Foxp3 и ROR γ t, которые регулируют дифференцировку и функцию этих клеток. Нарушение этого баланса при хроническом течении саркоидоза может указывать на возможный механизм прогрессирования заболевания.

Ключевые слова: саркоидоз, синдром Лефгрена, Т-хелперы 17-го типа, Т-регуляторные клетки, биомаркер, IL-17A, гранулема, фиброз

DYSREGULATION OF Th17 AND REGULATORY T CELLS IN CHRONIC PULMONARY SARCOIDOSIS: A POTENTIAL BIOMARKER FOR DISEASE MANAGEMENT

Elgouhari A.S.^a, Lazareva N.M.^b, Baranova O.P.^c, Kudryavtsev I.V.^{c,d},
Ses T.P.^c, Ilkovich M.M.^c, Totolian Areg A.^{c,e}

^a ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation

^b Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

^c First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^d Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^e Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Sarcoidosis is a multisystem inflammatory disease of unknown etiology characterized by the formation of non-caseating granulomas, most commonly in the lung tissue. It presents with two main forms: acute and chronic. Patients with chronic sarcoidosis tend to have a less favorable prognosis with a risk of developing lung fibrosis. Sarcoidosis development involves the activation of T cells, which release various chemokines and cytokines that stimulate the inflammatory process. The aim of our study was to investigate the role of the ratio between Th17 and Treg cells in the chronic course of sarcoidosis. We studied peripheral blood plasma samples from patients with chronic sarcoidosis (CS) ($n = 101$) and healthy individuals (HC) ($n = 40$). The diagnosis in CS patients was confirmed by histological methods. We determined the levels of Th17 and Treg (% of total lymphocytes) by flow cytometry. The concentration of cytokines (pg/ml) IL-17A and IL-10 was measured by multiplex analysis using Luminex xMap. Correlations between the Th17/Treg ratio and clinical parameters, including serum angiotensin-converting enzyme (sACE) activity level in the peripheral blood, forced expiratory volume in the first second (FEV1, %), fibrosis manifestations, and extrapulmonary manifestations were analyzed in CS patients. Our analysis revealed elevated levels of Th17 cells ($p = 0.028$) and decreased Treg levels ($p = 0.026$) in CS patients compared to healthy controls. This resulted in a significantly increased Th17/Treg ratio ($p = 0.003$) and IL-17A/IL-10 ratio ($p < 0.001$) in sarcoidosis patients. Furthermore, the Th17/Treg ratio positively correlated with sACE levels ($p = 0.018$), fibrosis manifestations ($p = 0.019$), and extrapulmonary manifestations ($p = 0.016$), and negatively correlated with FEV1% ($p = 0.021$). Our results indicate an increase in the Th17/Treg ratio, as well as the ratio of their main cytokines in patients with chronic sarcoidosis, which may emphasize their potential role as a diagnostic and prognostic biomarker of disease severity. At the molecular level, the balance between Treg and Th17 cells is maintained by the transcription factors Foxp3 and ROR γ t, which regulate the differentiation and function of these cells. Disruption of this balance in patients with chronic sarcoidosis may indicate a possible mechanism for disease progression.

Keywords: sarcoidosis, Lfgren's syndrome, Th17 cell, Treg, biomarker, IL-17A, granuloma, fibrosis

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-24-20013.

Введение

Саркоидоз — это полисистемное иммуноопосредованное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся образованием неказеозных гранул, чаще всего локализующихся в легочной ткани и внутрилегочных лимфатических узлах [9]. Для установления диагноза саркоидоза требуется комплексный подход, включая дифференциальную диагностику с рядом заболеваний. Основные этапы включают анализ клинического течения заболевания, проведение рентгенологических исследований пораженных тканей, а также гистологическую верификацию диагноза при обнаружении эпителиоидно-клеточных неказеозных гранул в биоптатах пораженных тканей [14].

Клиническая картина саркоидоза очень вариабельна: он может проявляться как бессимптомно, так и с различными симптомами. В зависимости от характера течения заболевания выделяют два основных варианта: острый и хронический. Острый саркоидоз, известный как синдром Лефгрена, проявляется внутригрудной лимфаденопатией, узловатой эритемой, суставным синдромом и лихорадкой. Диагноз этого варианта заболевания может быть установлен на основе клинических признаков. У него более благоприятный прогноз, и в 70% случаев отмечается спонтанная ремиссия в первые два года после начала заболевания. Еще одним редким синдромом острого саркоидоза является синдром Хеерфорда–Вальденстрема, характеризующийся лихорадкой, увеитом и паротитом. Однако наиболее распространенной в клинической практике является хроническая форма саркоидоза, или «не Лефгрена-синдром». Этот вариант заболевания характеризуется более сложным клиническим профилем, включающим ряд атипичных симптомов, что может затруднить его диагностику. Прогноз при этом варианте заболевания менее благоприятный, с высоким риском развития фиброза легких [9].

Саркоидоз характеризуется накоплением лимфоцитов и макрофагов в альвеолах, что приводит к формированию гранул. Исследования показывают, что субпопуляции Т-хелперов играют ведущую роль в образовании гранулемы [2, 9]. При саркоидозе активированные макрофаги и дендритные клетки продуцируют цитокины IL-12 и IL-18, способствуя дифференцировке наивных Th0-клеток в Th1, что приводит к усилению иммунного ответа [9, 11]. Так, интенсивность гранулематозного ответа напрямую связана с активацией Th1-лимфоцитов. Эти клетки способны

синтезировать ряд цитокинов, включая IL-2 и IFN γ за счет активации транскрипционного фактора T-box (T-bet) и экспрессии рецепторов хемокинов CXCR6 и CXCR3 [17].

Многочисленные исследования указывают на важную роль других субпопуляций CD4⁺T-клеток, в том числе Т-хелперов 17-го типа (Th17), в процессе развития саркоидоза. Более того, данные ряда авторов подтверждают, что различные субпопуляции Th17 обладают значительной пластичностью и гетерогенностью на разных стадиях развития этого заболевания [2, 8].

Важно отметить, что при саркоидозе также наблюдаются нарушения в составе субпопуляций, фенотипических характеристиках и функциональной активности Treg [7]. Это может сопровождаться снижением способности регулировать реакции врожденного и приобретенного иммунитета в целом, а также способствовать развитию хронической формы саркоидоза и фиброза [4].

Главным транскрипционным фактором, связанным с дифференцировкой Th17, является ROR γ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t), который регулирует экспрессию генов, характерных для Th17-клеток [5]. Он синтезируется в наивных Т-клетках, и его экспрессия происходит под влиянием IL-6, IL-21 и TGF- β [15]. С другой стороны, известно, что Treg идентифицируются по экспрессии транскрипционного фактора FoxP3 (Forkhead-Box-Protein 3) [3]. Однако исследование показывают, что двойные позитивные FoxP3⁺ROR γ t⁺Т-клетки способны дифференцироваться как в Treg, так и в Th17. Следовательно, наличие транскрипционных факторов FoxP3⁺ или ROR γ t⁺ в лимфоцитах не гарантирует их окончательную дифференциацию в один из этих типов [12].

Таким образом, **цель данной работы** заключалась в исследовании особенностей дисбаланса между составами Th17 и Treg в периферической крови больных с хроническим течением саркоидоза.

Материалы и методы

Были исследованы образцы плазмы крови 101 пациента с хроническим течением саркоидоза («не Лефгрена-синдром»). Все пациенты прошли обследование на базе клиники НИИ интерстициальных и орфанных заболеваний легких при ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. У всех пациентов саркоидоз был верифицирован как впервые выявленное заболевание, на момент выполнения исследований, им не проводилась иммуносупрессивная терапия, в том числе системными

кортикостероидами, а также плазмаферез. В качестве контроля анализировались образцы периферической крови 40 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными саркоидозом.

Все исследования проводились с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266 и «Правилами надлежащей клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. № 200н.

Диагноз у обследованных больных был подтвержден гистологическими исследованиями биопсийных образцов бронхолегочной ткани и/или медиастинальных лимфатических узлов, а также по клиническим и рентгенологическим данным.

Для характеристики групп пациентов использовали рентгенологическую классификацию, рекомендованную Американским торакальным обществом (ATS), Европейским респираторным обществом (ERS) и Всемирной ассоциацией саркоидоза и других гранулематозов (WASOG) [6]. Обследование больных включало: анализ жалоб, анамнез заболевания, жизни и профессиональный анамнез, осмотр, пальпацию, перкуссию, аускультацию, клинический анализ крови, общий анализ мочи, биохимические исследования крови и мочи. Всем больным выполняли мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) органов грудной клетки (ОГК), комплексное функциональное исследование внешнего дыхания (КФИВД), эходоплеркардиографию (ЭходоплерКГ) с учетом расчетного систолического давления в легочной артерии (СДЛА, мм рт. ст.). При необходимости проводилась видеоторакоскопия (ВТС) с биопсией легочной ткани или лимфатического узла средостения, фибробронхоскопия (ФБС) с эндобронхиальной биопсией слизистой бронхов или чрезбронхиальной биопсией легочной ткани с последующим гистологическим исследованием в лабораториях и отделениях ПСПбГМУ им. И.П. Павлова. На основании этих данных пациенты были разделены на две группы: 1) саркоидоз легких без системных проявлений; 2) саркоидоз органов дыхания с экстрапульмональными проявлениями.

Активность саркоидоза оценивали по уровню активности АПФ (ACE Unit = 1 IU/mL) в сыворотке крови, использовали колориметрический тест с пептидным субстратом. Положительным

считался результат > 70 ACE Unit (референсные значения для лиц старше 18 лет: 20–70 ACE Unit).

Клиническое течение оценивали через 3, 6 и 12 месяцев после постановки диагноза, анализировали КТ-исследования органов грудной клетки, функциональные показатели и наличие экстрапульмональных проявлений. Ретроспективный анализ иммунологических параметров проводили через год, учитывая спонтанную регрессию изменений, выраженность экстрапульмональных и фиброзных легочных изменений.

Образцы венозной крови собирали в вакуумные пробирки с содержанием K_3EDTA . Все исследования проводились в день взятия крови. Подготовка крови и настройка проточного цитофлуориметра проводились по рекомендациям Зурочки и соавторов [1]. Т-хелперы периферической крови ($CD3^+CD4^+$ лимфоциты) определялись с помощью антител против CD3 (клон UCHT1) и CD4 (клон 13B8.2). Для определения Th на разных стадиях дифференцировки использовали антитела к CD45RA (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4)) и CD62L (клон DREG56).

Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США) с тремя лазерами (405, 488 и 638 нм). Обработка данных — с помощью Navios Software v. 1.2 и Kaluza™ v. 2.0 (Beckman Coulter, США). Результаты представлены в виде процента содержания (%) от общего числа лимфоцитов.

Содержание цитокинов (пг/мл) в плазме крови измеряли методом мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex). Использовались тест-системы Milliplex MAP (Millipore, США) с магнитными микросферами Milliplex Mag (США) по инструкциям производителя. Регистрация и анализ данных — на приборе Luminex MAGPIX (Luminex, США).

Обработка полученных данных проводилась с помощью статистических тестов, реализованных в Python 3.9.12 (2024, Python Software Foundation). Визуализация данных была создана с помощью библиотеки Matplotlib v3.8.2 (2024, matplotlib.org). Результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для сравнения выборок применяли непараметрический критерий Манна–Уитни, а также корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции r-Спирмена. Статистическая значимость различий принималась при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования было показано, что содержание Th17 в периферической крови (% от общего числа лимфоцитов) достоверно повышено в группе больных с хроническим

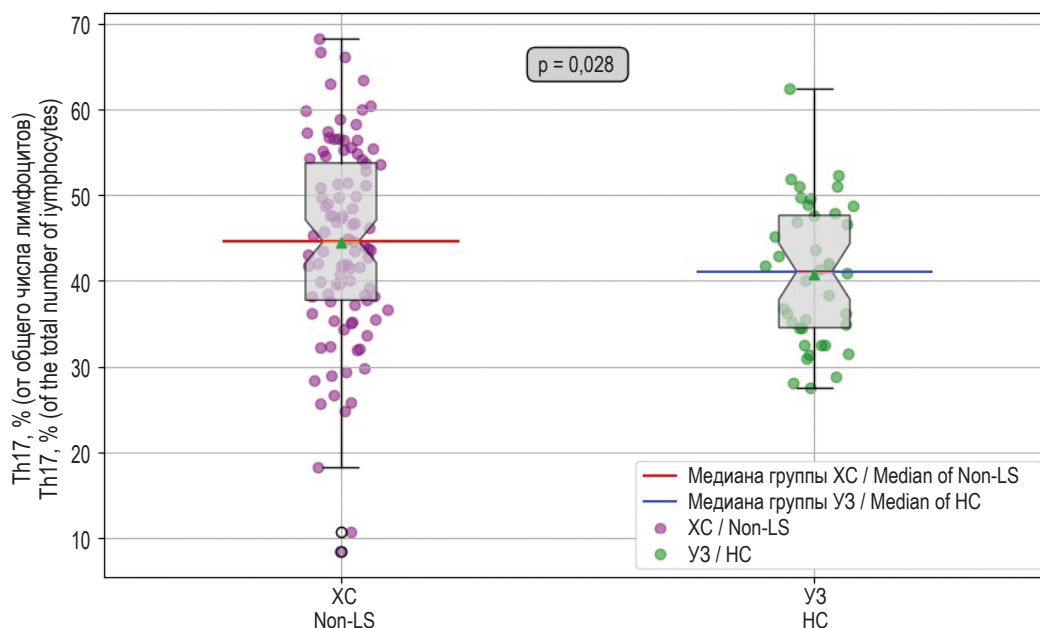


Рисунок 1. Распределение Th17 в периферической крови больных с хроническим течением саркоидоза (n = 101) и группой условно здоровых лиц (n = 40)

Примечание. Здесь и на рисунках 2, 3, 4, 7 и 8: XC – группа больных хроническим саркоидозом; Y3 – условно здоровых лиц. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)). Различия между сравниваемыми группами указаны согласно непараметрическому критерию Манна–Уитни.

Figure 1. Comparative analysis of the distribution of Th17 cells in the peripheral blood of Non-LS sarcoidosis patients (n = 101) and healthy volunteers (n = 40)

Note. In Figure 1, 2, 3, 4, 7 and 8 “Non-LS” denotes Non-Löfgren’s syndrome sarcoidosis patients, while “HC” denotes the Healthy Control subjects. The data are presented as median with interquartile range (Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)). Differences between the groups were assessed using the nonparametric Mann–Whitney U test.

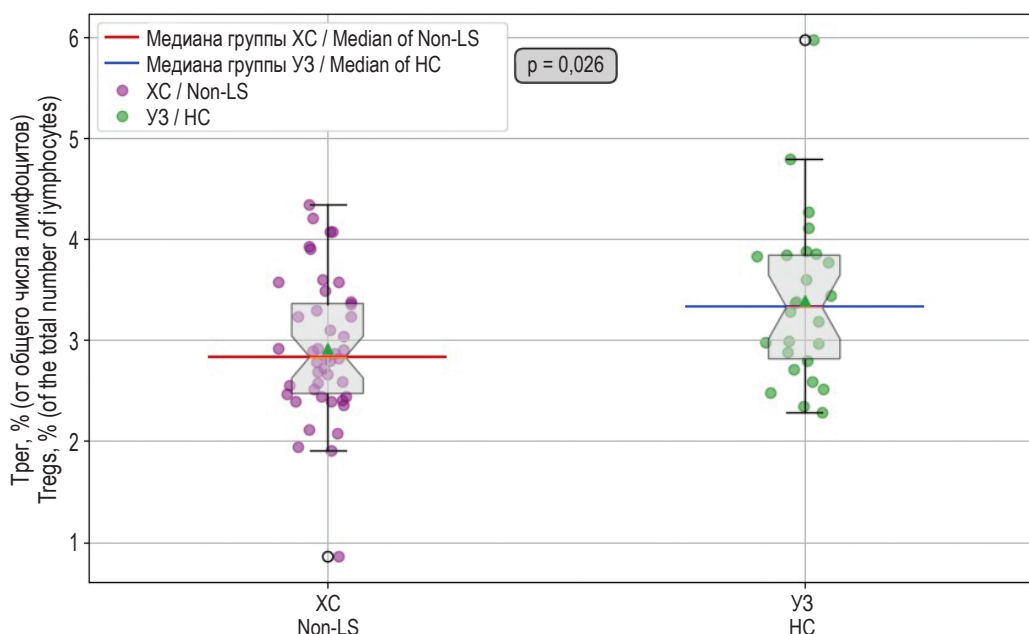


Рисунок 2. Распределение Treg в периферической крови больных с хроническим саркоидозом (n = 45) и группой условно здоровых лиц (n = 26)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Comparative analysis of the distribution of Tregs cells in the peripheral blood of non-LS sarcoidosis patients (n = 45) and healthy volunteers (n = 26)

Note. As for Figure 1.

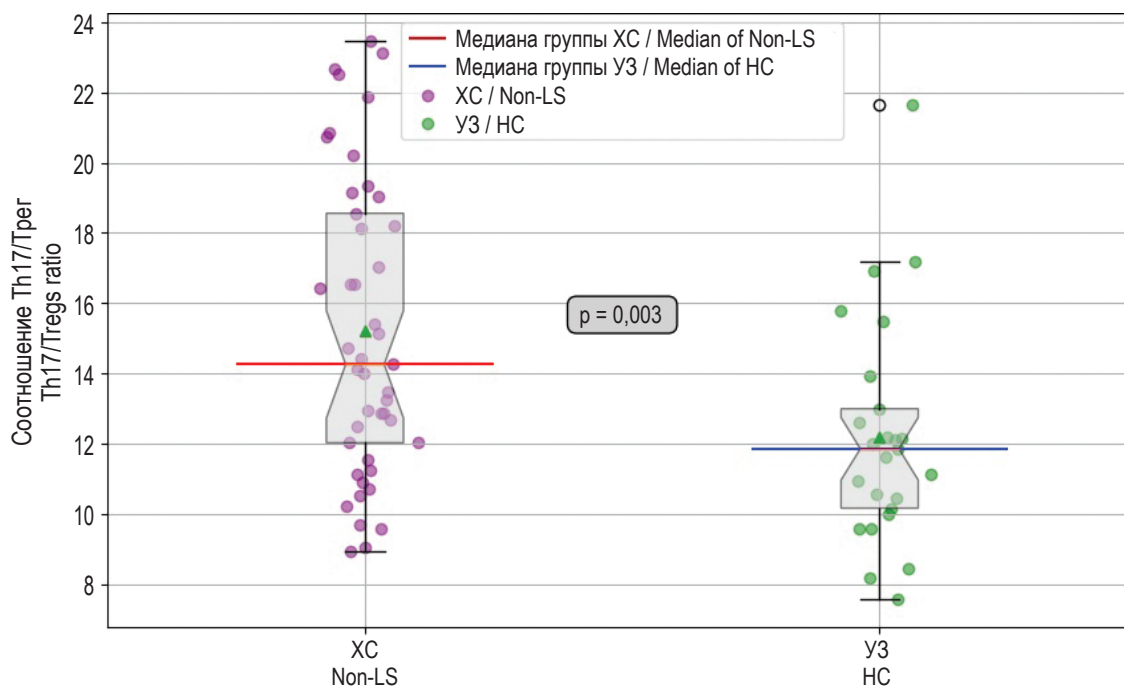


Рисунок 3. Соотношение Th17/Treg в периферической крови больных с хроническим саркоидозом (n = 45) и группой условно здоровых лиц (n = 26)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. The ratio of Th17 cells to total Tregs in the peripheral blood of non-LS sarcoidosis patients (n = 45) and healthy volunteers (n = 26).

Note. As for Figure 1.

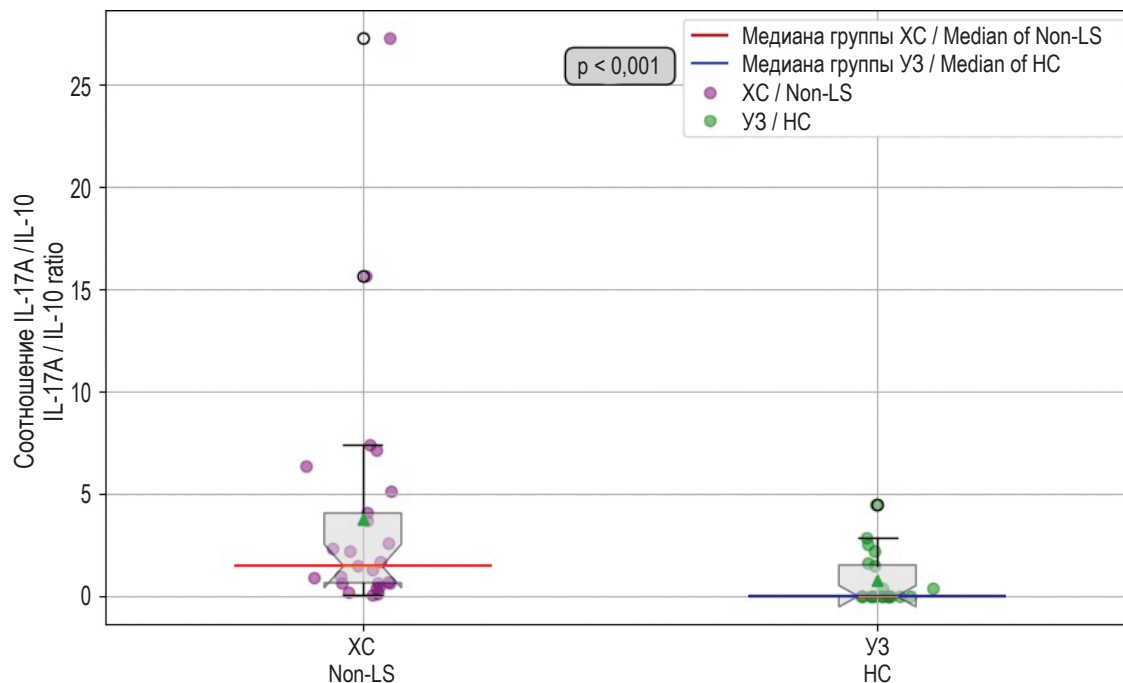


Рисунок 4. Соотношение IL-17A/IL-10 в периферической крови больных с хроническим саркоидозом (n = 45) и группой условно здоровых лиц (n = 26)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 4. The ratio of cytokine levels (pg/mL) between IL-17A and IL-10 in the peripheral blood of non-LS sarcoidosis patients (n = 45) and healthy volunteers (n = 26)

Note. As for Figure 1.

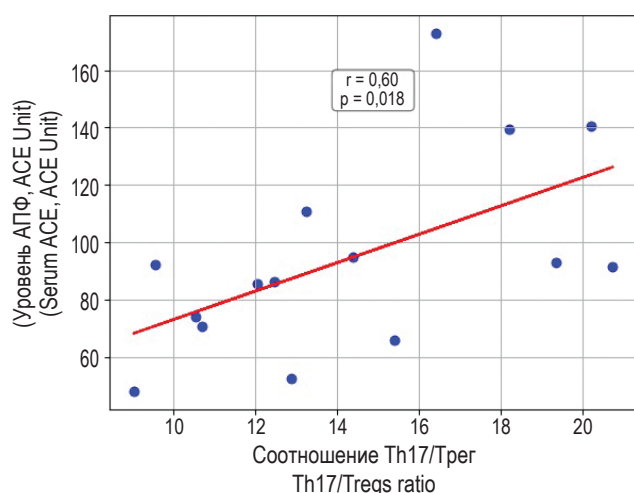


Рисунок 5. Корреляционная зависимость между соотношением Th17/Treg и уровнями активности АПФ в периферической крови больных с хроническим саркоидозом (n = 15)

Примечание. r – коэффициент корреляции Спирмена.

Figure 5. Correlation between the Th17/Tregs ratio and the sACE level in the peripheral blood of non-LS sarcoidosis patients (n = 15)

Note. r, Spearman correlation coefficient.

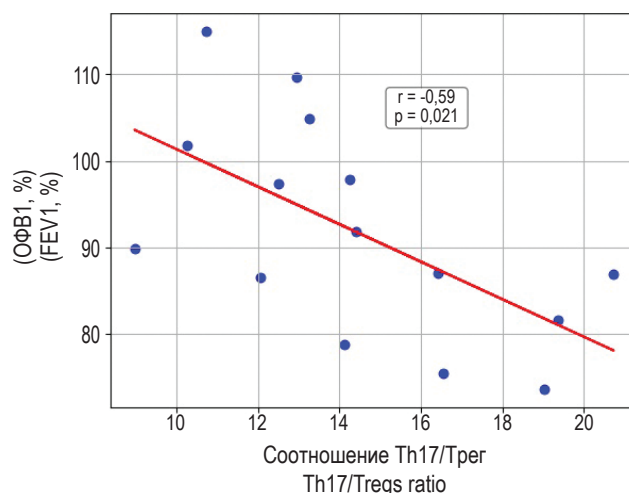


Рисунок 6. Корреляционная зависимость между соотношением Th17/Treg в периферической крови больных с хроническим саркоидозом (n = 15) и значениями ОФВ1 (%)

Примечание. r – коэффициент корреляции Спирмена.

Figure 6. Correlation between the Th17/Tregs ratio in the peripheral blood of non-LS sarcoidosis patients (n = 15) and the values of FEV1 (%)

Note. r, Spearman correlation coefficient.

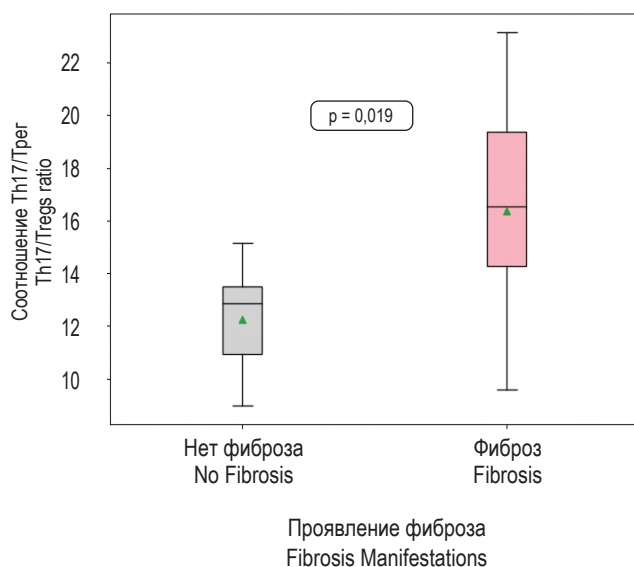


Рисунок 7. Корреляционная зависимость между соотношением Th17/Treg в периферической крови больных с хроническим саркоидозом (n = 22) и проявлением фиброза

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 7. Correlation between the Th17/Tregs ratio in the peripheral blood of non-LS sarcoidosis patients (n = 22) and fibrosis manifestations

Note. As for Figure 1.

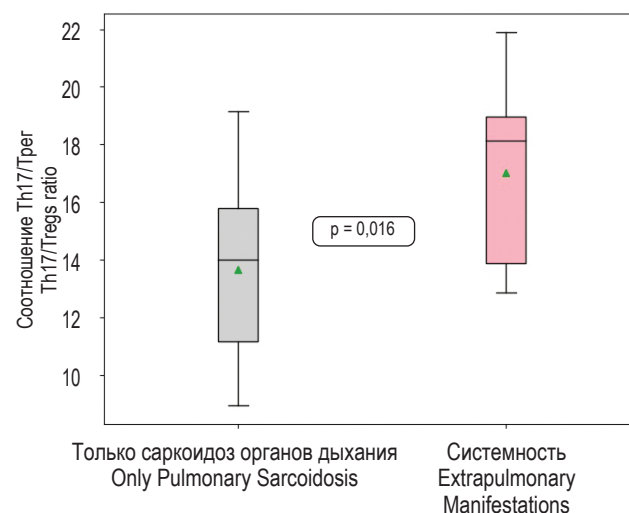


Рисунок 8. Корреляционная зависимость между соотношением Th17/Treg в периферической крови больных с хроническим саркоидозом (n = 30) и системными проявлениями заболевания

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 8. Correlation between the Th17/Tregs ratio in the peripheral blood of non-LS sarcoidosis patients (n = 30) and extrapulmonary manifestations

Note. As for Figure 1.

саркоидозом по сравнению с группой контроля (рис. 1, $p = 0,028$). В то же время у пациентов с хроническим саркоидозом отмечалось снижение содержания Treg в периферической крови по сравнению с группой контроля (рис. 2, $p = 0,028$).

В ходе дальнейших исследований особое внимание было уделено соотношению Th17/Treg у группы пациентов и контроля. Мы обнаружили повышение соотношения Th17/Treg (рис. 3, $p = 0,003$) и соотношения их ключевых цитокинов IL-17A/IL-10 (рис. 4, $p < 0,001$) у больных с хроническим саркоидозом относительно условно здоровых лиц.

Следующим этапом проведенного нами исследования было изучение взаимосвязи между соотношением Th17/Treg и клиническими показателями тяжести заболевания. В образцах крови больных с хроническим саркоидозом отмечались положительные корреляционные взаимосвязи между уровнями активности АПФ и соотношением Th17/Treg (рис. 5, $r = 0,6$, $p = 0,018$). На рисунке 6 отмечена отрицательная корреляция ($r = -0,59$, $p = 0,021$) между значениями ОФВ1 (%) и соотношением Th17/Treg при хроническом саркоидозе.

Более того, корреляционный анализ выявил положительную зависимость между соотношением Th17/Treg и проявлением фиброза (рис. 7, $p = 0,019$), а также с наличием системных поражений у обследованных больных (рис. 8, $p = 0,016$).

Полученные данные указывают на значительное повышение соотношения Th17/Tregs при хронической форме саркоидоза легких, что коррелирует с более тяжелым течением и менее благоприятным прогнозом. Th17 защищают организм от внеклеточных бактерий и паразитов,

а также играют ключевую роль при воспалительных и аутоиммунных реакциях [10]. Treg обладают иммуносупрессивным действием и участвуют в функционировании, установлении и поддержании иммунной толерантности посредством множества механизмов, включая выработку противовоспалительных цитокинов (IL-10), экспрессию ингибирующих рецепторов, таких как CTLA-4, и способность истощать воспалительные процессы. В частности, эти клетки способны подавлять Th2-ответ, ассоциированный с фиброзом за счет экспрессии IL-13 и IL-4 [16]. Снижение функции Treg у больных саркоидозом может быть обусловлено повышенными уровнями TNF α , который подавляет их регуляторные способности и снижает экспрессию FoxP3 [13].

Заключение

Наши результаты подчеркивают потенциальную роль соотношения Th17/Treg в качестве биомаркера тяжести течения заболевания, а также мишени для таргетной иммунотерапии. На молекулярном уровне баланс между Treg и Th17 поддерживается транскрипционными факторами FoxP3 и ROR γ t, регулируемыми их дифференцировку и функции [3]. Дисбаланс между этими клетками у пациентов с хроническим саркоидозом может указывать на механизмы прогрессирования заболевания. В заключение следует отметить, что для понимания роли Th17/Treg в иммунопатогенезе саркоидоза необходимо провести сравнительный анализ изучаемых параметров в периферической крови, ЖБАЛ и биопсии легочной ткани, что позволит оценить процессы на уровне организма.

Список литературы / References

1. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: Уральское отделение РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flow cytometry in biomedical research. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p.]
2. Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Баранова О.П., Серебрякова М.К., Сесь Т.П., Илькович М.М., Тотолан А.А. Особенности «поляризации» Т-хелперов периферической крови при остром и хроническом саркоидозе. // Медицинская иммунология, 2022. Т. 22, № 3. С. 573-586. [Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Baranova O.P., Serebriakova M.K., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. Peripheral blood T helper cell subsets in Löfgren's and non-Löfgren's syndrome patients. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 22, no. 3. pp. 573-586. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PBT-2468.
3. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., Kuchroo V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006, Vol. 441, pp. 235-238.
4. Broos C.E., Hendriks R.W., Kool M. T-cell immunology in sarcoidosis: Disruption of a delicate balance between helper and regulatory T-cells. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2016, Vol. 22, no. 5, pp. 476-483.
5. Capone A., Volpe E. Transcriptional regulators of T helper 17 cell differentiation in health and autoimmune diseases. *Front. Immunol.*, 2020. Vol. 11, 348. doi: 10.3389/fimmu.2020.00348.

6. Hunninghake G.W., Costabel U., Ando M., Baughman R., Cordier J.F., du Bois R., Eklund A., Kitaichi M., Lynch J., Rizzato G., Rose C., Selroos O., Semenzato G., Sharma O.P. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American thoracic society/European respiratory society/world association of sarcoidosis and other granulomatous disorders. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse. Lung. Dis.*, 1999, Vol. 16, no. 2, pp. 149-173.
7. Kudryavtsev I., Zinchenko Y., Starshinova A., Serebriakova M., Malkova A., Akisheva T., Kudlay D., Glushkova A., Yablonskiy P., Shoenfeld Y. Circulating regulatory T cell subsets in patients with sarcoidosis. *Diagnostics*, 2023. Vol. 13, no. 8, 1378. doi: 10.3390/diagnostics13081378.
8. Lazareva N.M., Kudryavtsev I.V., Baranova O.P., Isakov D.V., Serebriakova M.K., Bazhanov A.A., Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Ses' T.P., Ilkovich M.M., Totolian A.A. Sarcoidosis clinical picture governs alterations in type 17 T helper cell subset composition and cytokine profile. *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 5, pp. 1049-1058. doi: 10.15789/1563-0625-SCP-2694.
9. Polverino F., Balestro E., Spagnolo P. Clinical presentations, pathogenesis, and therapy of sarcoidosis: state of the art. *J. Clin. Med.*, 2020, Vol. 9, no. 8, 2363. doi: 10.3390/jcm9082363.
10. Schnell A., Littman D.R., Kuchroo V.K. TH17 cell heterogeneity and its role in tissue inflammation. *Nat. Immunol.*, 2023. Vol. 24, no. 1, pp. 19-29.
11. Shigehara K., Shijubo N., Ohmichi M., Takahashi R., Kon S., Okamura H., Kurimoto M., Hiraga Y., Tatsuno T., Abe S., Sato N. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN-gamma production in sarcoid lungs. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 1, pp. 642-649.
12. Tartar D.M., VanMorlan A.M., Wan X., Guloglu F.B., Jain R., Haymaker C.L., Ellis J.S., Hoeman C.M., Cascio J.A., Dhakal M., Oukka M., Zaghoulani H. FoxP3⁺RORgammat⁺ T helper intermediates display suppressive function against autoimmune diabetes. *J. Immunol. (Baltimore, Md. : 1950)*, 2010, Vol. 184, no. 7, pp. 3377-3385.
13. Valencia X., Stephens G., Goldbach-Mansky R., Wilson M., Shevach E.M., Lipsky P.E. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood*, 2006, Vol. 108, no. 1, pp. 253-261.
14. Valeyre D., Brauner M., Bernaudin J.F., Carbonnelle E., Duchemann B., Rotenberg C., Berger I., Martin A., Nunes H., Naccache J.M., Jeny F. Differential diagnosis of pulmonary sarcoidosis: a review. *Front. Med. (Lausanne)*, 2023, Vol. 10, 1150751. doi: 10.3389/fmed.2023.1150751.
15. Wang J., Zhao X., Wan Y.Y. Intricacies of TGF- β signaling in Treg and Th17 cell biology. *Cell. Mol. Immunol.*, 2023. Vol. 20, no. 9, pp. 1002-1022.
16. Weeratunga P., Moller D.R., Ho L.P. Immune mechanisms in fibrotic pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. Rev.*, 2022, Vol. 31, no. 166, 220178. doi: 10.1183/16000617.0178-2022.
17. Zhang H., Costabel U., Dai H. The role of diverse immune cells in sarcoidosis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 788502. doi: 10.3389/fimmu.2021.788502.

Авторы:

Эльгухари А.С. — студент факультета биотехнологий, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Лазарева Н.М. — к.м.н., заведующая лабораторией молекулярно-генетических исследований клиники, врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Баранова О.П. — к.м.н., старший научный сотрудник Научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, доцент кафедры пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., заведующий лабораторией иммунорегуляции, отдел иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Elgouhari A.S., Student, Faculty of Biotechnologies, ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation

Lazareva N.M., PhD (Medicine), Head of the Clinical Diagnostic Laboratory of Molecular Genetic Research at the Clinic of the Research Center of Cellular and Molecular Pathology, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Baranova O.P., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Interstitial and Orphan Lung Diseases, Associate Professor, Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunoregulation, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Сесь Т.П. — д.б.н., профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ses T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Илькович М.М. — д.м.н., профессор, директор Научно-исследовательского института интерстициальных и орфанных заболеваний легких, заведующий кафедрой пульмонологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ilkovich M.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Interstitial and Orphan Diseases, Head of the Department of Pulmonology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Тотолян Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 31.03.2024
Принята к печати 03.04.2024

Received 31.03.2024
Accepted 03.04.2024

СУБКЛИНИЧЕСКИЙ АТЕРОСКЛЕРОЗ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ МОНОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Герасимова Е.В., Кириллова И.Г., Шалыгина М.В., Попкова Т.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, Россия

Резюме. Развитие субклинического атеросклероза у пациентов с ревматоидным артритом (РА) ассоциируется с хроническим воспалением, одним из ключевых механизмов которого может являться аномальная активация макрофагов.

Цель исследования — оценка особенностей провоспалительной активации циркулирующих моноцитов у пациентов с ранним РА в зависимости от присутствия субклинического атеросклероза сонных артерий.

В исследование включены 60 пациентов (42 женщины и 18 мужчин) с ранним РА без признаков сердечно-сосудистых заболеваний. Атеросклеротическое поражение сосудов диагностировалось при обнаружении атеросклеротических бляшек сонных артерий. Базальная и стимулированная добавлением липополисахаридов (ЛПС) секреция моноцитов была изучена в первичной культуре моноцитов, полученных путем иммуномагнитной сепарации из крови. Количественная оценка цитокинов TNF α и IL-1 β производилась в культуральной жидкости методом ИФА. Провоспалительную активацию моноцитов рассматривали как отношение ЛПС-стимулированной и базальной секреций.

Атеросклеротические бляшки сонных артерий были обнаружены у трети больных РА, они выявлялись чаще у мужчин (50%), чем у женщин (26%, $p < 0,05$). Толщина комплекса интима медиа сонных артерий коррелировала с уровнем общего холестерина ($R = 0,20$; $p = 0,001$) и СОЭ ($R = 0,31$; $p = 0,03$). У больных РА с субклиническим атеросклерозом сонных артерий культивируемые моноциты крови продемонстрировали более высокую базальную секрецию TNF α (294,6 (185,3-778,2) против 146,1 (27,9-79,9) пг/мл, $p < 0,01$) и низкую активацию по TNF α ($9,5 \pm 2,1$ против $19,8 \pm 3,9$, $p < 0,001$) и IL-1 β ($6,1 \pm 2,3$ против $9,5 \pm 1,8$, $p = 0,03$) по сравнению с больными без поражения сонных артерий. У больных РА с АСБ выявлена связь ЛПС-стимулированной секреции IL-1 β с уровнем общего холестерина крови ($R = 0,36$, $p = 0,01$).

Получены данные о более мощном воспалительном потенциале моноцитов периферической крови у больных ранним РА в случае обнаружения субклинического атеросклероза сонных артерий.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, субклинический атеросклероз, активация моноцитов, провоспалительные цитокины, TNF α , IL-1 β

Адрес для переписки:

Герасимова Елена Владимировна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
ревматологии имени В.А. Насоновой»
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 34а.
Тел.: 8 (905) 538-03-99.
E-mail: gerasimovaev@list.ru

Address for correspondence:

Elena V. Gerasimova
V. Nasonova Research Institute of Rheumatology
34a Kashirskoe Highway
Moscow
115522 Russian Federation
Phone: +7 (905) 538-03-99.
E-mail: gerasimovaev@list.ru

Образец цитирования:

Е.В. Герасимова, И.Г. Кириллова, М.В. Шалыгина,
Т.В. Попкова «Субклинический атеросклероз
и провоспалительная активация моноцитов
у пациентов с ранним ревматоидным артритом»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4.
С. 765-770. doi: 10.15789/1563-0625-PIA-16639

© Герасимова Е.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.V. Gerasimova, I.G. Kirillova, M.V. Shalygina,
T.V. Popkova "Pro-inflammatory activation of monocytes
in patients with immunoinflammatory rheumatic diseases",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 4, pp. 765-770.
doi: 10.15789/1563-0625-PIA-16639

© Gerasimova E.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-PIA-16639

PRO-INFLAMMATORY ACTIVATION OF MONOCYTES IN PATIENTS WITH IMMUNOINFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES

Gerasimova E.V., Kirillova I.G., Shalygina M.V., Popkova T.V.

V. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The development of subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis (RA) is associated with chronic inflammation, one of the key mechanisms of which may be abnormal activation of macrophages.

Objective: To assess the characteristics of pro-inflammatory activation of circulating monocytes in patients with early RA depending on the presence of subclinical atherosclerosis of the carotid arteries.

The study included 60 patients (42 women and 18 men) with early RA without signs of cardiovascular disease. Atherosclerotic vascular disease was diagnosed by identifying carotid atherosclerotic plaques. Basal and stimulated monocyte lipopolysaccharide (LPS) secretion was studied in initial monocyte cultures obtained by immunomagnetic separation from blood. Quantification of the cytokines TNF α and IL-1 β was obtained in the culture fluid by ELISA. Proinflammatory activation of monocytes was calculated as the ratio of LPS-stimulated and basal secretion.

Atherosclerotic plaques of the carotid arteries were found in a third of RA patients; they were detected more often in men (50%) than in women (26%, $p < 0.05$). The carotid thickness of the intima media complex correlated with the level of total cholesterol ($R = 0.20$; $p = 0.001$) and ESR ($R = 0.31$; $p = 0.03$). In RA patients and subclinical carotid atherosclerosis, cultured blood monocytes demonstrated higher basal TNF α secretion ($294.6 (185.3-778.2)$ vs $146.1 (27.9-79.9)$ pg/mL, $p < 0.01$) and low activation of TNF α (9.5 ± 2.1 vs 19.8 ± 3.9 , $p < 0.001$) and IL-1 β (6.1 ± 2.3 vs 9.5 ± 1.8 , $p = 0.03$) compared with patients without lesions of the carotid arteries. In RA patients with carotid atherosclerotic plaques, a relationship was found between LPS-stimulated IL-1 β secretion and the level of total blood cholesterol ($R = 0.36$, $p = 0.01$).

Data were obtained on a more powerful inflammatory potential of peripheral blood monocytes in patients with early rheumatoid arthritis in the case of detection of the subclinical carotid atherosclerosis.

Keywords: rheumatoid arthritis, subclinical atherosclerosis, monocyte activation, proinflammatory cytokines, TNF α , IL-1 β

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант № 22-15-00199.

Введение

Атеросклеротическое поражение сосудов лежит в основе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), приводящих к преждевременной гибели пациентов с ревматоидным артритом (РА) [2, 8]. Не вызывает сомнений, что хроническое воспаление, развитие которого связывают с неконтролируемой активацией врожденного и приобретенного иммунитета, лежит в основе развития РА и атеросклеротического процесса [21]. Важное значение в хронизации воспалительного процесса приобретают моноциты-макрофаги и цитокины, продуцируемые ими [5, 16].

Цель исследования — определить особенности провоспалительной активации циркулирующих моноцитов у пациентов с ранним РА в зависимости от присутствия субклинического атеросклероза сонных артерий.

Материалы и методы

В исследование были включены 60 пациентов с достоверным диагнозом РА, согласно критериям Американской коллегии ревматологов / Европейского альянса ревматологических ассоциаций (ACR/EULAR, American College of Rheumatology / European Alliance of Associations for Rheumatology) 2010 г. В исследование не включались лица моложе 18 или старше 65 лет; имеющие клинические признаки ССЗ, а также сахарный диабет, онкологические заболевания, печеночную и почечную недостаточности. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренной версией 2013 г. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом НИИР им. В.А. Насоновой 10 февраля 2022 г. Все участники предоставили письменные информированные согласия на участие в исследовании. Характеристика больных РА представлена в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С РА

TABLE 1. GENERAL CHARACTERISTICS OF RA PATIENTS

Показатель Variables	Больные РА RA patients (n = 60)
Возраст, лет Age, years	51 (42-64)
Пол, ж/м Gender, f/m, n (%)	42 (70) / 18 (30)
Длительность заболевания, мес. Duration of disease, months	10 (5-14)
Индекс активности DAS 28, баллы DAS Activity Index 28, points	5,4 (4,6-6,1)
IgM РФ + IgM RF +, n (%)	48 (80)
АЦЦП + ACCP +, n (%)	38 (63)
Прием НПВП NSAIDs intake n (%)	21 (35)

Примечание. DAS28 – Disease Activity Score 28, РФ – ревматоидный фактор; АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинсодержащему пептиду; НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты.

Note. DAS28, Disease Activity Score 28; RF, rheumatoid factor; ACCP, antibodies to cyclic citrulline-containing peptide; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Пациенты с РА не получали глюкокортикоиды, базисные противовоспалительные и генно-инженерные биологические препараты.

CD14⁺ клетки из цельной крови выделяли методом магнитной сепарации на колонках (Miltenyi Biotec Inc., США) с использованием парамагнитных наночастиц (Miltenyi Biotec Inc., США). Полученные CD14⁺ моноциты культивировали в 0,5 мл бессывороточной среды X-VIVO (Lonza, Германия), содержащей L-глутамин, гентамицин и феноловый красный, при 37 °C. Оценивались базальная и стимулированная добавлением липополисахарида (ЛПС) секреция цитокинов. Клетки культивировали в течение 24 часов, после чего культуральную жидкость отбирали для последующего определения секреции провоспалительных цитокинов TNFα и IL-1β методом ИФА с использованием коммерческих наборов Human TNF-alpha/TNFSF1A DuoSet ELISA, Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA, Human CCL2/MCP-1 DuoSet ELISA (R&D Systems Inc., США).

Результаты и обсуждение

Субклинический атеросклероз сонных артерий был выявлен у 19 (32%) больных РА. Прослежена гендерная ассоциация выявления каротидных АСБ: у мужчин они выявлялись чаще, чем у женщин (50% против 26%, $p < 0,05$). Обнаружена связь толщины комплекса интима медиа с уровнем общего холестерина (ХС) ($R = 0,20$; $p = 0,001$) и СОЭ ($R = 0,31$; $p = 0,03$).

Базальная секреция TNFα культивируемыми моноцитами оказалась в 2 раза выше и намечена тенденция к более высоким показателям базальной секреции IL-1β у больных РА с каротидным атеросклерозом по сравнению без такового (табл. 2). По показателям ЛПС-стимулированной секреции TNFα и IL-1β культивируемыми моноцитами больные РА с и без АСБ не различались.

У больных РА с субклиническим атеросклерозом по сравнению с больными без поражения сонных артерий активация моноцитов оказалась ниже по TNFα и IL-1β (табл. 3).

Выявлена корреляция между ЛПС-стимулированным уровнем IL-1β и общим ХС ($R = 0,36$, $p = 0,01$).

Настоящее исследование продемонстрировало различие показателей базальной секреции и активации моноцитов периферической крови по основным провоспалительным цитокинам TNFα и IL-1β у пациентов с ранним активным РА в зависимости от обнаружения субклинического атеросклероза сонных артерий. В целом, выявленное снижение активации моноцитов в отношении изученных цитокинов у больных РА с каротидными АСБ было обусловлено высокими уровнями базальной секреции цитокинов в этой группе при одинаковом уровне ЛПС-стимулированной секреции в обеих группах больных. Согласно ранее опубликованным данным, циркулирующие моноциты пациентов с РА характеризуются снижением активации по сравнению со здоровыми

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СЕКРЕЦИИ $TNF\alpha$ И $IL-1\beta$ КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ МОНОЦИТАМИ У БОЛЬНЫХ РА С И БЕЗ АСБ

TABLE 2. INDICATORS OF $TNF\alpha$ AND $IL-1\beta$ SECRETION BY CULTURED MONOCYTES IN RA PATIENTS WITH AND WITHOUT ASP

Секреция цитокинов, пг/мл Cytokines secretion, pg/mL	Больные РА с АСБ RA patients with ASP (n = 19)	Больные РА без АСБ RA patients without ASP (n = 41)	p
$TNF\alpha$ базальная TNF α basal	294,6 (185,3-778,2)	146,1 (27,9-79,9)	0,01
$TNF\alpha$ ЛПС-стимулированная TNF α LPS-stimulated	3247,3 (2051,8-6021,4)	3335,8 (1945,9-6247,8)	0,65
$IL-1\beta$ базальная IL-1 β basal	212,6 (137,5-289,7)	189,5 (126,4-239,1)	0,06
$IL-1\beta$ ЛПС-стимулированная IL-1 β LPS-stimulated	1256,9 (688,4-1691,6)	1187,9 (782,8-1797,3)	0,39

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ АКТИВАЦИИ МОНОЦИТОВ ПО $TNF\alpha$ И $IL-1\beta$ У БОЛЬНЫХ РА С И БЕЗ АСБ

TABLE 3. INDICATORS OF MONOCYTE ACTIVATION BY $TNF\alpha$ AND $IL-1\beta$ IN RA PATIENTS WITH AND WITHOUT ASP

Активация моноцитов Monocyte activation	Больные РА с АСБ RA patients with ASP (n = 19)	Больные РА без АСБ RA patients without ASP (n = 41)	p
$TNF\alpha$	9,5 $\pm$ 2,1	19,8 $\pm$ 3,9	< 0,001
$IL-1\beta$	6,1 $\pm$ 2,3	9,5 $\pm$ 1,8	0,03

лицами, поскольку демонстрируют сниженный ответ на ЛПС-стимуляцию [1, 11].

Известно, что макрофаги принимают активное участие в развитии как РА [3, 20], так и атеросклеротического поражения сосудов [13, 19, 23]. Макрофаги, активированные по М1-типу, секретируют воспалительные медиаторы, в том числе провоспалительные цитокины и цитотоксические молекулы, индуцируя развитие воспалительной реакции и поддерживая ее путем вовлечения новых иммунных клеток (моноцитов, нейтрофилов), поляризации Т-клеток и активации фибробластов [17]. Было показано, что моноциты при РА могут проникать в синовию и активироваться для высвобождения цитокинов, аутоантител и матричной металлопротеиназы, ведущих к разрушению кости и хряща [14]. У больных РА в синовиальной мембране суставной капсулы было обнаружено большее количество М1 макрофагов, а ингибирование специфическими антителами предотвращало их появление в паннусах и ослабляло воспаление [4, 6]. Синовиальные макрофаги могут стимулировать ангиогенез, инфильтрацию синовиальной оболочки лейкоцитами, увеличивать пролиферацию фибробластов и секрецию протеаз, приводящих к деструкции сустава [7, 10].

С другой стороны, дисбаланс с преобладанием в области атеросклеротического поражения макрофагов, активированных по М1-типу, приводит к прогрессированию атеросклероза и дестабилизации АСБ [12, 18].

Ранее у участников с бессимптомным атеросклерозом была продемонстрирована негативная корреляция секреции $TNF\alpha$ в нестимулированных и ЛПС-стимулированных моноцитах с уровнем холестерина ЛПВП ($R = -0,53$ и $R = -0,69$, $p < 0,01$ в обоих случаях) [15]. Наши данные позволяют предположить, что липидный профиль крови может быть важным фактором, определяющим степень воспалительной реакции моноцитов на патоген. Важно отметить, что липиды действуют как сигнальные молекулы воспаления; например, эйкозаноиды предшествуют продукции цитокинов и хемокинов, а фосфоинозитиды служат вторичными мессенджерами липидного происхождения [22]. Анализ липидома показал, что липидные профили у пациентов с высокоактивным РА с повышенным СОЭ/СРБ были аналогичны профилям липидов у пациентов с доклиническим РА, что позволяет предположить, что изменения в липидном обмене предшествуют лабораторным и клиническим проявлениям РА, а липидный профиль может быть чувствительным предиктором прогрессирования заболевания [9].

Выводы

Высокий провоспалительный потенциал культивируемых моноцитов, сопровождающийся увеличением уровня ХС крови, у больных РА в случае выявления субклинического атеросклероза сонных артерий может свидетельствовать об активной роли макрофагов в развитии преждевременного атеросклероза при РА.

Список литературы / References

1. Богатырева А.И., Герасимова Е.В., Кириченко Т.В., Маркина Ю.В., Попкова Т.В., Шалыгина М.В., Толстик Т.В., Маркин А.М., Орехов А.Н. Провоспалительная активация моноцитов у пациентов с иммуно-воспалительными ревматическими заболеваниями (предварительные результаты) // Научно-практическая ревматология, 2023. Т. 61, № 6. С. 744-750. [Bogatyreva A.I., Gerasimova E.V., Kirichenko T.V., Markina Yu.V., Popkova T.V., Shalygina M.V., Tolstik T.V., Markin A.M., Orekhov A.N. Pro-inflammatory activation of monocytes in patients with immunoinflammatory rheumatic diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2023, Vol. 61, no. 6, pp. 744-750. (In Russ.)]
2. Agca R., Heslinga S.C., Rollefstad S., Heslinga M., McInnes I.B., Peters M.J.L., Kvien T.K., Dougados M., Radner H., Atzeni F., Primdahl J., Södergren A., Wallberg Jonsson S., van Rompay J., Zabalan C., Pedersen T.R., Jacobsson L., de Vlam K., Gonzalez-Gay M.A., Semb A.G., Kitaz G.D., Smulders Y.M., Szekanecz Z., Sattar N., Symmons D.P.M., Nurmohamed M.T. EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Ann. Rheum. Dis.*, 2017, Vol. 76, no. 1, pp. 17-28.
3. Alivernini S., MacDonald L., Elmesmari A., Finlay S., Tulusso B., Gigante M.R., Petricca L., di Mario C., Bui L., Perniola S., Attar M., Gessi M., Fedele A.L., Chilaka S., Somma D., Sansom S.N., Filer A., McSharry C., Millar N.L., Kirschner K., Nerviani, Lewis M.J., Pitzalis C., Clark A.R., Ferraccioli G., Udalova I., Buckley C.D., Gremese E., McInnes I.B., Otto T.D., Kurowska-Stolarska M. Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 8, pp. 1295-1306.
4. Ambarus C.A., Noordenbos T., de Hair M.J.H., Tak P.P., Baeten D.L.P. Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Res. Ther.*, 2012, Vol. 14, no. 2, R74. doi:10.1186/ar3796.
5. Bashir S., Sharma Y., Elahi A., Khan F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflamm. Res.*, 2016, Vol. 65, no. 1, pp. 1-11.
6. Brühl H., Cihak J., Plachý J., Kunz-Schughart L., Niedermeier M., Denzel A., Gomez M.R., Talke Y., Luckow B., Stangassinger M., Mack M. Targeting of Gr-1⁺, CCR2⁺ monocytes in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2007, Vol. 56, no. 9, pp. 2975-2985.
7. Deng C., Zhang Q., He P., Zhou B., He K., Sun X., Lei G., Gong T., Zhang Z. Targeted apoptosis of macrophages and osteoclasts in arthritic joints is effective against advanced inflammatory arthritis. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 2174. doi: 10.1038/s41467-021-22454-z.
8. Dijkshoorn B., Raadsen R., Nurmohamed M.T. Cardiovascular disease risk in rheumatoid arthritis anno 2022. *J. Clin. Med.*, 2022, Vol. 11, no. 10, 2704. doi:10.3390/JCM11102704
9. Hee Koh J., Jun Yoon S., Kim M., Cho S., Lim J., Park Y., Kim H.-S., Won Kwon S., Kim W.-U. Lipidome profile predictive of disease evolution and activity in rheumatoid arthritis. *Exp. Mol. Med.*, 2022, Vol. 54, no. 2, pp. 143-155.
10. Komatsu N., Takayanagi H. Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis – immune cell–fibroblast–bone interactions. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2022, Vol. 18, no. 7, pp. 415-429.
11. Kuuliala K., Kuuliala A., Hämäläinen M., Koivuniemi R., Kautiainen H., Moilanen E., Repo H., Leirisalo-Repo M. Impaired akt phosphorylation in monocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.*, 2017, Vol. 85, no. 2, pp. 155-161.
12. Li H., Cao Z., Wang L., Liu C., Lin H., Tang Y., Yao P. Macrophage subsets and death are responsible for atherosclerotic plaque formation. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 843712. doi: 10.3389/fimmu.2022.843712.
13. Linton M.F., Moslehi J.J., Babaev V.R. Akt signaling in macrophage polarization, survival, and atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 11, 2703. doi: 10.3390/ijms20112703.
14. McInnes I.B., Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2017, Vol. 389, no. 10086, pp. 2328-2337.
15. Nikiforov N.G., Wetzker R., Kubekina M.V., Petukhova A.V., Kirichenko T.V., Orekhov A.N. Trained circulating monocytes in atherosclerosis: Ex vivo model approach. *Front. Pharmacol.*, 2019, Vol. 10, 725. doi: 10.3389/fphar.2019.00725.
16. Ross E.A., Devitt A., Johnson J.R. Macrophages: The good, the bad, and the gluttony. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 708186. doi: 10.3389/fimmu.2021.708186.
17. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaili S.A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J.T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell Physiol.*, 2018, Vol. 233, no. 9, pp. 6425-6440.
18. Stöger J.L., Gijbels M.J.J., van der Velden S., Manca M., van der Loos C.M., Biessen E.A.L., Daemen M.J.A.P., Lutgens E., de Winther M.P.J. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2012, Vol. 225, no. 2, pp. 461-468.
19. Tabas I., Bornfeldt K.E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis. *Circ. Res.*, 2016, Vol. 118, no. 4, pp. 653-667.
20. Tu J., Wang X., Gong X., Hong W., Han D., Fang Y., Guo Y., Wei W. Synovial macrophages in rheumatoid arthritis: the past, present, and future. *Mediators Inflamm.*, 2020, Vol. 2020, 1583647. doi:10.1155/2020/1583647.

21. Winchester R., Giles J.T., Nativ S., Downer K., Zhang H.-Z., Bag-Ozbek A., Zartoshti A., Bokhari S., Bathon J.M. Association of elevations of specific T cell and monocyte subpopulations in rheumatoid arthritis with subclinical coronary artery atherosclerosis. *Arthritis Rheum.*, 2016, Vol. 68, no. 1, pp. 92-102.
22. Wymann M.P., Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, Vol. 9, no. 2, pp. 162-176.
23. Yang S., Yuan H.Q., Hao Y.M., Ren Z., Qu S.L., Liu L.S., Wei D.H., Tang Z.H., Zhang J.F., Jiang Z.S. Macrophage polarization in atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta*, 2020, Vol. 501, pp. 142-146.

Авторы:

Герасимова Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела системных ревматических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, Россия

Кириллова И.Г. — к.м.н., научный сотрудник отдела системных ревматических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, Россия

Шалыгина М.В. — младший научный сотрудник отдела системных ревматических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, Россия

Попкова Т.В. — д.м.н., начальник отдела системных ревматических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, Россия

Authors:

Gerasimova E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Systemic Rheumatic Diseases, V. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russian Federation

Kirillova I.G., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Systemic Rheumatic Diseases, V. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russian Federation

Shalygina M.V., Junior Research Associate, Department of Systemic Rheumatic Diseases, V. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russian Federation

Popkova T.V., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Systemic Rheumatic Diseases, V. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russian Federation

Поступила 25.03.2024
Отправлена на доработку 26.03.2024
Принята к печати 05.04.2024

Received 25.03.2024
Revision received 26.03.2024
Accepted 05.04.2024

ЧИСЛО КОПИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В МОНОЦИТАХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

Герасимова Е.В.¹, Богатырева А.И.^{1,2}, Попкова Т.В.¹,
Герасимова Д.А.³

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, Россия

²Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ

«Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия

Резюме. Клетки врожденного иммунитета являются важными участниками воспалительных и фиброзных процессов при системной склеродермии (ССД). В патогенезе ССД задействованы иммунные клетки, в первую очередь макрофаги, в основе нарушений которых лежит митохондриальная дисфункция клеток. В качестве суррогатного маркера митохондриальной дисфункции клеток используется число копий митохондриальной ДНК (мтДНК).

Цель исследования — оценить количество копий мтДНК в CD14⁺ моноцитах и во всех популяциях клеток, циркулирующих в крови, у больных ССД по сравнению со здоровым контролем.

В исследование были включены 25 пациентов с ССД (22 женщины и 3 мужчин, медиана возраста 49 (43-57) лет и длительности заболевания 4,6 (1,0-9,6) лет) и 25 человек без аутоиммунных или хронических воспалительных заболеваний, сопоставимых по возрасту и полу. Большинство пациентов (80%) имели ограниченную форму ССД. Больные ССД не получали противоревматическую терапию. ДНК выделяли из CD14⁺ моноцитов и цельной крови. Абсолютное число копий мтДНК измеряли с помощью цифровой ПЦР. Величину числа копий мтДНК на клетку, использованную для анализа, рассчитывали как соотношение копий мтДНК и яДНК.

Установлено, что у больных ССД количество копий мтДНК в CD14⁺ моноцитах было выше (108 (60-162) против 72 (59-79), $p = 0,01$), а показатель всех популяций клеток, циркулирующих в крови, не различался по сравнению с контрольной группой (109 (72-171) и 128 (85-227), $p = 0,17$). Выявлена негативная связь количества копий мтДНК с длительностью заболевания и позитивная — с ЛПС-стимулированной секрецией IL-6 культивируемыми CD14⁺ моноцитами.

Результаты исследования позволяют предположить, что увеличение числа копий мтДНК в CD14⁺ моноцитах является возможным механизмом поддержания сниженной функции дефектных митохондрий в моноцитах пациентов с ССД, связанной с развитием и прогрессированием ССД.

Ключевые слова: ДНК, митохондрии, моноциты, системная склеродермия, аутоиммунитет, воспаление

Адрес для переписки:

Герасимова Елена Владимировна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
ревматологии имени В.А. Насоновой»
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 34а.
Тел.: 8 (905) 538-03-99.
E-mail: gerasimovaev@list.ru

Address for correspondence:

Elena V. Gerasimova
V. Nasonov Research Institute of Rheumatology
34a Kashirskoe Highway
Moscow
115522 Russian Federation
Phone: +7 (905) 538-03-99.
E-mail: gerasimovaev@list.ru

Образец цитирования:

Е.В. Герасимова, А.И. Богатырева, Т.В. Попкова,
Д.А. Герасимова «Число копий митохондриальной
ДНК в моноцитах и периферической крови у больных
системной склеродермией» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 771-776.
doi: 10.15789/1563-0625-MDC-16744

© Герасимова Е.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.V. Gerasimova, A.I. Bogatyreva, T.V. Popkova,
D.A. Gerasimova "Mitochondrial DNA copy number in
monocytes and peripheral blood in patients with systemic
sclerosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 771-776.
doi: 10.15789/1563-0625-MDC-16744

© Gerasimova E.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-MDC-16744

MITOCHONDRIAL DNA COPY NUMBER IN MONOCYTES AND PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS

Gerasimova E.V.^a, Bogatyreva A.I.^{a, b}, Popkova T.V.^a, Gerasimova D.A.^c

^a V. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russian Federation

^b A. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, V. Petrovsky Russian National Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

^c I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Innate immune cells are important participants in inflammatory and fibrotic processes in systemic scleroderma (SSc). The pathogenesis of SSc involves immune cells, primarily macrophages, whose disorders are based on mitochondrial cell dysfunction. Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number is used as a surrogate marker of mitochondrial cell dysfunction. The aim of the study was to evaluate the number of mtDNA copies in CD14⁺ monocytes and in all cell populations circulating in the blood in patients with SSc compared to healthy controls.

The study included 25 patients with SSc (22 women and 3 men, median age 49 (43–57) years and disease duration 4.6 (1.0–9.6) years) and 25 people without autoimmune diseases or chronic inflammatory diseases matched by age and gender. The majority of patients (80%) had a limited form of SSc. All study participants did not receive antirheumatic therapy. DNA was isolated from CD14⁺ monocytes and whole blood. Absolute mtDNA copy number was measured using digital PCR. The number of mtDNA copies per cell used for analysis was calculated as the ratio of mtDNA and nDNA copies.

It was found that in patients with SSc, the number of mtDNA copies in CD14⁺ monocytes was higher (108 (60–162) vs 72 (59–79), $p = 0.01$), and the indicator of all cell populations circulating in the blood did not differ in compared with the control group (109 (72–171) and 128 (85–227), $p = 0.17$). A negative relationship was found between the number of mtDNA copies and the duration of the disease, and a positive relationship with LPS-stimulated IL-6 secretion by cultured CD14⁺ monocytes.

The study results suggest that increase of mtDNA copy number in CD14⁺ monocytes is a possible mechanism to maintain the reduced function of defective mitochondria in monocytes from patients with SSc associated with the development and progression of SSc.

Keywords: DNA, mitochondrial, monocytes, systemic sclerosis, autoimmunity, inflammation

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 22-15-00199.

Введение

Системная склеродермия (ССД), или прогрессирующий системный склероз, представляет собой системное заболевание соединительной ткани, характеризующееся генерализованным фиброзом кожи и внутренних органов. При ССД отмечается триада признаков: иммунная дисфункция, фиброз и васкулопатия. Из множества иммунных клеток, вовлеченных в патогенез ССД, ключевую роль играют макрофаги [18]. Дисфункция макрофагов при ССД характеризуется активацией клеток с последующей выработкой цитокинов и рекрутированием других иммунных клеток, обуславливающими хронизацию воспаления [8]. С другой стороны, секреция профибротических молекул макрофагами и активация фибробластов приводят к развитию фиброза [3].

Митохондриальная дисфункция может обуславливать нарушения работы иммунной системы. В частности, происходят нарушение электрон-транспортной цепи и увеличение активных форм кислорода, влияющее на секрецию провоспалительных цитокинов и приводящее к активации и миграции иммунных клеток в очаги воспаления [20]. Изменения количества мтДНК могут приводить к усилению окислительного стресса и способствовать и развитию воспаления [12]. Ряд исследований показал, что число копий мтДНК у пациентов с аутоиммунными ревматическими заболеваниями отличается от здоровых доноров и связано с активностью воспаления [9, 16].

Целью данного исследования было изучение копийности мтДНК в CD14⁺ моноцитах и всех клеток, циркулирующих в крови больных ССД и практически здоровых лиц, и оценить связь количества копий мтДНК с провоспалительным статусом моноцитов.

Материалы и методы

В исследование были включены 25 пациентов с ССД и 25 практически здоровых человек без аутоиммунных или хронических воспалительных заболеваний, сопоставимых по возрасту и полу. Критериями исключения были возраст младше 20 лет и старше 70 лет; наличие сахарного диабета, онкологических заболеваний, декомпенсированной почечной или печеночной недостаточности, хронической сердечно-сосудистой недостаточности III-IV класса по NYHA. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренной версией 2013 г. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом НИИ ревматологии им. Насоновой 10 февраля 2022 г. Все участники предоставили письменное информированное согласие об участии в исследовании.

В таблице 1 представлены общая характеристика и клинико-лабораторные проявления ССД.

У большинства пациентов (80%) диагностирована ограниченная форма ССД. Пациенты с ССД не получали терапию противоревматическими препаратами.

Моноциты CD14⁺ выделяли из образцов цельной крови стандартным методом выделения лейкоцитарной фракции в градиенте фиколла с последующим отбором клеток CD14⁺ методом магнитной сепарации на колонках (Miltenyi Biotec, США) с использованием парамагнитных наночастиц (Miltenyi Biotec, США). Выделение ДНК из CD14⁺ моноцитов и цельной крови проводили с использованием набора ExtractDNA Blood & Cells (ЗАО «Евроген», Россия) по протоколу производителя. Концентрацию и чистоту полученной ДНК определяли с помощью прибора BIOSPEC-NANO spectrophotometer (Shimadzu, Япония).

Копийность мтДНК и яДНК определяли методом цифровой ПЦР на приборе QIAcuity Eight (Qiagen, Германия). Для амплификации исполь-

ТАБЛИЦА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ССД

TABLE 1. GENERAL CHARACTERISTICS, CLINICAL AND LABORATORY MANIFESTATIONS OF SSC PATIENTS

Характеристика Characteristics	Пациенты ССД SSc patients (n = 25)
Возраст, годы / Age, years	49 (43-57)
Пол, жен./муж. / Gender, f/m, n (%)	22 (88)/3 (12)
Длительность заболевания, годы / Disease duration, years	4,6 (1,0-9,6)
Форма ССД / Types of SSc, n (%): лимитированная / limited диффузная / diffuse	20 (80) 5 (20)
Индекс активности, баллы / Activity index, points	2,1 (0,8-2,8)
Проявления ССД / SSc manifestations, n (%) Утолщение кожи пальцев / Skin thickening of the fingers: склередема / scleredema склеродактилия / sclerodactyly	20 (80) 8 (32)
Дигитальная ишемия / Digital ischemia: дигитальные язвочки / digital sores дигитальные рубчики / digital scars	9 (36) 12 (48)
Телеангиэктазии / Telangiectasia	11 (44)
Феномен Рейно / Raynaud's phenomenon	20 (80)
Капилляроскопические изменения / Abnormal nailfold capillaries	21 (84)
Артриты / Arthritis	8 (32)
Легочная артериальная гипертензия / Pulmonary arterial hypertension	3 (12)
Интерстициальное поражение легких / Interstitial lung disease	5 (20)
Поражение сердца / Heart damage	8 (32)
ССД-аутоантитела / SSc related autoantibodies, n (%): антитела к топоизомеразе 1 / anti-topoisomerase I autoantibodies	8 (32)
Антицентромерные антитела / Anticentromere autoantibodies	12 (48)
Антитела к рибонуклеопротеину (РНП) / Anti-ribonucleoprotein (RNP) antibodies.	2 (8)

зовали праймеры (ООО «НПФ Синтол», Россия) и реакционную смесь QuantiFast SYBR Green Master Mix (Qiagen, Германия). ПЦР проводили в течение 42 циклов, с предварительной денатурацией в течение 2 минут при 95 °С для первого цикла, следующие 40 циклов включали денатурацию в течение 15 секунд при 95 °С, отжиг – в течение 30 секунд при 60 °С и элонгацию в течение 30 секунд. При 72 °С финальный цикл (продление температуры) длился 5 минут при 40 °С. Для каждого тестируемого образца реакцию ПЦР проводили не менее трех раз. ПЦР-реакции проводили в общем объеме 12 мкл с использованием 5 мкл геномной ДНК, 0,4 мкл прямого и обратного праймеров, 4 мкл QuantiFast SYBR Green Master Mix и 2,2 мкл деионизированной воды.

Для определения количества копий мтДНК и яДНК использовали праймеры F MT-ND4, R MT-ND4, F NCOA3, R NCOA3. Нуклеотидная последовательность F MT-ND4: 5'-ccattctctctctatccctcaac-3', R MT-ND4: 5'-108 cacaatctgatgttttggttaactatattt-3', F NCOA3: 5'-gagtttctctggacaaatag-3', R NCOA3: 5'-109 cattgtttcatatctctggcg-3'. Праймеры были выбраны на основе литературных данных [2, 10]. Величину числа копий мтДНК на клетку, использованную для анализа, рассчитывали как соотношение копий мтДНК и яДНК [15]. Исследователи не знали о групповом статусе и клинических характеристиках участников исследования.

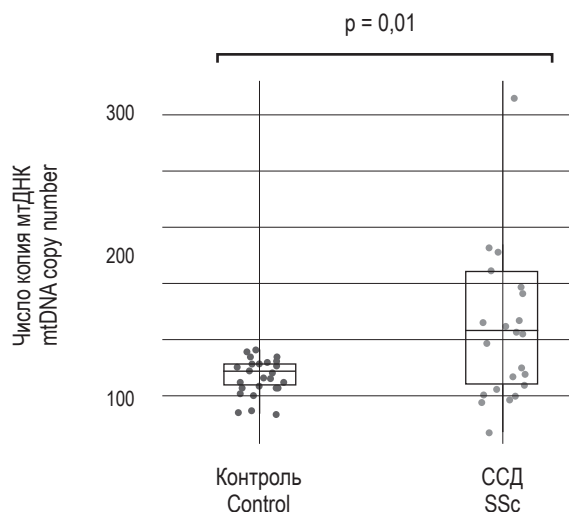
Результаты и обсуждение

Абсолютное число копий мтДНК CD14⁺ моноцитов было достоверно выше в группе больных ССД (108 (60-162)) по сравнению с контрольной группой (72 (6059-79), $p = 0,03$) (рис. 1), тогда как абсолютное число копий мтДНК всех популяций клеток, циркулирующих в крови, достоверно не различалось (109 (72-171) и 128 (85-227), $p = 0,17$).

При анализе связи числа копий мтДНК в CD14⁺ моноцитах с клинико-лабораторными характеристиками пациентов с ССД была обнаружена обратная корреляция числа копий мтДНК с длительностью заболевания ($R = -0,420$, $p = 0,037$). Ассоциаций количества копий мтДНК в цельной крови с клиническими характеристиками пациентов с ССД не было обнаружено. Более высокое число копий мтДНК в CD14⁺ моноцитах было связано с повышенной ЛПС-стимулированной секрецией IL-6 культивируемыми CD14⁺ моноцитами участников исследования с ССД ($R = 0,569$, $p = 0,006$).

Показана связь числа копий мтДНК с развитием сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и метаболических заболеваний (F.N. Ashar et al., 2017; X. Ding et al., 2023; S.Y. Yang et al., 2021). Известно, что при большинстве этих заболеваний, ассоциированных с митохондриальной дисфункцией, число копий мтДНК снижено по

А (A)



Б (B)

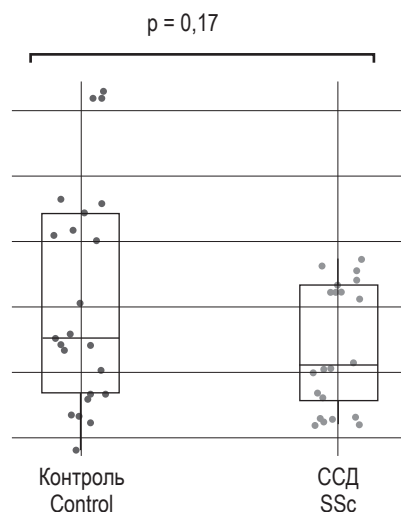


Рисунок 1. Число копий мтДНК в CD14⁺ моноцитах и цельной крови пациентов с ССД и здоровых участников исследования

Примечание. А – количественное определение мтДНК моноцитов CD14⁺. Б – количественная оценка мтДНК всех популяций клеток, циркулирующих в крови.

Figure 1. mtDNA copy number in CD14⁺ monocytes and whole blood of SSc patients and healthy participants

Note. A, quantitative determination of mtDNA of CD14⁺ monocyte. B, quantitative determination of mtDNA of all cell populations circulating in the blood.

сравнению со здоровым контролем [5, 12]. Было обнаружено, что количество копий мтДНК негативно связано с развитием метаболического синдрома, сахарного диабета 2-го типа [7] и хронической болезни почек [11].

Предыдущее исследование количества копий мтДНК в периферической крови пациентов с ССД показало, что количество копий мтДНК было ниже у пациентов с ССД по сравнению со здоровыми участниками исследования [13]. Исследования количества копий мтДНК при других ревматических заболеваниях показали противоречивые результаты. В частности, при системной красной волчанке (СКВ) количество копий мтДНК в плазме было увеличено в 8,8 раза по сравнению с контрольной группой [9]. Рост числа циркулирующей мтДНК, в отличие от числа копий ядерной ДНК, был отмечен у больных СКВ даже в случае ремиссии заболевания и оказался более тесно связанным с активностью СКВ, чем признанные маркеры активности заболевания (уровни комплемента, титры антител к двухцепочечной ДНК). Исследование пациентов с другим аутоиммунным заболеванием — синдромом Шегрена, показало уменьшение количества копий мтДНК и увеличение экспрессии генов, связанных с митохондриальной динамикой, в периферической крови по сравнению со здоровыми субъектами [4].

Важным результатом исследования стала связь более длительного течения ССД с меньшим количеством копий мтДНК. Предположительно

это может происходить за счет элиминации дисфункциональных митохондрий. Поврежденные митохондрии могут вызвать гибель клеток, после чего высвобождение мтДНК способствует усилению системного воспаления за счет активации иммунных клеток [6].

В моноцитах больных с меньшей длительностью ССД увеличение количества митохондрий может быть следствием компенсаторного механизма, необходимого для поддержания сниженной функции дефектных митохондрий, который угасает при длительном течении заболевания [6].

Выявленная в нашей работе ассоциация повышенной ЛПС-стимулированной секреции IL-6 с более высоким количеством копий мтДНК в CD14⁺ моноцитах позволяет предположить важную роль митохондриальной дисфункции в провоспалительной активации моноцитов при ССД. Несколько недавних исследований числа копий мтДНК, митохондриальной гетероплазии и митофагии при других аутоиммунных ревматических заболеваниях показывают, что митохондриальная дисфункция принимает участие в активации врожденной иммунной системы в патогенезе данных заболеваний [14, 17].

Выводы

Увеличение числа копий мтДНК в CD14⁺ моноцитах является возможным механизмом поддержания сниженной функции дефектных митохондрий в моноцитах пациентов с ССД, связанной с развитием и прогрессированием ССД.

Список литературы / References

1. Ashar F.N., Zhang Y., Longchamps R.J., Lane J., Moes A., Grove M.L., Mychaleckyj J.C., Taylor K.D., Coresh J., Rotter J.I., Boerwinkle E., Pankratz N., Guallar E., Arking D.E. Association of mitochondrial DNA copy number with cardiovascular disease. *JAMA Cardiol.*, 2017, Vol. 2, no. 11, pp. 1247-1255.
2. Bai R.K., Wong L.J.C. Simultaneous detection and quantification of mitochondrial DNA deletion(s), depletion, and over-replication in patients with mitochondrial disease. *J. Mol. Diagn.*, 2005, Vol. 7, no. 5, pp. 613-622.
3. Brown M., O'Reilly S. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2019, Vol. 195, no. 3, pp. 310-321.
4. De Benedittis G., Latini A., Colafrancesco S., Priori R., Perricone C., Novelli L., Borgiani P., Ciccacci C. Alteration of mitochondrial DNA copy number and increased expression levels of mitochondrial dynamics-related genes in sjögren's syndrome. *Biomedicines*, 2022, Vol. 10, no. 11, 2699. doi: 10.3390/biomedicines10112699.
5. Ding X., Fang T., Pang X., Pan X., Tong A., Lin Z., Zheng S., Zheng N. Mitochondrial DNA abnormalities and metabolic syndrome. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2023, Vol. 11, 1153174. doi: 10.3389/fcell.2023.1153174.
6. Faas M.M., de Vos P. Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2020, Vol. 1866, no. 10, 165845. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165845.
7. Fazzini F., Lamina C., Raftopoulou A., Koller A., Fuchsberger C., Pattaro C., del Greco F.M., Döttelmayer P., Fendt L., Fritz J., Meiselbach H., Schönherr S., Forer L., Weissensteiner H., Pramstaller P.P., Eckardt K.U., Hicks A.A., Kronenberg F. Association of mitochondrial DNA copy number with metabolic syndrome and type 2 diabetes in 14 176 individuals. *J. Intern. Med.*, 2021, Vol. 290, no. 1, pp. 190-202.
8. Fullard N., O'Reilly S. Role of innate immune system in systemic sclerosis. *Semin. Immunopathol.*, 2015, Vol. 37, no. 5, pp. 511-517.

9. Giaglis S., Daoudlarian D., Voll R.E., Kyburz D., Venhoff N., Walker U.A. Circulating mitochondrial DNA copy numbers represent a sensitive marker for diagnosis and monitoring of disease activity in systemic lupus erythematosus. *RMD Open*, 2021, Vol. 7, no. 3, e002010. doi:10.1136/RMDOPEN-2021-002010.
10. Gu F., Chauhan V., Kaur K., Brown W.T., LaFauci G., Wegiel J., Chauhan A. Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. *Transl. Psychiatry*, 2013, Vol. 3, no. 9, e299. doi:10.1038/TP.2013.68.
11. Malik A.N. Mitochondrial DNA – novel mechanisms of kidney damage and potential biomarker. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2023, Vol. 32, no. 6, pp. 528-536.
12. Malik A.N., Czajka A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*, 2013, Vol. 13, no. 5, pp. 481-492.
13. Movassaghi S., Jafari S., Falahati K., Ataei M., Sanati M.H., Jadali Z. Quantification of mitochondrial DNA damage and copy number in circulating blood of patients with systemic sclerosis by a qPCR-based assay. *An. Bras. Dermatol.*, 2020, Vol. 95, no. 3, pp. 314-319.
14. Quintero-González D.C., Muñoz-Urbano M., Vásquez G. Mitochondria as a key player in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 2022, Vol. 55, no. 8, pp. 497-505.
15. Shoop W.K., Gorsuch C.L., Bacman S.R., Moraes C.T. Precise and simultaneous quantification of mitochondrial DNA heteroplasmy and copy number by digital PCR. *J. Biol. Chem.*, 2022, Vol. 298, no. 11, 102574. doi: 10.1016/J.JBC.2022.102574.
16. Svendsen A.J., Tan Q., Jakobsen M.A., Thyagarajan B., Nygaard M., Christiansen L., Mengel-From J. White blood cell mitochondrial DNA copy number is decreased in rheumatoid arthritis and linked with risk factors. A twin study. *J Autoimmun.*, 2019, Vol. 96, pp. 142-146.
17. Veale D.J., Orr C., Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. *Semin. Immunopathol.*, 2017, Vol. 39, no. 4, pp. 343-354.
18. Yang S., Zhao M., Jia S. Macrophage: Key player in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1080310. doi: 10.3389/fimmu.2023.1080310.
19. Yang S.Y., Castellani C.A., Longchamps R.J., Pillalamarri V.K., O'rourke B., Guallar E., Arking D.E. Blood-derived mitochondrial DNA copy number is associated with gene expression across multiple tissues and is predictive for incident neurodegenerative disease. *Genome Res.*, 2021, Vol. 31, no. 3, pp. 349-358.
20. Zank D.C., Bueno M., Mora A.L., Rojas M. Idiopathic pulmonary fibrosis: Aging, mitochondrial dysfunction, and cellular bioenergetics. *Front. Med. (Lausanne)*, 2018, Vol. 5, 10. doi: 10.3389/fmed.2018.00010.

Авторы:

Герасимова Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела системных ревматических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, Россия

Богатырева А.И. — младший научный сотрудник отдела системных ревматических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой»; младший научный сотрудник, младший научный сотрудник отдела системных ревматических заболеваний Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Попкова Т.В. — д.м.н., начальник отдела системных ревматических заболеваний, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой», Москва, Россия

Герасимова Д.А. — младший научный сотрудник, ассистент кафедры организации и экономики фармации ФГАОВ «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия

Authors:

Gerasimova E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Systemic Rheumatic Diseases, V. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russian Federation

Bogatyрева A.I., Junior Research Associate, Department of Systemic Rheumatic Diseases, V. Nasonova Research Institute of Rheumatology; Junior Research Associate, Department of Systemic Rheumatic Diseases, A. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, V. Petrovsky Russian National Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

Popkova T.V., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Systemic Rheumatic Diseases, V. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russian Federation

Gerasimova D.A., Junior Research Associate, Assistant, Department of Organization and Economics of Pharmacy, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 29.03.2024
Принята к печати 05.04.2024

Received 29.03.2024
Accepted 05.04.2024

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗВИТИИ АУТОИММУННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ДИ ДЖОРДЖИ

Давыдова Н.В.¹, Зиновьева Н.В.¹, Зимин С.Б.², Шве́ц О.В.³,
Галеева Е.В.¹, Конопляникова Ю.Е.¹, Молочникова О.В.¹,
Петрова Ю.В.¹, Гильдеева Г.Н.⁴, Козлов И.Г.⁴

¹ ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗ г. Москвы», Москва, Россия

² ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница ДЗ г. Москвы», Москва, Россия

³ Поликлиника № 3 АО «Семейный доктор», Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Для пациентов с синдромом делеции 22q11.2 (синдром Ди Джорджи) характерно сочетание широкого спектра педиатрических проблем с иммунодефицитным состоянием, вызванным гипоплазией тимуса. Дефекты наблюдаются как в Т-клеточном, так и в В-клеточном звене иммунной системы, характеризуются Т-клеточной лимфопенией, изменением функций и субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов. Нарушения в лимфоцитарном гомеостазе могут приводить не только к тяжелым инфекционным заболеваниям, но и к жизнеугрожающим аутоиммунным осложнениям, особенно у детей старшего возраста. Целью настоящего исследования являлось сравнение субпопуляций Т- и В-лимфоцитов у пациентов с синдромом Ди Джорджи с аутоиммунными осложнениями и без осложнений и поиск прогностических признаков, предшествующих развитию осложнений. В исследование были включены 20 пациентов в возрасте от 10 до 18 лет с подтвержденным диагнозом синдром Ди Джорджи. Пациенты были разделены на 2 группы в соответствии с наличием и отсутствием аутоиммунных осложнений. Субпопуляции Т- и В-лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии. Не было обнаружено статистически значимых различий между субпопуляциями CD3 Т-лимфоцитов, CD4 Т-хелперов, CD8 Т-цитотоксических лимфоцитов и субпопуляциями Т-хелперов ($p > 0,05$). Однако в группе пациентов с аутоиммунными осложнениями было выявлено статистически значимое снижение CD45RA⁺ наивных Т-хелперов, как по относительному ($p = 0,020$), так и по абсолютному

Адрес для переписки:

Давыдова Наталья Владимировна
ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9
имени Г.Н. Сперанского ДЗ г. Москвы»
123317, Россия, Москва, Шмитовский пр-д, 29.
Тел.: 8 (916) 447-82-03.
E-mail: nata1902@yandex.ru

Address for correspondence:

Nataliia V. Davydova
G. Speransky City Children's Hospital No. 9
29 Shmitovsky Proezd
Moscow
123317 Russian Federation
Phone: +7 (916) 447-82-03.
E-mail: nata1902@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.В. Давыдова, Н.В. Зиновьева, С.Б. Зимин,
О.В. Шве́ц, Е.В. Галеева, Ю.Е. Конопляникова,
О.В. Молочникова, Ю.В. Петрова, Г.Н. Гильдеева,
И.Г. Козлов «Прогностические изменения субпопуляций
лимфоцитов при развитии аутоиммунных
осложнений у пациентов с синдромом Ди Джорджи»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4.
С. 777-786. doi: 10.15789/1563-0625-PCI-16947

© Давыдова Н.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.V. Davydova, N.V. Zinovieva, S.B. Zimin, O.V. Shvez,
E.V. Galeeva, Yu.E. Konoplyannikova, O.V. Molochnikova,
Yu.V. Petrova, G.N. Gildeeva, I.G. Kozlov "Prognostic
changes in lymphocyte subpopulations during the development
of autoimmune complications in patients with DiGeorge
syndrome", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 777-786.
doi: 10.15789/1563-0625-PCI-16947

© Davydova N.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-PCI-16947

количеству ($p = 0,025$) и регуляторных Т-клеток (соответственно, $p = 0,020$ и $p = 0,007$). Среди субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с аутоиммунными осложнениями было выявлено снижение В-клеток памяти по относительному ($p = 0,031$) и абсолютному количеству ($p = 0,005$) и переключенных В-клеток памяти ($p = 0,016$ и $p = 0,031$). Но транзиторные В-лимфоциты, наоборот, были повышены по относительному количеству ($p = 0,003$). По уровню плазмбластов, активированных В-лимфоцитов CD21^{low}CD38^{low}, IgM only В-клеток памяти расхождений между группами не было ($p > 0,05$). Проведенный ROC-анализ показал, что наиболее диагностически и прогностически значимые показатели среди Т-лимфоцитов — относительное количество CD45RA⁺ наивных Т-клеток (cut-off $\leq 28,7\%$), среди В-лимфоцитов — относительное (cut-off $\leq 5,0\%$) и абсолютное количество (cut-off ≤ 11 клеток/мкл) переключенных В-клеток памяти и относительное количество транзиторных В-клеток (cut-off $\geq 12,9\%$). Патология развития тимуса у больных с синдромом Ди Джорджи вызывает нарушение созревания как Т-, так и В-лимфоцитов, приводящее к развитию тяжелых форм аутоиммунных осложнений. Наши данные подтверждают важную роль регулярного иммунофенотипирования лимфоцитов, а особенно субпопуляций CD45RA⁺ наивных Т-клеток, переключенных В-клеток памяти и транзиторных В-клеток в прогнозировании аутоиммунных осложнений у данной категории пациентов.

Ключевые слова: синдром Ди Джорджи, del22q11.2, аутоиммунные осложнения, иммунная тромбоцитопения, лимфоциты, наивные Т-лимфоциты, переключенные В-клетки памяти, транзиторные В-клетки

PROGNOSTIC CHANGES IN LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS DURING THE DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNE COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH DIGEORGE SYNDROME

Davydova N.V.^a, Zinovieva N.V.^a, Zimin S.B.^b, Shvez O.V.^c,
Galeeva E.V.^a, Konoplyannikova Yu.E.^a, Molochnikova O.V.^a,
Petrova Yu.V.^a, Gildeeva G.N.^d, Kozlov I.G.^d

^a G. Speransky City Children's Hospital No. 9, Department of Health of Moscow, Moscow, Russian Federation

^b Morozov City Children's Hospital, Department of Health of Moscow, Moscow, Russian Federation

^c Polyclinic No. 3 of JSC "Family Doctor", Moscow, Russian Federation

^d I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Patients with 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome) are characterized by a combination of a wide range of pediatric problems with an immunodeficiency. Defects are characterized by T cell lymphopenia, changes in the functions and subpopulation composition of T and B lymphocytes. Disturbances in lymphocyte homeostasis can lead not only to severe infectious diseases, but also to autoimmune complications, especially in older children. The purpose of this study was to compare the subpopulations of T and B lymphocytes with and without autoimmune complications and to search for prognostic signs that precede the development of complications. The study included 20 patients aged 10 to 18 years with a confirmed diagnosis of DiGeorge syndrome. The patients were divided into 2 groups, according to the presence or absence of autoimmune complications. Subpopulations of lymphocytes were assessed by flow cytometry. No statistically significant differences were found between CD3 T lymphocytes, CD4 T helper, CD8 T cytotoxic and subpopulations of T helper ($p > 0.05$). However, in the group of patients with autoimmune complications, a statistically significant decrease in CD45RA⁺ naive T helper cells was detected, both in relative ($p = 0.020$) and absolute number ($p = 0.025$) and regulatory T cells (respectively, $p = 0.020$ and $p = 0.007$). Among B-lymphocyte in patients with autoimmune complications, a decrease in memory B cells in relative ($p = 0.031$) and absolute number ($p = 0.005$) and switched memory ($p = 0.016$ and $p = 0.031$) was detected. But transitional B lymphocytes, on the contrary, were increased in relative quantity ($p = 0.003$). There were no differences between the groups in the level of plasmablasts, activated B-lymphocytes CD21^{low}CD38^{low}, IgM only B-cells ($p > 0.05$). The ROC analysis showed that the most diagnostically and prognostically significant indicators are the relative number of CD45RA⁺ naive T cells (cut-off $\leq 28.7\%$), switched memory B cells — relative (cut-off $\leq 5.0\%$) and the absolute number (cut-off ≤ 11 cells/ μ L) and the relative number of transitional B cells (cut-off $\geq 12.9\%$). Our data

confirm the important role of regular immunophenotyping and especially subpopulations of CD45RA⁺ naive T cells, switched memory B cells and transitional B cells in predicting autoimmune complications in this category of patients.

Keywords: DiGeorge syndrome, del22q11.2, autoimmune complications, immune thrombocytopenia, lymphocytes, naive T lymphocytes, switched memory B cells, transitional B cells

Введение

Синдром Ди Джорджи (СДД) вызван гетерогенной субмикроскопической делецией длинного плеча 22-й хромосомы — del22q11.2, которая является одной из самых частых делеций в человеческом геноме: 1:4000 [3]. Большинство случаев del22q11.2 (> 90%) возникает *de novo*, с отсутствием микроделеции у обоих родителей [11]. Следствием микроделеции del22q11.2 является потеря важных для дальнейшего развития генов, один из ведущих TBX1. В результате этого отмечается нарушение эмбриогенеза III и IV глоточных карманов, из которых в норме на 6-й неделе внутриутробного развития формируются тимус и парашитовидные железы. Одновременно происходит патологический эмбриогенез других структур: сердца, крупных магистральных сосудов, лицевых костей черепа. СДД — один из самых вариабельных и мультисистемных клинических синдромов. Основными признаками СДД являются пороки сердца и определенные дисморфические черты лица (антимонголоидный разрез глаз, низкопосаженные уши, широкая переносица, микрогнатия, расщелина губы и неба, расщепленный небный язычок, мелкие зубы и др.), гипокальциемия в результате гипоплазии парашитовидных желез и гипоплазия или аплазия тимуса с дальнейшим развитием иммунодефицитного состояния. Часто встречающиеся неврологические нарушения: задержка речи и психического развития, судороги, тики, а также аномалии скелета, такие как сколиоз, вальгусная деформация стоп, задержка роста и веса [12].

Для СДД характерно сочетание огромного спектра педиатрических проблем с иммунодефицитным состоянием, вызванным гипоплазией тимуса. У пациентов с СДД дефекты наблюдаются как в Т-клеточном, так и в В-клеточном звене. У большинства пациентов снижены Т-лимфоциты, наивные Т-лимфоциты, наблюдаются изменения в субпопуляционном составе Т-хелперов. Количество В-лимфоцитов в норме или повышено, однако часто снижены В-лимфоциты памяти [7]. Нарушения в лимфоцитарном гомеостазе могут приводить к аутоиммунным осложнениям (АО), одним из самых тяжелых и жизнеугрожающих. У пациентов с СДД были выявлены различные аутоиммунные заболевания, включающие ювенильный ревматоидный артрит (ЮРА), хроническую иммунную

тромбоцитопению (хр. ИТП), аутоиммунную гемолитическую анемию (АИГА), неспецифический язвенный колит (НЯК), тиреоидит, частота которых была выше, чем в общей популяции [10, 13, 14, 17]. Гипоплазия тимуса у пациентов с СДД компенсируется механизмом гомеостатической пролиферации на периферии, который приводит к Т-клеточному истощению и появлению маркеров, ассоциированных со старением. Возможно, Т-клеточное истощение является причиной того, что аутоиммунные осложнения прогрессируют у этих больных с возрастом [15, 19].

Целью настоящего исследования было сравнение субпопуляций Т- и В-лимфоцитов у пациентов с СДД с АО и без осложнений в старшей возрастной группе 10-18 лет и поиск прогностических признаков, предшествующих развитию АО.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Исследование проведено в ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского. Пациенты с СДД поступали на обследование в отделение аллергологии и иммунологии в период с 2013 по 2023 год. Все пациенты имели подтвержденную молекулярно-генетическими методами делецию 22q11.2 (секвенирование по Сенгеру, метод FISH, MALP, СМА). В исследование были включены 20 пациентов в возрасте от 10 до 18 лет с подтвержденным диагнозом СДД. Пациенты были разделены на 2 группы в соответствии с наличием (АО) и отсутствием аутоиммунных осложнений (БАО).

Письменное разрешение родителей было получено на все проводимые исследования в соответствии с решением этического комитета.

Анализ субпопуляций Т-лимфоцитов

Субпопуляции лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии. Свежую периферическую цельную кровь с ЭДТА инкубировали с антителами в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Т-лимфоциты, Т-хелперы и Т-цитотоксические лимфоциты определяли с помощью 4-цветного антитела Малти-тест CD3FITC/CD8 PE/CD45PerCp/CD4 APC. Наивные Т-клетки и Т-клетки памяти исследовали с помощью комбинации антител CD3 APC/CD4 FITC/CD8 PerCp/CD45RAPE-Cy7/CD45RO PE. Для исследования Т-регуляторных

клеток применяли коктейль антител CD4FITC/CD25PE-Cy7/CD127 APC. Для оценки субпопуляций Т-хелперов Th1, Th2, Th17, Th17.1 кровь инкубировали с антителами CD3 PerCp/CD4 FITC/CD196 BV421/CD183 PE в течение 30 мин при температуре 4 °С. После инкубации с антителами кровь лизировали раствором FACS Lysing в течение 10 мин, отмывали от лизирующего раствора буфером CellWash, образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) в программе FACSDiva 7.0. Все используемые наборы антител и растворы были от компании Becton Dickinson (США).

Анализ субпопуляций В-лимфоцитов

Для окрашивания В-лимфоцитов аликвоту цельной крови с ЭДТА (200–300 мкл) отмывали 3 раза буфером CellWash с добавлением 0,2%-ного бычьего сывороточного альбумина от иммуноглобулинов, неспецифически связывающихся с антителами. Отмытую кровь инкубировали с антителами в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Для исследования В-лимфоцитов наивных и В-лимфоцитов памяти использовали комбинацию антител CD19 PC5 (Beckman Coulter, Франция)/CD27 PE (Becton Dickinson, США)/IgD FITC (Thermo Fisher, США)/IgM APC (Thermo Fisher, США). Транзиторные В-лимфоциты, плазмабласты и активированные В-лимфоциты оценивали с помощью комбинации антител CD19 PC5 (Beckman Coulter, Франция)/CD38 (Beckman Coulter, Франция) PE/CD21 FITC (Beckman Coulter, Франция)/IgM APC (Thermo Fisher, США). После инкубации с антителами все манипуляции проводились так же, как описано в предыдущем абзаце.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли в программе SPSS Statistics, версия 20 (IBM, США). Показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения использовали t-критерий Стьюдента, в случае распределения отличного от нормального U-критерий Манна–Уитни для независимых выборок. Для ROC-анализа и подсчета cut-off применяли программу easyROC a web-tool for ROC curve analysis, версия 1.3.1. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Клиническая характеристика пациентов

Все 20 пациентов с СДД были подразделены на две группы: группа АО включала 8 пациентов, группа БАО — 12 пациентов. В таблице 1 пред-

ставлены демографические и основные клинические данные пациентов в обеих группах. Не было статистически значимых различий по полу и возрасту и по основным клиническим симптомам СДД: врожденные пороки сердца, неврологические осложнения, аномалии скелета и черепно-лицевые дисморфизмы, тяжелые инфекции (пневмонии). Однако у пациентов с АО была достоверно выражена лимфопролиферация (АО 50%, БАО 8,3%, $p = 0,035$), которая проявлялась фолликулярной гиперплазией лимфоузлов, гепато и спленомегалией. В таблице 2 дана характеристика аутоиммунных осложнений у группы АО. АО были представлены хр. ИТП ($n = 6/8$), нейтропенией ($n = 3/8$), иммунной энтеропатией ($n = 2/8$), ЮРА ($n = 1/8$), АИГА ($n = 2/8$) и ИБЛ ($n = 2/8$).

Субпопуляции Т-лимфоцитов

Не было получено статистически значимых различий между абсолютным и относительным количеством CD3⁺Т-лимфоцитов, а также их основных субпопуляций CD4⁺Т-хелперов и CD8⁺Т-цитотоксических лимфоцитов у исследуемых групп пациентов. Анализ основных субпопуляций Т-хелперов также не выявил значимых различий между группами СДД с АО и БАО ($p > 0,05$). Однако оценка дифференцировки Т-лимфоцитов по экспрессии маркеров CD45RA (наивные Т-клетки) и CD45RO (Т-клетки памяти) выявила статистически значимое снижение наивных CD4⁺, как по относительному (АО 20,9%, БАО 36,6%, $p = 0,020$), так и по абсолютному количеству (АО 39,2, БАО 164,5, $p = 0,025$) в группе пациентов с АО. Для наивных CD8⁺ лимфоцитов не было получено статистически значимых различий между группами. CD4⁺ памяти отличались только по относительному количеству (АО 73, 4%, БАО 57,8%, $p = 0,034$), тогда как CD8⁺ памяти, наоборот, были снижены в группе АО только по абсолютному количеству (АО 83,8, БАО 193,9, $p = 0,002$) (рис. 1, 2).

Т-регуляторные клетки (Treg) по полученным данным были снижены в группе АО, как по относительному (АО 4,2%, БАО 6,7%, $p = 0,020$), так и по абсолютному количеству (АО 12,8, БАО 31,1, $p = 0,007$) (рис. 1, 2).

Проведенный ROC-анализ выявил, что наиболее диагностически и прогностически значимый показатель среди Т-лимфоцитов с высокой чувствительностью и специфичностью — это относительное количество CD45RA⁺ наивных Т-клеток, cut-off по которому составил $\leq 28,7\%$ (табл. 3).

Субпопуляции В-лимфоцитов

Комбинация антител, применяемая в нашем исследовании, позволила оценить несколько субпопуляций В-лимфоцитов, отражающих

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ В ГРУППАХ АО И БАО

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS IN GROUPS AC AND nAC

	АО AC	БАО nAC	p
Пол (м/ж, %) Sex (M/F, %)	5/3 (62,5/37,5)	6/6 (50/50)	0,582
Возраст (г.) Age (y)	13,3±2,7	12,30±2,06	0,473
Пороки сердца Cardiopathy	75%	83%	0,648
Неврологические осложнения Neurological complications	62,5%	75%	0,550
Аллергии Allergies	37,5%	8,3%	0,110
Тяжелые инфекции Severe infections	50%	42%	0,714
Лимфопролиферация Lymphoproliferation	50%	8,3%	0,035
Патология ЖКТ Gastrointestinal anomalies	25%	25%	1,000
Аномалии скелета Skeletal abnormalities	50%	58%	0,714
Челюстно-лицевые дисморфизмы Maxillofacial dysmorphisms	62,5%	67%	0,848

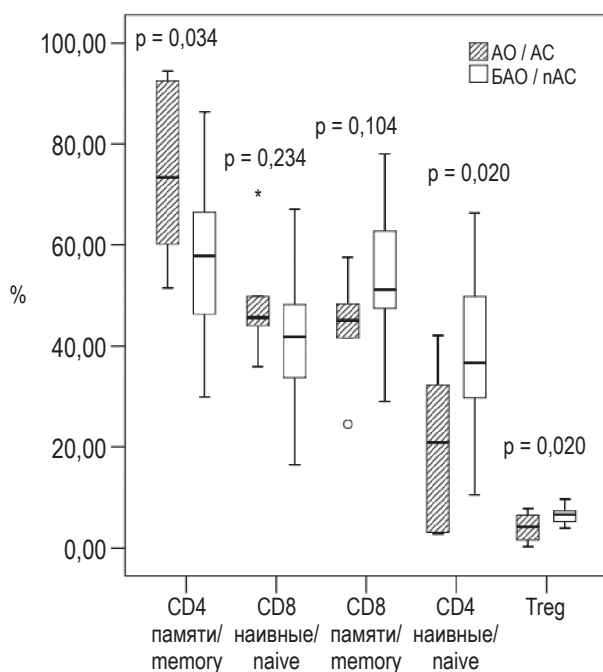


Рисунок 1. Субпопуляции Т-лимфоцитов, отн. количество

Figure 1. Subpopulations of T lymphocytes, rel. quantity

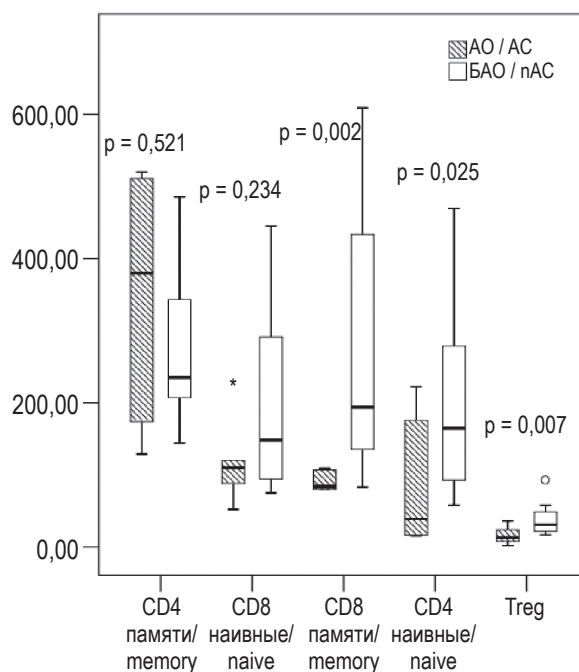


Рисунок 2. Субпопуляции Т-лимфоцитов, абс. количество (клетки/мкл)

Figure 2. Subpopulations of T lymphocytes, abs. quantity (cells/μL)

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА АУТОИММУННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF AUTOIMMUNE COMPLICATIONS

Пациент Patients	Возраст (годы) Age (y)	Пол (М/Ж) Sex (M/F)	Аутоиммунные осложнения Autoimmune complications
1	17	М M	Хр. ИТП ITP
2	12	Ж F	Нейтропения, Хр. ИТП, ИБЛ Neutropenia, ITP, ILD
3	14	М M	НЯК, Хр. ИТП NUC, ITP
4	14	Ж F	Хр. ИТП, Нейтропения, АИГА, ИБЛ ITP, Neutropenia, AIHA, ILD
5	13	М M	Хр. ИТП ITP
6	17	М M	Хр. ИТП, нейтропения, АИГА ITP, Neutropenia, AIHA
7	10	Ж F	ЮРА JRA
8	10	М M	Иммунная энтеропатия, б-нь Крона? Immune enteropathy, Crohn's disease?

Примечание. Хр. ИТП – хроническая иммунная тромбоцитопения, НЯК – неспецифический язвенный колит, ИБЛ – интерстициальная болезнь легких, ЮРА – ювенильный ревматоидный артрит, АИГА – аутоиммунная гемолитическая анемия.

Note. ITP, chronic immune thrombocytopenia; NUC, nonspecific ulcerative colitis; ILD, interstitial lung disease; JRA, juvenile rheumatoid arthritis; AIHA, autoimmune hemolytic anemia.

различные стадии их дифференцировки. С помощью дифференциальной экспрессии молекул CD27 и IgD выявляли В-клетки памяти ($CD19^+CD27^+$), непереключенные В-клетки памяти ($CD19^+IgD^+CD27^+$), переключенные В-клетки памяти ($CD19^+IgD^-CD27^+$), двойные негативные клетки памяти ($CD19^+IgD^-CD27^-$) и клетки памяти, продуцирующие только IgM (IgM only).

У пациентов с АО было выявлено снижение относительного (АО 16,5%, БАО 23,1%, $p = 0,053$) и абсолютного количества В-лимфоцитов (АО 189,1, БАО 377,8, $p = 0,020$). В-клетки памяти также были значимо снижены по относительному (АО 6,8%, БАО 14,2%, $p = 0,031$) и абсолютному количеству (АО 10,8, БАО 65,3, $p = 0,005$). Для переключенных В-клеток памяти была характерна та же тенденция: (АО 3,2%, БАО 8,0% $p = 0,016$) и (АО 5,8, БАО 33,5, $p = 0,031$), тогда как непереключенные В-клетки памяти демонстрировали статистически значимое снижение только по абсолютному количеству (АО 5,8, БАО 29,3, $p = 0,022$) (рис. 3, 4). IgM only В-клетки не отличались у этих групп пациентов (АО 20,2%, БАО 18,9%, $p = 0,592$).

Транзиторные В-лимфоциты ($CD19^+IgM^{high}CD38^{high}$) и плазмобласты ($CD19^+IgM^-CD38^{high}$) оценивали по разному уровню экспрессии поверхностного

IgM. У пациентов с АО наблюдалось повышение относительного количества транзиторных В-лимфоцитов (АО 13,8%, БАО 5,9%, $p = 0,003$) (рис. 3, 4), тогда как по уровню плазмобластов расхождений между группами не было (АО 1,0%, БАО 0,7%, $p = 0,340$). Не было получено различий между группами также по количеству активированных В-лимфоцитов, которые оценивали по экспрессии маркеров $CD21^{low}CD38^{low}$ (АО 5,3%, БАО 4,7%, $p = 0,837$).

Среди субпопуляций В-лимфоцитов, статистически значимо отличающихся между группами, наиболее прогностически значимыми показателями по нашим данным оказались относительное ($cut-off \leq 5,0\%$) и абсолютное количество ($cut-off \leq 11$) переключенных В-клеток памяти и относительное количество транзиторных В-клеток ($cut-off \geq 12,9\%$) (табл. 3).

В данном исследовании мы сфокусировались на состоянии субпопуляций лимфоцитов у пациентов с СДД с АО. Мы включили в исследование группу пациентов старшего возраста от 10 до 18 лет, в которой было больше пациентов с АО, чем в младших возрастных группах. В этой группе было 8 пациентов с различными АО, с преобладанием хр. ИТП (6 пациентов из 8), которая является самым частым АО при СДД [4, 9]. В половине случаев хр. ИТП сочеталась с

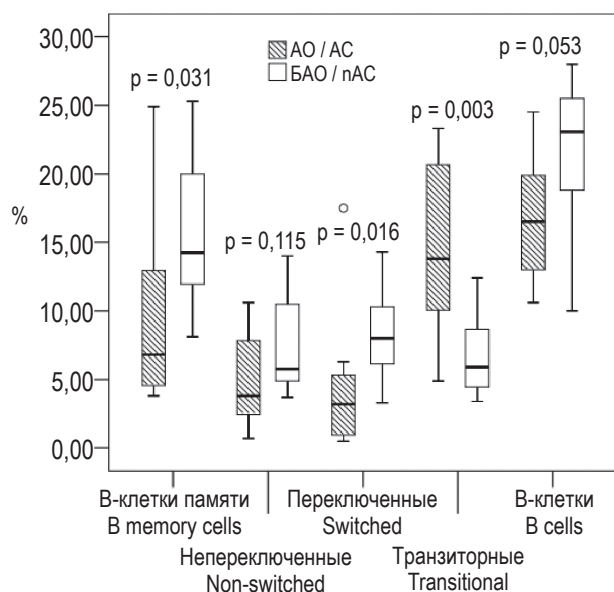


Рисунок 3. Субпопуляции В-лимфоцитов, отн. количество
Figure 3. Subpopulations of B lymphocytes, rel. quantity

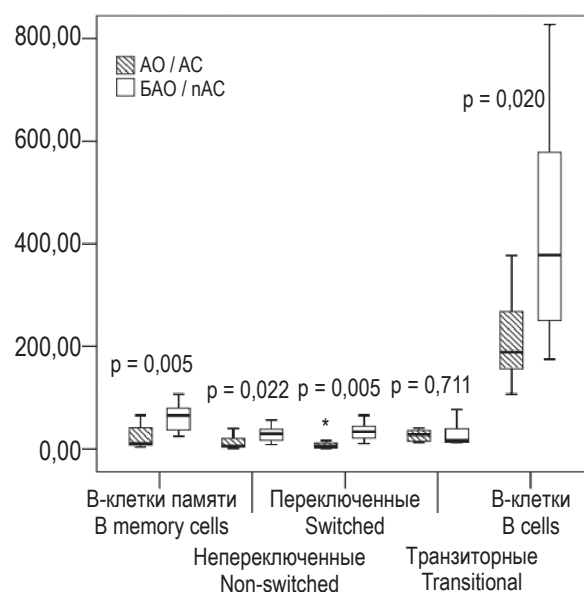


Рисунок 4. Субпопуляции В-лимфоцитов, абс. количество (клетки/мкл)
Figure 4. Subpopulations of B lymphocytes, abs. quantity (cells/ μ L)

ТАБЛИЦА 3. РОС-АНАЛИЗ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ

TABLE 3. ROC ANALYSIS OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS

Субпопуляции Subpopulations	Cut-off	Чувстви- тельность, % Sensitivity, %	Специфич- ность, % Specificity, %	Диагностическая эффективность, % Accuracy, %	AUC	p
Т-хелперы наивные, % T helper naïve, %	28,7	83,3	75,0	79,1	0,791	0,007
Т-хелперы наивные, абс. T helper naïve, abs.	58	100	62,5	81,2	0,802	0,006
Treg, %	4,6	91,7	62,5	77,1	0,750	0,049
Treg, абс. Treg, abs.	17	100	62,5	81,2	0,854	0,0002
В-клетки, % B cells, %	21,0	66,7	87,5	77,1	0,771	0,012
В-клетки, абс. B cells, abs.	298	75,0	87,5	81,25	0,843	0,0001
В-клетки памяти, % B memory cells, %	10,1	91,7	62,5	77,1	0,786	0,022
В-клетки памяти, абс. B memory cells, abs.	25	100	62,5	81,25	0,859	< 0,001
В-клетки памяти непереключенные, абс. B memory non-switched, abs.	9	100	62,5	81,25	0,812	0,006
В-клетки памяти переключенные, % B memory switched, %	5,0	91,7	75,0	83,3	0,823	0,010
В-клетки памяти переключенные, абс. B memory switched, abs.	11	100	75,0	87,5	0,864	0,0015
В-клетки наивные, % B naïve cells, %	86,4	75,0	91,7	83,3	0,802	0,013
В-клетки наивные, абс. B naïve cells, abs.	240	66,7	87,5	77,1	0,770	0,014
В-клетки транзиторные, % B transitional cells, %	12,9	71,4	100	85,7	0,869	0,0001

другими АО: нейтропения, ИБЛ, НЯК. А у двух пациентов наблюдались отдельно ЮРА и неуточненная иммунная энтеропатия. Клинически пациенты с АО почти ничем не отличались от пациентов без АО, кроме выраженной лимфо-пролиферации, связанной, по всей видимости, с развитием аутоиммунного процесса. Наши исследования выявили, что пациенты с АО имеют специфические изменения в субпопуляциях Т- и В-лимфоцитов. Мы не нашли отличий по основным субпопуляциям Т-лимфоцитов (Т-хелперы и Т-цитотоксические), которые снижены у пациентов с СДД, и по субпопуляциям Т-хелперов [1, 15, 18, 19], но нашли статистически значимые различия по наивным $CD4^+CD45RA^+$, которые подтверждаются предыдущими исследованиями [4, 13]. Также нами было получено значимое снижение Treg. Наши данные подтверждают, что гипоплазия тимуса у больных с СДД, с которой связан низкий выход наивных Т-лимфоцитов, Treg, редуцированный репертуар Т-клеточного рецептора, гомеостатическая пролиферация Т-лимфоцитов на периферии, неполная негативная селекция в тимусе является причиной развития АО [2, 6, 19].

Имунофенотипические изменения не ограничиваются только субпопуляцией Т-лимфоцитов. Мы наблюдали значительное снижение В-лимфоцитов, В-клеток памяти и переключенных В-клеток памяти у пациентов с АО. Переключенные В-клетки памяти являются тимус-зависимыми, т. е. они созревают в герминальных центрах лимфоузлов при тесном взаимодействии с фолликулярными Т-лимфоцитами. По данным некоторых источников у больных с СДД наблю-

дается дисфункция фолликулярных Т-клеток, которая, возможно, и является причиной нарушения дифференцировки В-клеток памяти. Особенно выражены такие нарушения у взрослых пациентов [5, 8]. Кроме того, по нашим данным у пациентов с АО значимо повышено относительное количество транзиторных В-лимфоцитов и не наблюдается повышения активированных $CD21^{low}CD38^{low}$ В-лимфоцитов, часто ассоциирующегося с АО [16].

Заключение

Важным результатом нашего исследования является оценка прогностических изменений в иммунном статусе у пациентов с СДД. Наиболее значимыми субпопуляциями для прогноза развития АО по нашим данным являются наивные Т-лимфоциты, переключенные В-клетки памяти и транзиторных В-лимфоциты. Данные ниже cut-off по наивным Т-лимфоцитам и переключенным В-клеткам памяти и выше cut-off по транзиторным клеткам у больных с СДД с большой долей вероятности могут свидетельствовать об угрозе возникновения АО. В исследовании D. Montin и соавт. [8] показано, что аномалии в субпопуляциях лимфоцитов у пациентов с СДД появляются перед дебютом гематологических АО, таких как хр. ИТП и АИГА. Поэтому необходимо систематическое иммунофенотипирование пациентов с этим диагнозом, чтобы выявить пациентов с риском развития АО.

Наши данные подтверждают критическую роль иммунофенотипирования лимфоцитов в прогнозировании тяжелых АО у пациентов с СДД.

Список литературы / References

1. Швец О.В., Давыдова Н.В., Зимин С.Б., Котлукова Н.П., Бочарова К.А., Продеус А.П., Щербина А.Ю. Клинические и лабораторные проявления дефектов иммунной системы у пациентов синдромом DEL22Q11.2 (Синдром Ди Джорджи) // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2013. Т. 12, № 4 С. 23-30. [Shvets O.V., Davydova N.V., Zimin S.B., Kotlukova N.P., Bocharova K.A., Prodeus A.P., Shcherbina A. Clinical and laboratory manifestations of immune system defects in patients with DEL22Q11.2 syndrome (DiGeorge Syndrome). *Voprosy gematologii, onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology / Oncology and Immunopathology*, 2013, Vol. 12, no. 4, pp. 23-30. (In Russ.)]
2. Borna S., Dejene B., Lakshmanan U., Schulze J., Weinberg K., Bacchetta R. Analyses of thymocyte commitment to regulatory T cell lineage in thymus of healthy subjects and patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 8, no. 14, 1088059. doi: 0.3389/fimmu.2023.1088059.
3. Botto L.D., May K., Fernhoff P.M., Correa A., Coleman K., Rasmussen S.A., Merritt R.K., O'Leary L.A., Wong L., Elixson E.M., Mahle W.T., Campbell R.M. A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects study in the population. *Pediatrics*, 2003, Vol. 112, no. 1, pp. 101-107.
4. Crowley T.B., Campbell I.M., Liebling E.J., Lambert M.P., Levitt Katz L.E., Heimall J., Bailey A., McGinn D.E., McDonald McGinn D.M., Sullivan K.E. Distinct immune trajectories in patients with chromosome 22q11.2 deletion syndrome and immune-mediated diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2022, Vol. 153, no.1, pp. 445-450.

5. Derfalvi B., Maurer K., McDonald McGinn D.M., Zackai E., Meng W., Luning Prak E.T., Sullivan K.E. B cell development in chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 163, pp. 1-9.
6. Di Cesare S., Puliafito P., Ariganello P., Marcovecchio G.E., Mandolesi M., Capolino R., Digilio M.C., Aiuti A., Rossi P., Cancrini C. Autoimmunity and regulatory T cells in 22q11.2 deletion syndrome patients. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2015, Vol. 26, no. 6, pp. 591-594.
7. Giardino G., Radwan N., Koletsi P., Morrogh D.M., Adams S., Ip W., Worth A., Jones A., Parsonson I.M., Gaspar H.B., Gilmour K., Davies E.G., Ladomenou F. Clinical and immunological features in a cohort of patients with partial DiGeorge syndrome followed at a single center. *Blood*, 2019, Vol. 133, pp. 2586-2596.
8. Klocperk A., Paračková Z., Bloomfield M., Rataj M., Pokorný J., Unger S., Warnatz K., Šedivá A. Follicular helper T cells in DiGeorge Syndrome. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 23, no. 9, 1730. doi: 10.3389/fimmu.2018.01730.
9. Lambert M.P., Aruselman A., Schott A., Markham S.J., Crowley T.B., Zackai E.H., McDonald-McGinn M.D. The 22q11.2 deletion syndrome: Cancer predisposition, platelet abnormalities and cytopenias. *Am. J. Med. Genet. A*, 2018, Vol. 176, no.10, pp. 2121-2127.
10. Lin H.Y., Tsai W.Y., Tung Y.C., Liu S.Y., Lee N.C., Chien N.H., Hwu W.L., Lee C.T. Endocrine and growth disorders in taiwanese children with 22q11.2 Deletion syndrome. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2022, Vol. 31, no. 13, 771100. doi: 10.3389/fendo.2022.771100.
11. McDonald-McGinn D.M., Zackai E.H. Genetic counseling for the 22q11.2 deletion. *Dev. Disabil. Res. Rev.*, 2008, Vol. 14, pp. 69-74.
12. McDonald-McGinn D.M., Sullivan K.E., Marino B., Philip N., Swillen A., Vorstman J., Zackai E.H., Emanuel B.S., Vermeesch J.R., Morrow B.E., Scambler P.J., Bassett A.S. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2015, Vol. 1, 15071. doi: 10.1038/nrdp.2015.71.
13. Montin D., Marolda A., Licciardi F., Robasto F., Di Cesare S., Ricotti E., Ferro F., Scaioli G., Giancotta C., Amodio A., Conti F., Giardino G., Leonardi L., Ricci S., Volpi S., Baselli L.A., Azzari C., Bossi G., Consolini R., Deppeliane R.M., Duse M., Gattorno M., Martire B., Putti M.C., Soresina A., Pebani A., Ramenghi U., Martino S., Pignata C., Cancrini C. Immunophenotype anomalies predict the development of autoimmune cytopenia in 22q11.2 Deletion syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2019, Vol. 7, no. 7, pp. 2369-2376.
14. Salehzadeh F., Bagheri A. Association of juvenile idiopathic arthritis and digeorge syndrome; a case report. *Iran J. Pediatr.*, 2014, Vol. 24, no. 3, pp. 334-336.
15. Smetanova J., Milota T., Rataj M., Bloomfield M., Sediva A., Adam Klocperk A. Accelerated Maturation, Exhaustion, and Senescence of T cells in 22q11.2 Deletion Syndrome. *J. Clin. Immunol.*, 2022, Vol. 42, no. 2, pp. 274-285.
16. Thorarinsdottir K., Camponeschi A., Gjertsson I., Mårtensson I-L. CD21-/low B cells: A snapshot of a unique B cell subset in health and disease. *Scand. J. Immunol.*, 2015, Vol. 82, no 3, pp. 254-261.
17. Uy R., Jacobs N., Mziray-Andrew C. Inflammatory bowel disease and diverticulosis in an adolescent with digeorge syndrome. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2016, Vol. 62, no. 5, pp. 43-45.
18. Vergaalen E., Schiweck C., van Steeland K. A pilot study on immuno-psychiatry in the 22q11.2 deletion syndrome: A role for Th17 cells in psychosis? *Brain Behav. Immun.*, 2018, Vol. 70, pp. 88-95.
19. Zemble R., Luning Prak E., McDonald K., McDonald-McGinn D., Zackai E., Sullivan K. Secondary immunologic consequences in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 136, pp. 409-418.

Авторы:

Давыдова Н.В. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики лабораторно-диагностического отделения ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗ г. Москвы», Москва, Россия

Зиновьева Н.В. — к.м.н., врач — аллерголог-иммунолог, заведующая отделением аллергологии и иммунологии № 1 ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗ г. Москвы», Москва, Россия

Зимин С.Б. — врач-педиатр, заведующий педиатрическим соматическим отделением ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница ДЗ г. Москвы», Москва, Россия

Швец О.В. — к.м.н., врач-педиатр, заместитель главного врача поликлиники № 3 АО «Семейный доктор», Москва, Россия

Галеева Е.В. — биолог, заведующая лабораторно-диагностическим отделением ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗ г. Москвы», Москва, Россия

Authors:

Davydova N.V., PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics of the Laboratory Diagnostic Department, G. Speransky City Children's Hospital No. 9, Department of Health of Moscow, Moscow, Russian Federation

Zinovieva N.V., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Head of the Department of Allergy and Immunology No. 1, G. Speransky City Children's Hospital No. 9, Department of Health of Moscow, Moscow, Russian Federation

Zimin S.B., Pediatricist, Head of the Pediatric Somatic Department, Morozov City Children's Hospital, Department of Health of Moscow, Moscow, Russian Federation

Shvez O.V., PhD (Medicine), Pediatricist, Deputy Chief Physician, Polyclinic No. 3 of JSC "Family Doctor", Moscow, Russian Federation

Galeeva E.V., Biologist, Head of the Laboratory Diagnostic Department, G. Speransky City Children's Hospital No. 9, Department of Health of Moscow, Moscow, Russian Federation

Конопляникова Ю.Е. — к.м.н., врач — аллерголог-иммунолог, заведующая Центром аллергологии и иммунологии ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗ г. Москвы», Москва, Россия

Молочникова О.В. — врач-педиатр Консультативно-диагностического центра ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗ г. Москвы», Москва, Россия

Петрова Ю.В. — врач-педиатр отделения аллергологии и иммунологии № 1 ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗ г. Москвы», Москва, Россия

Гильдеева Г.Н. — д.фарм.н., профессор, заведующая кафедрой организации и управления в сфере обращения лекарственных средств ИПО ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Козлов И.Г. — д.м.н., профессор кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств ИПО ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Konoplyannikova Yu.E., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Head of the Center for Allergology and Immunology, G. Speransky City Children's Hospital No. 9, Department of Health of Moscow, Moscow, Russian Federation

Molochnikova O.V., Pediatricist of the Consultative and Diagnostic Center, G. Speransky City Children's Hospital No. 9, Department of Health of Moscow, Moscow, Russian Federation

Petrova Yu.V., Pediatricist of the Department of Allergology and Immunology No. 1, G. Speransky City Children's Hospital No. 9, Department of Health of Moscow, Moscow, Russian Federation

Gildeeva G.N., MD, PhD (Pharmaceutics), Professor, Head of the Management and Organization of Drug Supply Chair, IPDE, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Kozlov I.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Management and Organization of Drug Supply Chair, IPDE, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 08.04.2024
Отправлена на доработку 09.04.2024
Принята к печати 12.04.2024

Received 08.04.2024
Revision received 09.04.2024
Accepted 12.04.2024

БОЛЕЗНЬ ГУЖЕРО–ХЕЙЛИ–ХЕЙЛИ: ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ, СОПРЯЖЕННОГО С ДИСРЕГУЛЯЦИЕЙ ИММУННОГО ОТВЕТА

Лазаренко Л.Л.¹, Шелипова А.А.², Сесь Т.П.¹

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

² Лечебно-диагностический центр «Здоровье», г. Великий Новгород, Россия

Резюме. В работе представлено описание клинического случая болезни Гужеро–Хейли–Хейли с доказанной дисрегуляцией иммунного ответа. Болезнь, известная так же как хроническая доброкачественная семейная пузырчатка, является редким генетическим заболеванием, вызывающим буллезное поражение кожи с внутриэпидермальной локализацией. Она названа в честь авторов, впервые описавших ее. В большинстве случаев болезнь Гужеро–Хейли–Хейли вызвана мутацией в гене АТР2С1, которая нарушает регуляцию кальция. Накопление кальция изменяет нормальную межклеточную адгезию в коже, что приводит к характерным буллезным поражениям кожи. Болезнь Гужеро–Хейли–Хейли наследуется по аутосомно-доминантному типу. Частота распространения в популяции составляет 1:50 000 человек. Однако разнообразие клинических фенотипов болезни без доказанной наследственной предрасположенности и отсутствием мутации в указанном гене позволяет утверждать о наличии других патогенетических факторов, в частности нарушений в иммунной системе. В описываемом нами клиническом случае не выявлено четкой генетической предрасположенности, но обнаружены серьезные нарушения в работе иммунной системы. В частности, практически отсутствуют ТНК-клетки. Анализ субпопуляций натуральных киллерных клеток свидетельствует об уменьшении относительного и абсолютного числа НК-клеток с экспрессией антигенов CD16 и CD56, НК-клеток с высокой цитолитической активностью, НК-клеток, экспрессирующих α -цепь антигена CD8 и обладающих способностью многократно выполнять свою цитолитическую функцию. При оценке субпопуляций В-клеток отмечается увеличение относительного содержания В2-клеток и В1-клеток, связанных с продукцией аутоантител, параллельно с ростом процента регуляторных Т-хелперных клеток, обладающих иммуносупрессорной функцией. Исходя из выявленных изменений в иммунной

Адрес для переписки:

Лазаренко Людмила Леонидовна
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6-8.
Тел.: 8 (981) 887-03-62.
E-mail: lazarenko@list.ru

Address for correspondence:

Liudmila L. Lazarenko
First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University
6-8 L. Tolstoy St
St. Petersburg
197022 Russian Federation
Phone: +7 (981) 887-03-62.
E-mail: lazarenko@list.ru

Образец цитирования:

Л.Л. Лазаренко, А.А. Шелипова, Т.П. Сесь «Болезнь
Гужеро–Хейли–Хейли: описание клинического случая,
сопряженного с дисрегуляцией иммунного ответа»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4.
С. 787-794.
doi: 10.15789/1563-0625-GHH-16777

© Лазаренко Л.Л. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

L.L. Lazarenko, A.A. Shelipova, T.P. Ses "Gougerot–
Hailey–Hailey disease: a case study associated with proven
dysregulation of the immune response", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 4,
pp. 787-794.
doi: 10.15789/1563-0625-GHH-16777

© Lazarenko L.L. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-GHH-16777

системе, нами проведена иммуномодулирующая терапия: дискретный плазмаферез, 5 процедур через 2 дня, далее внутривенное капельное введение нормального человеческого иммуноглобулина 25 мл (50 мкг/мл) через 3 дня, 5 инфузий. Динамика кожных проявлений свидетельствует об умеренном положительном эффекте. Очевидно, что требуется дальнейшее углубленное исследование иммунных параметров при болезни Гужеро–Хейли–Хейли, предположительно в системе врожденного иммунитета. Вероятно, успех в лечении и достижение стойкой ремиссии будут возможны при рациональном подборе антицитокиновой терапии.

Ключевые слова: болезнь Гужеро–Хейли–Хейли, доброкачественная семейная пузырчатка, иммунная дисрегуляция, генетическая предрасположенность, внутривенные иммуноглобулины, плазмаферез

GOUGEROT–HAILEY–HAILEY DISEASE: A CASE STUDY ASSOCIATED WITH PROVEN DYSREGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE

Lazarenko L.L.^a, Shelipova A.A.^b, Ses T.P.^a

^a First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b Diagnostic and Treatment Center “Zdorovye”, Velikii Novgorod, Russian Federation

Abstract. The paper presents a description of a clinical case of Gougerot–Hailey–Hailey disease with proven dysregulation of the immune response. The disease, also known as chronic benign familial pemphigus, is a rare genetic disorder that causes bullous skin lesions with intraepidermal localization. It is named after the authors who first described it. In most cases, Gougerot–Hailey–Hailey disease is caused by a mutation in the ATP2C1 gene that disrupts calcium regulation. Calcium accumulation alters normal intercellular adhesion in the skin, resulting in characteristic bullous skin lesions. Gougerot–Hailey–Hailey disease is inherited in an autosomal dominant pattern. The frequency of distribution in the population is 1:50000 people. However, the variety of clinical phenotypes of the disease without a proven hereditary predisposition and the absence of a mutation in this gene allows us to assert the presence of other pathogenic factors, in particular, disorders in the immune system. In the clinical case we are describing, no clear genetic predisposition was revealed, but serious disorders in the immune system were detected. In particular, TNK cells are virtually non-existent. Analysis of subpopulations of natural killer cells indicates a decrease in the relative and absolute numbers of NK cells expressing CD16 and CD56 antigens, NK cells with high cytolytic activity, NK cells expressing the α chain of the CD8 antigen and having the ability to repeatedly perform their cytolytic function. When assessing B cell subpopulations, there is an increase in the relative content of B2 cells and B1 cells associated with production of autoantibodies, in parallel with an increase in the percentage of regulatory T helper cells with immunosuppressive function. Based on the identified changes in the immune system, we performed immunomodulatory therapy: discrete plasmapheresis, 5 procedures in 2 days, then intravenous drip injection of normal human immunoglobulin 25 mL (50 μ g/mL) in 3 days, 5 infusions. The dynamics of cutaneous manifestations indicates a moderate positive effect. Obviously, further in-depth study of immune parameters in Gougerot–Hailey–Hailey disease, presumably in the innate immune system, is required. Probably, success in treatment and achievement of stable remission will be possible with the rational selection of anticytokine therapy.

Keywords: Gougerot–Hailey–Hailey disease, familial benign chronic pemphigus, immune dysregulation, genetic predisposition, intravenous immunoglobulines, plasmapheresis

Введение

Болезнь Гужеро–Хейли–Хейли, или доброкачественная семейная пузырчатка – наследственный буллезный дерматоз, характеризующийся внутриэпидермальной локализацией пузырей [1]. Впервые заболевание было описано Х. Гужеро в 1933 году, позднее, в 1939 году братья Х. Хейли и В. Хейли, опубликовали свои наблюдения. До сих пор в литературе ведется дискуссия, кому в действительности принадлежит приоритет описания этой патологии [5].

Болезнь Гужеро–Хейли–Хейли – редкий генодерматоз с аутосомно-доминантным типом наследования. Как правило (в 60-70% случаев), выявляют мутацию в гене АТР2С1, расположенного на хромосоме 3q21-q24, кодирующего секреторные проводящие пути $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ АТ-Фаз [4]. Однако разнообразие клинических фенотипов болезни без доказанной наследственной предрасположенности и отсутствием мутации в указанном гене позволяет утверждать о наличии других патогенетических факторов, в частности нарушений в иммунной системе [3]. Махнева Н.В. и Белецкая Л.В. [2] описывают наличие иммунных комплексов, содержащих иммуноглобулин G по десмосомам многослойного плоского эпителия, а также слабоаффинных IgG антител в эпидермисе с участием комплемента.

Клинически болезнь проявляется рецидивирующими везикулезными и буллезными высыпаниями на неизменной или гиперемированной коже, расположенными в естественных складках (подмышечные впадины, паховые складки), в области гениталий, реже на шее и грудной клетке. Обострения могут провоцировать механическая травма, солнечная инсоляция, гормональные перестройки (беременность, роды). Болезнь поражает как мужчин, так и женщин (в европейской и азиатской популяции страдают чаще мужчины, но в Италии – женщины [8]). Дебют болезни происходит в зрелом возрасте (20-40 лет). Эпидемиология – 1:50 000 человек [10]. Дифференциальный диагноз проводят чаще с болезнью Дарье Уайта, где происходит мутация в гене «белкового» сегмента ДНК (12g23-g24), что обуславливает более выраженный кератоз [6].

До сих пор не существует лечения болезни Гужеро–Хейли–Хейли с позиций доказательной медицины ввиду неполной изученности ее механизмов развития. Чаще используют симптоматическую наружную терапию с использованием анилиновых красителей, антибактериальных и противогрибковых средств для уменьшения

вторичной контаминации пораженных участков кожи. Описаны случаи положительного эффекта от применения ингибиторов кальциневрина. В тяжелых случаях используют системные глюкокортикоиды в средних дозах, ретиноиды, циклоспорин, метотрексат, фототерапию [7]. Имеются сведения об индукции ремиссии от применения иммунобиологической терапии – этанерсепта [9], ремикейда, дупилумаба, ретуксимаба [11]. Эти сведения косвенно подтверждает вовлечение иммунных механизмов в развитие болезни Гужеро–Хейли–Хейли.

Приводим собственное клиническое наблюдение болезни Гужеро–Хейли–Хейли.

Пациент Ш., 1981 г. р. (43 года), наблюдается в ООО «ЛДЦ «Здоровье» с 2019 года и ПСПбГМУ с 2023 г.

Жалобы на высыпания в области подмышечных ямок, паховой области в виде пузырьков, заполненных прозрачной жидкостью, с сочащейся поверхностью, после самостоятельного вскрытия образующие долго не заживающие эрозии, сопровождаемые зудом, болью и дискомфортом. Обострения частые, ремиссии очень редки.

Анамнез заболевания

Стал замечать проявления болезни с 2021 года, когда впервые появились высыпания на кистях и щиколотках в виде мелких пузырей. Обращался к дерматологу, был выставлен диагноз «дерматит». Получал лечение глюкокортикоидными мазями. Через 1,5 года высыпания возобновились, и появились новые очаги в области подмышечных ямок. Сначала последние были представлены в виде небольших очагов красного цвета с трещинами, купируемые топическими глюкокортикоидами. Одновременно появились высыпания в паховой области. В паху появлялись, но заживали самостоятельно, без применения мазей. В 2006 году (в возрасте 25 лет) произошло выраженное обострение с генерализацией кожного процесса. В областном кожно-венерологическом диспансере была взята биопсия и установлен диагноз «красный плоский лишай». После двухнедельного лечения в стационаре высыпания прошли. Ремиссия продолжалась лишь в течение 3 месяцев. В дальнейшем пациент обращался к разным специалистам, состоял на учете у главного специалиста области по дерматологии. Проводилось лечение парентеральными введениями преднизолона в средних дозах (25-30 мг) без видимого эффекта. В 2023 году пациент был консультирован в Первом Санкт-Петербургском медицинском университете им. Павлова. Прове-

ТАБЛИЦА 1. РАСШИРЕННОЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ. МЕТОД: ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ

TABLE 1. EXTENDED IMMUNOLOGICAL EXAMINATION. METHOD FLOW CYTOMETRY

Название/показатель Name/indicator	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	Референсные значения Reference values
Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻) T lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻)	1,11 × 10⁹/л 1.11 × 10 ⁹ /L	1,26 × 10⁹/л 1.26 × 10 ⁹ /L	0,80-2,20
Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻), % T lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻), %	65,30%	69,67%	60-80%
Т-хелперы/индукторы (CD3⁺CD4⁺CD45⁺) T helpers/inducers (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺)	0,68 × 10⁹/л 0.68 × 10 ⁹ /L	0,75 × 10⁹/л 0.75 × 10 ⁹ /L	0,50-1,20
Т-хелперы/индукторы (CD3⁺CD4⁺CD45⁺), % T helpers/inducers (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺), %	39,88%	41,22%	30-50%
Т-цитотоксические лимфоциты (Т-ЦТЛ) (CD3⁺CD8⁺CD45⁺) T cytotoxic lymphocytes (T-CTL) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺)	0,35 × 10⁹/л 0.35 × 10 ⁹ /L	0,41 × 10⁹/л 0.41 × 10 ⁹ /L	0,30-0,90
Т-цитотоксические лимфоциты (Т-ЦТЛ) (CD3⁺CD8⁺CD45⁺), % T cytotoxic lymphocytes (T-CTL) (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺), %	20,48%	22,43%	20-30%
Незрелые Т-лимфоциты (CD4⁺CD8⁺CD45⁺), % Immature T lymphocytes (CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺), %	0,33%	0,38%	0-2%
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркеры НК-клеток (Т-НК-клетки) (CD3⁺CD56⁺CD45⁺) T lymphocytes, NK cell expressing markers (T-NK cells) (CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺)	0,03 × 10⁹/л 0.03 × 10 ⁹ /L	0,00 × 10⁹/л 0.00 × 10 ⁹ /L	0,03-0,25
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркеры НК-клеток (Т-НК-клетки) (CD3⁺CD56⁺CD45⁺), % T lymphocytes, NK cell expressing markers (T-NK cells) (CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺), %	1,58%	0,00%	1,7-8,6%
Индекс CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ (Т-хелперы/ЦТЛ), % CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ Index (T helpers/CTL), %	1,95%	1,84%	1,2-2,5%
Истинные натуральные киллеры (НК-клетки) (CD3⁺CD56⁺CD45⁺) True Natural Killers (NK cells) (CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺)	0,28 × 10⁹/л 0.28 × 10 ⁹ /L	0,18 × 10⁹/л 0.18 × 10 ⁹ /L	0,12-0,40
Истинные натуральные киллеры (НК-клетки) (CD3⁺CD56⁺CD45⁺), % True Natural Killers (NK cells) (CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺), %	16,62%	10,12%	8-18%
НК-клетки, экспрессирующие альфа-цепь антигена CD8 (CD3⁺CD8⁺CD45⁺) NK cells, expressing the alpha chain of the CD8 antigen (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺)	0,10 × 10⁹/л 0.10 × 10 ⁹ /L	0,08 × 10⁹/л 0.08 × 10 ⁹ /L	0,06-0,28
НК-клетки, экспрессирующие альфа-цепь антигена CD8 (CD3⁺CD8⁺CD45⁺), % NK cells, expressing the alpha chain of the CD8 antigen (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺), %	6,09%	4,52%	2-12%
В-лимфоциты (CD19⁺CD3⁻) B lymphocytes (CD19 ⁺ CD3 ⁻)	0,27 × 10⁹/л 0.27 × 10 ⁹ /L	0,34 × 10⁹/л 0.34 × 10 ⁹ /L	0,10-0,50
В-лимфоциты (CD19⁺CD3⁻), % B lymphocytes (CD19 ⁺ CD3 ⁻), %	15,62%	18,69%	5-19%
Активированные Т-лимфоциты (CD3⁺H-LA-DR⁺CD45⁺) Activated T lymphocytes (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺)	0,09 × 10⁹/л 0.09 × 10 ⁹ /L	0,13 × 10⁹/л 0.13 × 10 ⁹ /L	0,02-0,30
Активированные Т-лимфоциты (CD3⁺H-LA-DR⁺CD45⁺), % Activated T lymphocytes (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺), %	5,40%	7,13%	1,3-10%

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Название/показатель Name/indicator	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	Референсные значения Reference values
В-лимфоциты и активированные НК-клетки (CD3⁺HLA-DR⁺CD45⁺) B lymphocytes & activated NK cells (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺)	0,37 × 10⁹/л 0.37 × 10 ⁹ /L	0,34 × 10⁹/л 0.34 × 10 ⁹ /L	0,04-0,50
В-лимфоциты и активированные НК-клетки (CD3⁺HLA-DR⁺CD45⁺), % B lymphocytes & activated NK cells (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺), %	21,78%	18,73%	5-20%
Активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие альфа-цепь рецептора IL-2 (CD3⁺CD25⁺CD45⁺) Activated T lymphocytes, expressing IL-2 receptor alpha chain (CD3 ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺)	0,12 × 10⁹/л 0.12 × 10 ⁹ /L	0,18 × 10⁹/л 0.18 × 10 ⁹ /L	0,06-0,35
Активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие альфа-цепь рецептора IL-2 (CD3⁺CD25⁺CD45⁺), % Activated T lymphocytes, expressing IL-2 receptor alpha chain (CD3 ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺), %	7,14%	9,68%	3,5-12,5%
Активированные В-лимфоциты (CD3⁺CD25⁺CD45⁺) Activated B lymphocytes (CD3 ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺)	0,04 × 10⁹/л 0.04 × 10 ⁹ /L	0,03 × 10⁹/л 0.03 × 10 ⁹ /L	0,04-0,06
Активированные В-лимфоциты (CD3⁺CD25⁺CD45⁺), % Activated B lymphocytes (CD3 ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺), %	2,09%	1,93%	1,5-2,2%
Регуляторные Т-клетки (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{neg}CD45⁺) (% от всех Т-хелперов), % Regulatory T cells (CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{neg} CD45 ⁺) (% of all T helpers), %	5,36%	6,22%	1,65-5,75%
В1-клетки (CD19⁺CD5⁺CD27⁺CD45⁺), % B1 cells (CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺), %	2,19%	2,78%	0,5-2,1%
В2-клетки (CD19⁺CD5⁺CD27⁺CD45⁺), % B2 cells (CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺), %	13,43%	15,83%	6,5-15%
В-клетки памяти (CD19⁺CD5⁺CD27⁺CD45⁺), % Memory B cells (CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺), %	3,88%	4,63%	1,8-6,8%
Истинные натуральные киллеры (НК-клетки) (CD3⁺CD16⁺CD45⁺) True Natural Killers (NK cells) (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD45 ⁺)	0,29 × 10⁹/л 0.29 × 10 ⁹ /L	0,19 × 10⁹/л 0.19 × 10 ⁹ /L	0,12-0,40
Истинные натуральные киллеры (НК-клетки) (CD3⁺CD16⁺CD45⁺), % True Natural Killers (NK cells) (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD45 ⁺), %	16,88%	10,51%	8-18%
НК-клетки цитокин-продуцирующие (CD3⁺CD16^{-(or low)}CD56^{bright}CD45⁺) Cytokine-producing NK cells (CD3 ⁺ CD16 ^{-(or low)} CD56 ^{bright} CD45 ⁺)	0,01 × 10⁹/л 0.01 × 10 ⁹ /L	0,01 × 10⁹/л 0.01 × 10 ⁹ /L	0,00-0,02
НК-клетки цитокин-продуцирующие (CD3⁺CD16^{-(or low)}CD56^{bright}CD45⁺), % Cytokine-producing NK cells (CD3 ⁺ CD16 ^{-(or low)} CD56 ^{bright} CD45 ⁺), %	0,44%	0,54%	0,2-1%
НК-клетки цитолитические (CD3⁺CD16^{+(or high)}CD56^{dim}CD45⁺) Cytolytic NK cells (CD3 ⁺ CD16 ^{+(or high)} CD56 ^{dim} CD45 ⁺)	0,26 × 10⁹/л 0.26 × 10 ⁹ /L	0,18 × 10⁹/л 0.18 × 10 ⁹ /L	0,12-0,35
НК-клетки цитолитические (CD3⁺CD16^{+(or high)}CD56^{dim}CD45⁺), % Cytolytic NK cells (CD3 ⁺ CD16 ^{+(or high)} CD56 ^{dim} CD45 ⁺), %	15,17%	9,94%	7,8-17%

дены уточняющие иммунологические и патоморфологические исследования. Был подтвержден диагноз «пузырчатка Гужеро–Хейли–Хейли». На данный момент обострения частые. Новые очаги образуются в местах травмированной кожи.

Семейный анамнез: у старшего брата псориаз.

Данные объективного обследования: состояние удовлетворительное, сознание ясное. Питание умеренное. Кожные покровы и видимые слизистые физиологической окраски. В области подмышечных ямок, в пахово-бедренных складках, в области пупка-полиморфные симметричные высыпания в виде эритематозных очагов, эрозий, покрытых серозно-гнойными корочками. Периферические лимфатические узлы не увеличены, отеков нет.

Система органов дыхания: без особенностей, частота дыхательных движений (ЧДД) 16/мин. Дыхание везикулярное, хрипов нет.

Сердечно-сосудистая система: область сердца на вид не изменена. Границы сердца в пределах нормы. Тоны сердца нормальной звучности. Частота сердечных сокращений (ЧСС) 79/мин. Пульс удовлетворительного наполнения, артериальное давление (АД) 100/60 мм рт. ст.

Система органов пищеварения: язык обложен белым налетом. Живот мягкий, безболезненный. Размеры печени по М.Г. Курлову в норме ($9 \times 8 \times 7$ см), селезенка не увеличена.

Система органов мочевого выделения без особенностей, симптом Ф.И. Пастернацкого отрицательный с двух сторон. Мочеиспускание безболезненное, диурез в норме.

ФГДС от 19.11.2023 – поверхностный гастрит. Дуоденально-гастральный рефлюкс. Недостаточность кардии. Пептический рефлюкс-эзофагит (эрозивный) – стадия А (по Л-А классификации).

УЗИ брюшной полости от 19.11.2023 – диффузные изменения поджелудочной железы. Мелкие конкременты почек. Каликоэктазии правой почки.

ОАК от 20.11.2023 лейкоц. – 7,01, эритроц. – 5,33, гемог. – 153, гематокрит. – 48,6, сред. объем эритроц. – 91,2, сред. содержание гемог. в эритроц. – 28,7, сред. конц. гемог. в эритроц. – 315, тромбоц. – 231, сред. объем тромбоц. – 11,50, нейтроф. – 3,28, лимфоц. – 2,94, моноц. – 0,60, эозиноф. – 0,13, базоф. – 0,06, нейтроф. % – 46,7, лимфоц. % – 41,9, СОЭ – 18.

Биохимия от 20.11.2023 АЛТ – 24,6, АСТ – 21,7, ЩФ – 89, билир. общ. – 8,24, билир. прям. – 3,37, гамма-ГТ – 23.

HLA – B27 – отрицательно от 03.11.2023.

25-ОН Витамин Д – 130,42 от 03.11.2023.

Ревматоидный фактор 2,2 от 03.11.2023.

Витамин В12 – 193,1 от 03.11.2023.

Фолиевая кислота – 22,02 от 03.11.2023.

Anti-CCP – 0,8 от 03.11.2023.

УЗИ ЩЖ от 04.12.2023 – Диффузные изменения щитовидной железы. Узлы обеих долей.

ТТГ 2,662 от 04.12.2023.

Антитела к тиреопероксидазе – 46,60 от 04.12.2023.

Глюкоза – 5,07 от 04.12.2023.

ОАМ от 30.12.2023 цвет – желтый, уд. вес – 1,015, реакция – 5,0, белок – не обнаружен, глюкоза – не обнаружена, бил. – не обнаружен. Уробилиноген – следы, кетоновые тела – следы, нитриты – не обнаружены, реакция на кровь – не обнаружено, лейкоцитарная эстераза – не обнаружено, эп. плоский – 1,0, лейкоц. – 20,0, эритроц. – 2,0.

У обследуемого пациента выявлено некоторое повышение процента основных субпопуляций Т-лимфоцитов: общих Т-клеток ($CD3^+CD19^- = 69,67\%$ против $65,3\%$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+ = 41,22\%$ против $39,88\%$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+CD8^+ = 22,43\%$ против $20,48\%$). Анализ субпопуляций натуральных киллерных клеток свидетельствует об уменьшении относительного и абсолютного числа NK-клеток с экспрессией антигенов CD16 ($CD3^+CD16^+ = 10,51\%/0,19 \times 10^9/л$ против $16,88\%/0,28 \times 10^9/л$) и CD56 ($CD3^+CD56^+ = 10,12\%/0,18 \times 10^9/л$ против $16,62\%/0,28 \times 10^9/л$), NK-клеток с высокой цитолитической активностью ($CD3^+CD16^{+(or\ high)}CD56^{dim} = 9,94\%/0,18 \times 10^9/л$ против $15,17\%/0,26 \times 10^9/л$), NK-клеток, экспрессирующих α -цепь антигена CD8 и обладающих способностью многократно выполнять свою цитолитическую функцию ($CD3^+CD8^+ = 4,52\%/0,08 \times 10^9/л$ против $6,09\%/0,10 \times 10^9/л$). При оценке субпопуляций В-клеток отмечается увеличение относительного содержания В2-клеток ($CD19^+CD5^- = 15,83\%$) и В1-клеток ($CD19^+CD5^+ = 2,78\%$), связанных с продукцией аутоантител, параллельно с ростом процента регуляторных Т-хелперных клеток ($CD4^+CD25^{bright}CD127^{neg} = 6,22\%$), обладающих иммуносупрессорной функцией. Концентрации иммуноглобулинов классов А, Е и G, С3 и С4 компонентов комплемента, уровень ЦИК в сыворотке крови в пределах нормы. Сохраняется достаточно высокая концентрация иммуноглобулина М (IgM = 2,26 г/л против 2,12 г/л) в сыворотке крови.

Диагностика пузырных дерматозов от 16.01.2023.

Антитела к десмосомам кожи методом нРИФ – 80 (норма < 10).

Антитела к базальной мембране кожи методом нРИФ – < 10 (норма < 10).

Биопсия кожного лоскута от 21.11.2023.

Макроскопическое описание: лоскут кожи $3,0 \times 1,5 \times 0,2$ с подкожно-жировой клетчаткой $4,0 \times 2,5 \times 1,0$. В эпидермисе выраженный неравномерный акантоз с веррукозными разрастаниями. Очаги акантолиза в сформированных внутри эпидермальных щелей, напоминающие «разрушающуюся кирпичную стену». В верхней части дермы имеются периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты с примесью нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов.

Заключение

Гистологические изменения соответствуют доброкачественной семейной пузырчатке Гужеро–Хейли–Хейли.

Учитывая клинико-анамнестические данные объективного осмотра, результатов клинических, биохимических, патоморфологических и иммунологических исследований (с преимущественными изменениями в иммунных параме-

трах), пациенту off label была назначена иммуномодулирующая терапия по схеме: дискретный плазмаферез, 5 процедур через 2 дня, далее внутривенное капельное введение нормального человеческого иммуноглобулина 25 мл (50 мкг/мл) через 3 дня, 5 инфузий. Динамика кожных проявлений свидетельствует об умеренном положительном эффекте.

На рисунках 1, 2, 3 (см. 3-ю стр. обложки) представлены фотографии кожи пациента до лечения, на рисунках 4, 5 (см. 3-ю стр. обложки) – после лечения.

Представленный клинический случай демонстрирует сложность диагностики данного заболевания и относительную неэффективность существующих стратегий лечения. Особенностью является отсутствие генетической предрасположенности и дисрегуляторные изменения в системе иммунитета. Требуется дальнейшие углубленные исследования иммунных параметров при болезни Гужеро–Хейли–Хейли, предположительно в системе врожденного иммунитета. Вероятно, успех в лечении и достижение стойкой ремиссии будут возможны при рациональном подборе антицитокиновой терапии.

Список литературы / References

1. Большая медицинская энциклопедия [Текст]: в 30 т. / Акад. мед. наук СССР; Гл. ред. акад. Б.В. Петровский. М.: Советская энциклопедия. Т. 6: Гипотиреоз – дегенерация / Ред. Б.В. Петровский. 1977. 560 с., 16 л. ил. [Big Medical Encyclopedia. Vol. 6. Petrovskiy B.V. Moscow: Sovetskaya entsiklopediya, 1977. 560 p.]
2. Махнева Н.В., Белецкая Л.В. Растворимые иммунные комплексы в патогенезе доброкачественной семейной пузырчатки Гужеро–Хейли–Хейли // Вестник дерматологии и венерологии, 2006. № 3. С. 4-7. [Makhneva N.V., Beletskaya L.V. Soluble immune complexes in the pathogenesis of benign family pemphigus Guiero–Hailey–Hailey. *Vestnik dermatologii i venerologii = Bulletin of Dermatology and Venereology*, 2006, no. 3, pp. 4-7. (In Russ.)]
3. Хамаганова И.В., Померанцев О.Н., Новожилова О. Л., Новосельцев М. В., Воронцова И.В. Доброкачественная хроническая пузырчатка Хейли без доказанной наследственной предрасположенности // Клиническая дерматология и венерология, 2015. Т. 4. С. 30-34. [Khamaganova I.V., Pomerantsev O.N., Novozhilova O.L., Novosel'tsev M.V., Vorontsova I.V. Benign chronic Hailey-Hailey pemphigus without proven genetic predisposition. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology*, 2015, Vol. 4, pp. 30-34. (In Russ.)]
4. Deng H., Hiao H. The role of the ATP2C1 gene in the Hailey-Hailey disease. *Cell. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 74, 3787. doi: 10.1007/s00018-017-2544-7.
5. Hailey H., Hailey H. Familial benign chronic pemphigus. *Souh Med. J.*, 1940, Vol. 33, pp. 477-478.
6. Hohl D., Mauro T. Darier Disease and Hailey-Hailey Disease. In: Bologna J.L., Jorizzo J.L. and Rapini R.P., Eds., *Dermatology*, 2nd Edition. Mosby Elsevier, Amsterdam, 2008, pp. 791-800.
7. Lagha I.B., Ashach K., Khachemoune A. Hailey-Hailey disease: An Update of Review with a Focus on treatment data. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2020, Vol. 2, pp. 49-68.
8. Mauro T.M. Yeast researches consider Hailey-Hailey disease. *J. Invest. Dermatol.*, 2004, Vol. 123, pp. 1195-1196.
9. Norman R., Greenberg R.G., Jachgo G.M. Case reports of etanercept in inflammatory dermatoses. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2006, Vol. 54, pp. 139-142.

10. Orgeth M.L., Gropley T.G., What is the name Hailey-Hailey disease? *JAMA Dermatol.*, 2013, Vol. 149, 1220. doi: 10.1001/jamadermatol.2013.6880.
11. Sand F.L., Thomsen S.F. Off-label use of TNF-alpha inhibitors in a dermatological university department: retrospective evaluation of 118 patients. *Dermatol. Ther.*, 2015, Vol. 28, no. 3, pp. 158-165.

Авторы:

Лазаренко Л.Л. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Шелипова А.А. — заведующая поликлиническим
отделением, врач-терапевт, врач-гастроэнтеролог,
Лечебно-диагностический центр «Здоровье», г. Великий
Новгород, Россия

Сесь Т.П. — д.б.н., профессор кафедры иммунологии
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Lazarenko L.L., PhD (Medicine), Associate Professor,
Department of Immunology, First St. Petersburg I. Pavlov State
Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Shelipova A.A., Head, Outpatient Department, General
Practitioner, Gastroenterologist, Diagnostic and Treatment
Center "Zdorovye", Velikii Novgorod, Russian Federation

Ses T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Department
of Immunology, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical
University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 31.03.2024
Отправлена на доработку 03.04.2024
Принята к печати 11.04.2024

Received 31.03.2024
Revision received 03.04.2024
Accepted 11.04.2024

IL-8 И WISP1 В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО АСЦИТА ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

Абакумова Т.В.¹, Долгова Д.Р.¹, Пирмамедова С.С.^{1,2},
Антонеева И.И.^{1,2}, Генинг С.О.³, Иванченко И.А.¹, Генинг Т.П.¹

¹ ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

² ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

³ ООО «БестДоктор», Москва, Россия

Резюме. Неблагоприятный прогноз при раке яичников связан с метастазированием в брюшину и образованием злокачественного асцита, содержащего факторы, влияющие на рост и выживание опухолевых клеток. Молекулярный и функциональный анализ асцита позволяет получить информацию как для клинической диагностики, так и для понимания механизмов прогрессирования и резистентности при раке яичников.

Целью исследования было оценить уровень IL-8 и WISP1 в бесклеточной части асцита при распространенном раке яичников.

У 30 пациенток с диагнозом «асцитный рак яичников III-IV стадии» по FIGO до начала лечения в бесклеточной части асцита оценивали уровень IL-8 (Набор А-8762, Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ, АО «Вектор-Бест», Россия) и WISP1 (Набор SEG895Hu Cloud-Clone Corp., КНР) (пг/мл). По результатам эффективности химиотерапии по схеме TP все пациентки были разделены на следующие группы: без рецидива, безрецидивный период до 6 месяцев – ранний рецидив и прогрессирование на фоне химиотерапии. Статистическая обработка проводилась с использованием Statistica 13. Анализ времени без прогрессирования пациентов проводился по методу регрессии Кокса, оценка функции выживаемости пациентов проводилась по методу Каплана–Мейера (Jamovi 2.4.14).

Нами установлено, что уровень IL-8 в бесклеточной части злокачественного асцита при раке яичников у пациенток без рецидива значимо ниже, чем в группе раннего рецидива (176,58 (139,68–217,01) пг/мл против 320,43 пг/мл (250,49–369,81), $p = 0,019$). Уровень WISP1 при этом значимо был повышен в бесклеточной части асцита только у пациенток с прогрессированием на фоне химиотерапии (980,51 (796,61–1524,15) пг/мл против 770,55 (500,60–1254,90) пг/мл у пациенток без рецидива и 764,09 (581,55–823,38) пг/мл у пациенток с рецидивом). нами была выявлена положительная сильная корреляция по Пирсону между IL-8 и WISP1 в асците у группы пациентов без рецидива ($r = 0,783$, $p = 0,012$). В мультивариантном варианте регрессии Кокса риск возникновения рецидива повыша-

Адрес для переписки:

Абакумова Татьяна Владимировна
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
университет»
432017, Россия, г. Ульяновск,
ул. Архитектора Ливчака, 2.
Тел./факс: 8 (8422) 32-70-71.
E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Address for correspondence:

Tatyana V. Abakumova
Ulyanovsk State University
2 Arch. Livchak St
Ulyanovsk
432017 Russian Federation
Phone/fax: +7 (8422) 32-70-71.
E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Образец цитирования:

Т.В. Абакумова, Д.Р. Долгова, С.С. Пирмамедова,
И.И. Антонеева, С.О. Генинг, И.А. Иванченко,
Т.П. Генинг «IL-8 и WISP1 в молекулярной
характеристике злокачественного асцита при раке
яичников» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 4. С. 795-800.
doi: 10.15789/1563-0625-IAW-16813

© Абакумова Т.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.V. Abakumova, D.R. Dolgova, S.S. Pirmamedova,
I.I. Antoneeva, S.O. Gening, I.A. Ivanchenko, T.P. Gening
“IL-8 and WISP1 in the molecular characteristics of malignant
ascites in ovarian cancer”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4,
pp. 795-800.
doi: 10.15789/1563-0625-IAW-16813

© Abakumova T.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IAW-16813

ется в 1,01 (1,01-1,02, $p = 0,001$) раза при повышении уровня IL-8 в бесклеточной части асцита. При уровне IL-8 в бесклеточной части асцита выше 225 пг/мл, медиана времени без прогрессирования у пациентов с распространенным раке яичников составляет 11,7 (5,2-18,2, 95%CI) месяцев.

Таким образом, повышение уровня IL-8 и WISP1 в злокачественном асците при раке яичников ассоциировано с укорочением времени без прогрессирования. IL-8 в злокачественном асците активирует передачу сигналов Wnt/ β -катенина при распространенном раке яичников.

Ключевые слова: рак яичников, Wnt/ β -катенин, сигнальный путь, WISP, IL-8, асцит

IL-8 AND WISP1 IN THE MOLECULAR CHARACTERISTICS OF MALIGNANT ASCITES IN OVARIAN CANCER

Abakumova T.V.^a, Dolgova D.R.^a, Pirmamedova S.S.^{a,b},
Antoneeva I.I.^{a,b}, Gening S.O.^c, Ivanchenko I.A.^a, Gening T.P.^a

^a Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

^b Regional Clinical Oncology Center, Ulyanovsk, Russian Federation

^c LLC BestDoctor, Moscow, Russian Federation

Abstract. An unfavorable prognosis for ovarian cancer is associated with metastasis to the peritoneum and the formation of malignant ascites, which contains factors affecting the growth and survival of tumor cells. Molecular and functional analysis of ascites provides information both for clinical diagnosis and for understanding the mechanisms of progression and resistance in ovarian cancer. The aim of the study was to evaluate the levels of IL-8 and WISP1 in the acellular portion of ascites in advanced ovarian cancer. In 30 patients diagnosed with ascitic ovarian cancer stage III-IV according to FIGO, before treatment, the levels of IL-8 (Kit A-8762, Interleukin-8-ELISA-BEST, JSC Vector-Best, Russia) and WISP1 (Kit SEG895Hu Cloud-Clone Corp., China) were determined (pg/mL). Based on the results of the effectiveness of chemotherapy according to the TP scheme, all patients were divided into the following groups: without relapse, relapse-free period up to 6 months – early relapse and progression during chemotherapy. Statistical processing was carried out using Statistica 13. Analysis of patient progression-free time was carried out using the Cox regression method, and the patient survival function was assessed using the Kaplan-Meier method (Jamovi 2.4.14). We found that the level of IL-8 in the acellular part of malignant ascites in ovarian cancer in patients without relapse is significantly lower than in the early relapse group (176.58 (139.68-217.01) pg/mL versus 320.43 pg/mL (250.49-369.81), $p = 0.019$). The level of WISP1 was significantly increased in the acellular part of ascites only in patients with progression during chemotherapy (980.51 (796.61-1524.15) pg/mL versus 770.55 (500.60-1254.90) pg/mL in patients without relapse and 764.09 (581.55-823.38) pg/mL in patients with relapse). We found a positive strong Pearson correlation between IL-8 and WISP1 in ascites in a group of patients without relapse ($r = 0.783$, $p = 0.012$). In the multivariate version of Cox regression, the risk of relapse increases by 1.01 (1.01-1.02, $p = 0.001$) times with an increase in the level of IL-8 in the acellular part of ascites. When IL-8 levels in the acellular portion of ascites are above 225 pg/mL, the median progression-free time in patients with advanced ovarian cancer is 11.7 (5.2-18.2, 95% CI) months.

Thus, increased levels of IL-8 and WISP1 in malignant ascites in ovarian cancer are associated with a shorter progression-free time. IL-8 in malignant ascites activates Wnt/ β -catenin signaling in advanced ovarian cancer.

Keywords: ovarian cancer, Wnt/ β -catenin, signaling pathway, WISP, IL-8, ascites

Работа выполнена при поддержке РФФ 24-25-00269.

Введение

Рак яичников (РЯ), являясь одной из ведущих гинекологических злокачественных опухолей в

мире, имеет самый высокий уровень смертности от всех гинекологических раковых заболеваний [5]. Неблагоприятный прогноз у пациентов с РЯ связан с метастазированием в брюшину и образованием злокачественного асцита. Общий метод метастазирования при РЯ – транскоэломное

распространение. Механизмы отслойки, миграции и имплантации клеток при этом, ключевые молекулярные участники, уровень экспрессии генов первичных опухолей и их перитонеальных метастазов на сегодня изучены недостаточно. Процесс часто сопровождается образованием асцита. Показано, что асцит представляет сложную среду и содержит факторы, влияющие на рост и выживание опухолевых клеток. Являясь легкодоступным образцом, содержащим как раковые клетки, так и их окружение, асцит является источником информации для диагностики, понимания прогрессирования и резистентности РЯ [3].

IL-8 (CXCL8) был обнаружен как аттрактант и активатор полиморфноядерных лейкоцитов. Позднее было установлено, что IL-8 экспрессируется во многих типах раковых клеток. При этом экспрессия белка повышена в сыворотке крови онкологических и в перитуморальных жидкостях. Показано, что IL-8 опосредует эффекты метастазирования в сальник посредством миграции и инвазии раковых клеток яичника [15].

Белок сигнального пути, индуцируемый WNT – WISP1 (известный как CCT4), секретлируемый матриклеточный белок, принадлежащий к семейству CCN и являющийся нижестоящим геном – мишенью канонического сигнального пути [6]. Матриклеточные белки способны модулировать митоз, апоптоз, адгезию, выработку внеклеточного матрикса, остановку роста и миграцию клеток [9]. WISP1 экспрессируется в сердце, плаценте, почках, легких, яичниках, головном мозге. На сегодня считается установленным, что aberrантная экспрессия WISP1 связана с различной патологией, такой как фиброз, остеоартрит и рак [2]. Примечательно, что белки WISP могут проявлять онкогенные и подавляющие опухоль функции при различных типах опухолей [7, 11, 13].

Результаты одновременного определения IL-8 и WISP1 используют при метаболическом и воспалительном профилировании [4].

Целью исследования было оценить уровень IL-8 и WISP1 в бесклеточной части асцита при распространенном РЯ.

Материалы и методы

В исследование были включено 30 пациенток (медиана возраста 67 лет), проходившие лечение в Областном клиническом онкологическом диспансере г. Ульяновска в 2022–2023 гг. Критериями включения были впервые выявленный рак яичников на III–IV стадии по FIGO (асцитная форма), цитологически верифицированная серозная high-grade аденокарцинома, общее состояние по шкале ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group)

0±2 балла, подписанное информированное согласие и ожидаемая продолжительность жизни более 2 месяцев. На первом этапе лечения пациентки получали неоадьювантную химиотерапию (ХТ) по схеме TP (паклитаксел+цисплатин) от 2 до 4 курсов с интервалом в 3 недели. В последующем выполнялась циторедуктивная операция и адьювантная химиотерапия. Забор асцита производился при выполнении диагностической лапароскопии. Для получения бесклеточной фракции асцит подвергался центрифугированию в течение 10 минут при 1600 оборотов/минуту. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ИМЭиФК Ульяновского государственного университета (протокол № 6 от 15.06.2022 г.). Методом ИФА в бесклеточной части асцита оценивали уровень IL-8 (Набор А-8762, Интерлейкин-8-ИФА-БЕСТ, АО «Вектор-Бест», Россия) и WISP1 (Набор SEG895Hu Cloud-Clone Corp., КНР) (пг/мл). По результатам эффективности химиотерапии по схеме TP все пациентки были разделены на следующие группы: без рецидива, безрецидивный период до 6 месяцев – ранний рецидив и прогрессирование на фоне ХТ.

Совокупности количественных показателей, распределение которых отличалось от нормального, описывались при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

Статистическая обработка проводилась с использованием Statistica 13. Анализ времени без прогрессирования (ВБП) пациентов проводился по методу регрессии Кокса, оценка функции выживаемости пациентов проводилась по методу Каплана–Мейера (Jamovi 2.4.14).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что уровень IL-8 в бесклеточной части злокачественного асцита при РЯ у пациенток без рецидива значимо ниже, чем в группах прогрессирования и раннего рецидива (табл. 1). Уровень WISP1 при этом значимо был повышен в бесклеточной части асцита только у пациенток с прогрессированием на фоне ХТ (табл. 1).

Также нами была выявлена положительная сильная корреляция по Пирсону между IL-8 и WISP1 в асците у группы пациентов без рецидива ($r = 0,783$, $p = 0,012$).

В мультивариантном варианте регрессии Кокса риск возникновения рецидива повышается в 1,01 (1,01–1,02, $p = 0,001$) раза при повышении уровня IL-8 в бесклеточной части асцита.

При уровне IL-8 в бесклеточной части асцита выше 225 пг/мл, медиана ВБП у пациентов с распространенным РЯ составляет 11,7 (5,2–18,2, 95% CI) месяцев (рис. 1).

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ IL-8 И WISP1 В БЕСКЛЕТОЧНОЙ ЧАСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО АСЦИТА ПАЦИЕНТОВ С РЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ БЕЗРЕЦИДИВНОГО ПЕРИОДА, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. LEVEL OF PRO-INFLAMMATORY PROTEINS IL-8 AND WISP1 IN THE ACELLULAR PART OF MALIGNANT ASCITES OF PATIENTS WITH OVARIAN CANCER DEPENDING ON THE DURATION OF THE RELAPSE-FREE PERIOD, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Parameter Группа Group	IL-8, пг/мл/ IL-8, pg/mL	WISP1, пг/мл/ WISP1, pg/mL
Без рецидива No relapse n = 11	176,58 (139,68-217,01)	770,55 (500,60-1254,90)
Ранний рецидив Early relapse n = 8	320,43 (250,49-369,81)	764,09 (581,55-823,38)
p	$p_1 = 0,019$	$p_1 = 0,699$
Прогрессирование Progression n = 11	369,81 (194,61-369,81)	980,51 (796,61-1524,15)
p	$p_1 = 0,361$ $p_2 = 0,544$	$p_1 = 0,361$ $p_2 = 0,024$

Примечание. p_1 – данные статистически значимо отличаются от таковых в группе «без рецидива», p_2 – данные статистически значимо отличаются от таковых в группе «ранний рецидив».

Note. p_1 , data are statistically significantly different from those in the “no relapse” group; p_2 , data are statistically significantly different from those in the “early relapse” group.

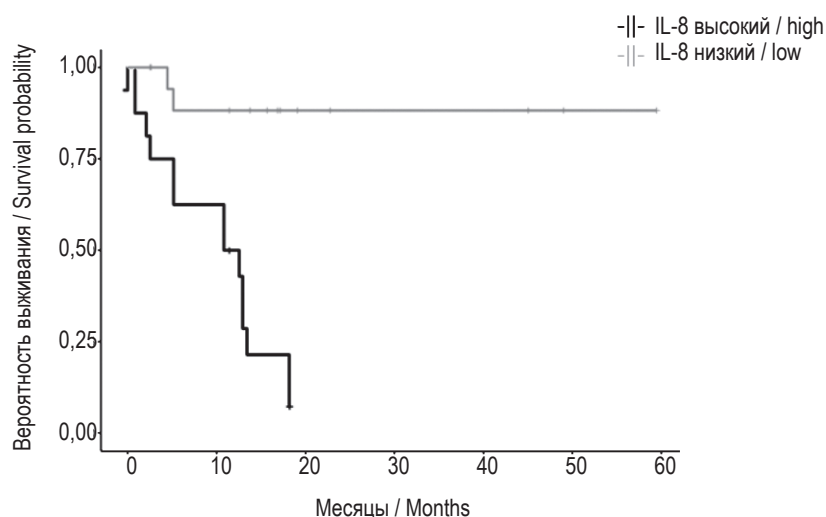


Рисунок 1. Кривая времени без прогрессирования пациентов с распространенным раком яичников в зависимости от уровня IL-8 в бесклеточной части асцита (дифференциальный уровень = 225 пг/мл)

Figure 1. Progression-free time curve of patients with advanced ovarian cancer depending on the level of IL-8 in the acellular part of ascites (differential level = 225 pg/mL)

Время без прогрессирования у пациенток с распространенным РЯ значимо не зависело от уровня WISP1 в асцитической жидкости.

На сегодня в литературе представлены данные, указывающие на влияние злокачественного асцита на выживаемость и на связь со стадиями заболевания [10, 12]. Было установлено, что уровень IL-8, коррелирует с онкогенным потенциалом опухолевых клеток, образованием асцитической жидкости и ассоциирован с плохим прогнозом при РЯ. Полученные нами данные о достоверном и значимом возрастании уровня IL-8 в асците при рецидиве РЯ не противоречат данным ряда авторов [1, 8].

Значимое и достоверное возрастание уровня WISP1 в асците пациенток при РЯ с прогрессированием на фоне ХТ позволяет предполагать

положительную обратную связь между опухолевыми клетками, продуцирующими лиганды Wnt, и асцитом, распространяющим активность Wnt на раковые клетки в брюшине и стимулирующим прогрессирование РЯ. В совокупности наши результаты подтверждают гипотезу Wen J. и соавт. (2020) о возможности IL-8 активировать передачу сигналов Wnt/ β -катенина [14].

Выводы

Повышение уровня IL-8 и WISP1 в злокачественном асците при РЯ ассоциировано с укорочением времени без прогрессирования. IL-8 в злокачественном асците активирует передачу сигналов Wnt/ β -катенина при распространенном РЯ.

Список литературы / References

1. Алешикова О.И., Антонова И.Б., Бабаева Н.А. Динамика цитокинового профиля в асците при распространенном раке яичников // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. 2019. Т. 7, № 1. С. 16-23. [Aleshikova O.I., Antonova I.B., Babaeva N.A. Cytokine profile dynamics in ascites with advanced ovarian cancer. *Akusherstvo i ginekologiya: novosti, mneniya, obucheniye* = *Obstetrics and Gynecology: News, Opinions, Training*, 2019, Vol. 7, no. 1, pp. 16-23. (In Russ.)]
2. Abell S.K., De Courten B., Boyle J.A., Teede H.J. Inflammatory and other biomarkers: role in pathophysiology and prediction of gestational diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, Vol. 16, pp. 13442-13473.
3. Antony F., Deantonio C., Cotella D., Soluri M.F., Tarasiuk O., Raspagliesi F., Adorni F., Piazza S., Ciani Y., Santoro C., Macor P., Mezzanzanica D., Sblattero D. High-throughput assessment of the antibody profile in ovarian cancer ascitic fluids. *Oncoimmunology*, 2019, Vol. 8, no. 9, e1614856. doi: 10.1080/2162402X.2019.1614856.
4. Barchetta I., Cimini F.A., De Gioannis R., Ciccarelli G., Bertocchini L., Lenzi A., Baroni M.G., Cavallo G. Procollagen-III peptide identifies adipose tissue-associated inflammation in type 2 diabetes with or without nonalcoholic liver disease. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2018, Vol. 34, no. 5, e2998. doi: 10.1002/dmrr.2998.
5. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, 2018, Vol. 68, no. 6, pp. 394-424.
6. Brigstock D.R. The CCN family: a new stimulus package. *J. Endocrinol.*, 2003, Vol. 178, pp. 169-175.
7. Chang A.C., Lien M.Y., Tsai M.H., Hua C.H., Tang C.H. WISP-1 promotes epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma cells via the miR-153-3p/Snail Axis. *Cancers (Basel)*, 2019, Vol. 11, no. 12, 1903. doi: 10.3390/cancers11121903.
8. Jones V.S., Huang R.Y., Chen L.P., Chen Z.S., Fu L., Huang R.P. Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1865, no. 2, pp. 255-265.
9. Jun J.I., Lau L.F. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2011, Vol. 10, pp. 945-963.
10. Krugmann J., Schwarz C.L., Melcher B., Sterlacci W., Ozalinskaite A., Lermann J., Agaimy A., Vieth M. Malignant ascites occurs most often in patients with high-grade serous papillary ovarian cancer at initial diagnosis: a retrospective analysis of 191 women treated at Bayreuth Hospital, 2006-2015. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2019, Vol. 299, no. 2, pp. 515-523.
11. Li Y., Wang F., Liu T., Lv N., Yuan X., Li P. WISP1 induces ovarian cancer via the IGF1/ α v β 3/Wnt axis. *J. Ovarian Res.*, 2022, Vol. 15, no. 1, 94. doi: 10.1186/s13048-022-01016-x.
12. Rickard B.P., Conrad C., Sorrin A.J., Ruhi M.K., Reader J.C., Huang S.A., Franco W., Scarcelli G., Polacheck W.J., Roque D.M., Del Carmen M.G., Huang H.C., Demirci U., Rizvi I. Malignant ascites in ovarian cancer: cellular, acellular, and biophysical determinants of molecular characteristics and therapy response. *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, no. 17, 4318. doi: 10.3390/cancers13174318.
13. Tsai H.C., Tzeng H.E., Huang C.Y., Huang Y.L., Tsai C.H., Wang S.W., Wang P.C., Chang A.C., Fong Y.C., Tang C.H. WISP-1 positively regulates angiogenesis by controlling VEGF-A expression in human osteosarcoma. *Cell Death Dis.*, 2017, Vol. 8, no. 4, e2750. doi: 10.1038/cddis.2016.421.

14. Wen J., Zhao Z., Huang L., Wang L., Miao Y., Wu J. IL-8 promotes cell migration through regulating EMT by activating the Wnt/ β -catenin pathway in ovarian cancer. *J. Cell. Mol. Med.*, 2020. Vol. 24, no. 2, pp. 1588-1598.
15. Wróblewski M., Szewczyk-Golec K., Hołyńska-Iwan I., Wróblewska J., Woźniak A. Characteristics of selected adipokines in ascites and blood of ovarian cancer patients. *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, no. 18, 4702. doi: 10.3390/cancers13184702.

Авторы:

Абакумова Т.В. — д.б.н., доцент, профессор кафедры физиологии и патофизиологии, ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского технологического института имени С.П. Капицы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Долгова Д.Р. — к.б.н., доцент кафедры физиологии и патофизиологии, старший научный сотрудник, директор Научно-исследовательского медико-биологического центра, Научно-исследовательский технологический институт имени С.П. Капицы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Пирмамедова С.С. — к.м.н., врач ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер»; старший научный сотрудник Научно-исследовательского технологического института имени С.П. Капицы ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Антонеева И.И. — д.м.н., профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; заведующая отделением онкогинекологии ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», г. Ульяновск, Россия

Генинг С.О. — к.м.н., врач-онколог ООО «БестДоктор», Москва, Россия

Иванченко И.А. — студентка 4-го курса медицинского факультета специальности «Лечебное дело» ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Генинг Т.П. — д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Authors:

Abakumova T.V., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Leading Research Associate, S. Kapitsa Research Technological Institute, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Dolgova D.R., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Senior Research Associate, Director of the Research Medical and Biological Center, S. Kapitsa Research Technological Institute, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Pirmamedova S.S., PhD (Medicine), Doctor, Department of Oncogynecology, Regional Clinical Oncology Center; Senior Research Associate, S. Kapitsa Research Technological Institute, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Antoneeva I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Oncology and Radiology, Ulyanovsk State University; Head, Department of Oncogynecology, Regional Clinical Oncology Center, Ulyanovsk, Russian Federation

Gening S.O., PhD (Medicine), Oncologist, LLC BestDoctor, Moscow, Russian Federation

Ivanchenko I.A., 4th year Student of the Faculty of Medicine, Specialty "General Medicine", Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Gening T.P., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Physiology and Pathophysiology, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Поступила 31.03.2024
Отправлена на доработку 01.04.2024
Принята к печати 02.04.2024

Received 31.03.2024
Revision received 01.04.2024
Accepted 02.04.2024

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА ЭКСПРЕССИЮ ИНГИБИТОРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-ЛИМФОЦИТАМИ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Баторов Е.В., Аристова Т.А., Денисова В.В., Ушакова Г.Ю.

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

Резюме. В патогенез множественной миеломы (ММ) вовлечены все типы иммунокомпетентных клеток. Значимый проопухолевый эффект оказывают гранулоцитарные (Г-МС) и моноцитарные миелоидные супрессорные клетки (М-МС). Т-клеточный иммунный ответ может быть снижен в связи с развитием Т-клеточного истощения, характеризующегося экспрессией ингибиторных рецепторов PD-1, TIM-3 и др. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) поддерживает генерацию и экспансию МС и может влиять на функциональные свойства Т-клеток. Целью нашей работы было исследовать возможное влияние стимуляции препаратами Г-КСФ на индукцию экспрессии PD-1 и TIM-3 Т-клетками больных ММ.

В исследование были включены 40 больных ММ, которым была проведена мобилизация гемопоэтических клеток-предшественников препаратами Г-КСФ (5 мкг/кг/день) в течение 4-5 дней. Содержание CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺Т-клеток, Lin⁺HLA-DR-CD33⁺CD66b⁺Г-МС, CD14⁺HLA-DR-М-МС оценивали перед началом курса инъекций Г-КСФ (n = 33), после курса Г-КСФ в первый день сепарации гемопоэтических клеток-предшественников (n = 28) и через 3-6 мес. (n = 40) методом проточной цитометрии.

Относительное содержание Г-МС и М-МС было значимо выше у больных ММ после курса Г-КСФ. Через 3-6 мес. содержание Г-МС и М-МС снижалось до исходных значений. После курса Г-КСФ было отмечено увеличение содержания CD4⁺PD-1⁺Т-клеток по сравнению со значениями перед исследованием. Через 3-6 мес. после курса Г-КСФ содержание этой популяции не отличалось от исходных значений. Относительное количество CD4⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺Т-клеток не изменялось после курса Г-КСФ. Не было выявлено значимых корреляционных связей между содержанием популяций МС и Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, после курса Г-КСФ.

Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток препаратами Г-КСФ у больных ММ сопровождается транзиторным увеличением популяций МС и изолированным увеличением CD4⁺PD-1⁺Т-клеток.

Ключевые слова: гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, миелоидные супрессорные клетки, Т-клетки, PD-1, TIM-3, множественная миелома

Адрес для переписки:

Баторов Егор Васильевич
Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
E-mail: ebatorov@mail.ru

Address for correspondence:

Egor V. Batorov
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaia St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 228-21-01.
E-mail: ebatorov@mail.ru

Образец цитирования:

Е.В. Баторов, Т.А. Аристова, В.В. Денисова, Г.Ю. Ушакова «Оценка влияния гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на экспрессию ингибиторных рецепторов Т-лимфоцитами при множественной миеломе» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 801-806.
doi: 10.15789/1563-0625-EOG-16683

© Баторов Е.В. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.V. Batorov, T.A. Aristova, V.V. Denisova, G.Yu. Ushakova
“Evaluation of granulocyte colony-stimulating factor effect
on the expression of inhibitory receptors by T cells in multiple
myeloma”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 801-806.
doi: 10.15789/1563-0625-EOG-16683

© Batorov E.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-16683-EOG-16683

EVALUATION OF GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR EFFECT ON THE EXPRESSION OF INHIBITORY RECEPTORS BY T CELLS IN MULTIPLE MYELOMA

Batorov E.V., Aristova T.A., Denisova V.V., Ushakova G.Yu.

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

Abstract. All types of immune cells are involved in the pathogenesis of multiple myeloma (MM). Granulocytic (G-MDSCs) and monocytic myeloid-derived suppressor cells (M-MDSCs) have significant protumor effects. The T cell immune response may be reduced due to the development of T cell exhaustion, characterized by the expression of inhibitory receptors PD-1, TIM-3, etc. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) supports the generation and expansion of MDSCs and can influence the functional properties of T cells. The purpose of our work was to investigate the possible effect of stimulation with G-CSF drugs on the induction of PD-1 and TIM-3 expression by T cells in patients with MM. The study included 40 patients with MM who underwent mobilization of hematopoietic progenitor cells with G-CSF drugs (5 mcg/kg/day) for 4-5 days. Content of CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺T cells, Lin-HLA-DR-CD33⁺CD66b⁺G-MDSCs, and CD14⁺HLA-DR⁺M-MDSCs was assessed before the start of a course of G-CSF injections (n = 33), after a course of G-CSF on the first day of separation of hematopoietic progenitor cells (n = 28) and after 3-6 months (n = 40) by flow cytometry. The relative content of G-MDSCs and M-MDSCs was significantly higher in patients with MM after a course of G-CSF. After 3-6 months, the content of G-MDSCs and M-MDSCs decreased to the initial values. After the course of G-CSF, an increase in the content of CD4⁺PD-1⁺T cells was noted compared to the values before the study. After 3-6 months, the content of this population did not differ from the initial values. The relative numbers of CD4⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺, and CD8⁺TIM-3⁺T cells did not change after a course of G-CSF. There were no significant correlations between the content of the populations of MDSCs and T cells expressing PD-1 and TIM-3 after a course of G-CSF.

Mobilization of hematopoietic stem cells by G-CSF in patients with MM is accompanied by a transient increase in MM populations and an isolated increase in CD4⁺PD-1⁺T cells.

Keywords: granulocyte colony-stimulating factor, myeloid-derived suppressor cells, T cells, PD-1, TIM-3, multiple myeloma

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 20-75-10132.

Введение

В патогенез множественной миеломы (ММ), как и других онкологических состояний, вовлечены все типы иммунокомпетентных клеток, реализующих про- и противоопухолевые эффекты. Выраженное иммуносупрессорное действие оказывают гранулоцитарные (Г-МС) и моноцитарные миелоидные супрессорные клетки (М-МС), подавляющие иммунный ответ путем экспрессии и продукции ингибирующих лигандов, цитокинов и растворимых молекул, а также стимулирующие экспансию регуляторных Т-клеток [8].

В прогрессии опухоли патогенетическое и клиническое значение имеет также развитие Т-клеточного истощения, характеризующееся нарушением функций Т-клеток и экспрессией ингибиторных рецепторов PD-1, TIM-3 и др. в ответ на длительную антигенную стимуляцию в

условиях опухолевого микроокружения [12]. Ингибиторные рецепторы являются привлекательной мишенью для таргетной терапии при многих неоплазиях, однако в лечении ММ в настоящее время не используются.

Научный и клинический интерес представляют возможные альтернативные пути индукции дисфункциональных состояний Т-клеток, помимо активации через Т-клеточный рецептор, в частности недостаточно изучена роль клеток и цитокинов миелоидного ряда. В литературе есть указания на возможное участие популяций МС в поддержании Т-клеточного истощения [4, 10], однако данных в настоящее время недостаточно. В свою очередь, одним из ключевых цитокинов, потенцирующих генерацию и экспансию МС, является гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) [2, 6]. Согласно данным публикаций, помимо стимуляции супрессорных популяций, Г-КСФ обладает способностью «переключать» дифференцировку Т-хелперов в

сторону Th2, также снижая противоопухолевый иммунный ответ [13]. При этом отсутствуют данные о возможном участии Г-КСФ в изменениях функционального состояния Т-лимфоцитов и экспрессии ингибиторных рецепторов.

Следует отметить, что препараты Г-КСФ широко используют в лечении нейтропений различного генеза, а также для мобилизации гемопоэтических стволовых клеток. **Целью нашей работы** было исследовать возможное влияние стимуляции препаратами Г-КСФ на индукцию экспрессии PD-1 и TIM-3 Т-клетками больных ММ.

Материалы и методы

В исследование после подписания информированного согласия были включены 40 больных ММ, находившихся на стационарном лечении в отделении гематологии Клиники иммунопатологии НИИФКИ. Медиана возраста пациентов составила 52 года (37-65 лет). Распределение по полу: 22 женщины, 18 мужчин. У 27 больных диагностирован IgG-вариант ММ, у четырех — IgA, у семи — миелома Бенс-Джонса, у двух — нет данных. Стадия заболевания по Durie-Salmon: II — у 14 больных, III — у 26 больных. У всех пациентов на момент обследования был зарегистрирован полный или частичный ответ. Подкожные инъекции препарата Г-КСФ (5 мкг/кг/день) проводили в течение 4-5 дней после инфузии циклофосфида (2-4 г/м²) или очередного курса индукционной терапии до достижения в периферической крови (ПК) концентрации 10⁴ CD34⁺CD45⁺ гемопоэтических клеток-предшественников/мл.

Содержание CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺Т-клеток, Lin⁺HLA-DR⁺CD33⁺CD66b⁺Г-МС, CD14⁺HLA-DR⁺М-МС оценивали в ПК пациентов перед началом курса инъекций Г-КСФ (n = 33), после курса Г-КСФ в первый день сепарации гемопоэтических клеток-предшественников (n = 28) и через 3-6 мес. перед началом кондиционирования высокодозным мелфаланом (n = 40). Образцы ПК получали при проведении стандартных диагностических процедур.

Лизис эритроцитов проводили раствором Lysing Buffer (BD Biosciences, США). Методом проточной цитометрии оценивали относительное содержание Т-клеток, экспрессирующих PD-1 или TIM-3, и МС, используя анти-CD4 (Per-CP), анти-CD8 (FITC), анти-PD-1 (APC), анти-TIM-3 (PE), anti-Human Lineage Cocktail 1 (FITC), анти-CD33 (PerCP-Cy 5.5), анти-HLA-DR (FITC, PerCP), анти-CD66b (APC), анти-CD14 (FITC) моноклональные антитела (BD Biosciences или BioLegend, США).

Исследование проводили на проточном цитометре FACS Canto II (BD Biosciences, США).

Анализ проводили после накопления не менее 30 000 событий в регионе CD8⁺Т-клеток.

Статистическую обработку данных проводили в GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc, США.). Для оценки значимости различий использовали U-критерий Манна-Уитни. Для оценки корреляционных взаимосвязей использовали коэффициент корреляции Спирмана. Данные в тексте представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$ (двустороннем).

Результаты и обсуждение

Относительное содержание Г-МС и М-МС было значимо выше у больных ММ после курса Г-КСФ по сравнению с начальной точкой: 3,40% (0,48-6,0%) против 0,03% (0,02-0,09%); $p_U < 0,0001$, и 6,21% (3,61-15,70%) против 2,58% (1,45-6,94%); $p_U = 0,0016$ соответственно; данные приведены в виде доли от мононуклеарных клеток. Через 3-6 мес. содержание Г-МС и М-МС составило 0,03% (0,01-0,05%) и 2,35% (1,20-5,27%) соответственно, не отличаясь от значений перед курсом инъекций Г-КСФ и снижаясь относительно показателей после Г-КСФ ($p_U < 0,0001$ и $p_U = 0,0001$ соответственно).

После курса Г-КСФ было отмечено увеличение содержания CD4⁺PD-1⁺Т-клеток по сравнению со значениями перед исследованием: 7,06 (4,03-10,58%) против 4,89% (3,02-6,69%); $p_U = 0,011$ (рис. 1А). Через 3-6 мес. после курса Г-КСФ содержание этой популяции не отличалось от исходных значений: 5,34% (3,57-9,09%). Относительное количество CD4⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺Т-клеток не изменялось после курса Г-КСФ, при этом выявлено значимое постепенное увеличение CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺Т-клеток ко времени проведения кондиционирования (рис. 1Б, В, Г).

Не было выявлено значимых корреляционных связей между содержанием популяций МС и Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, после курса Г-КСФ (табл. 1).

Несмотря на известные иммуномодулирующие эффекты, клиническое применение Г-КСФ считается безопасным и существенно не влияет на прогрессирование опухолевых заболеваний. Увеличение содержания Г-МС и М-МС в ответ на стимуляцию Г-КСФ *in vivo* ожидаемо и было описано ранее [7, 11]. Обращает на себя внимание «транзиторность» эффекта этого цитокина на экспансию популяций МС.

Интерес представляет изолированное увеличение содержания CD4⁺PD-1⁺Т-клеток после курса Г-КСФ. В отдельных публикациях было описано прямое и опосредованное стимулирую-

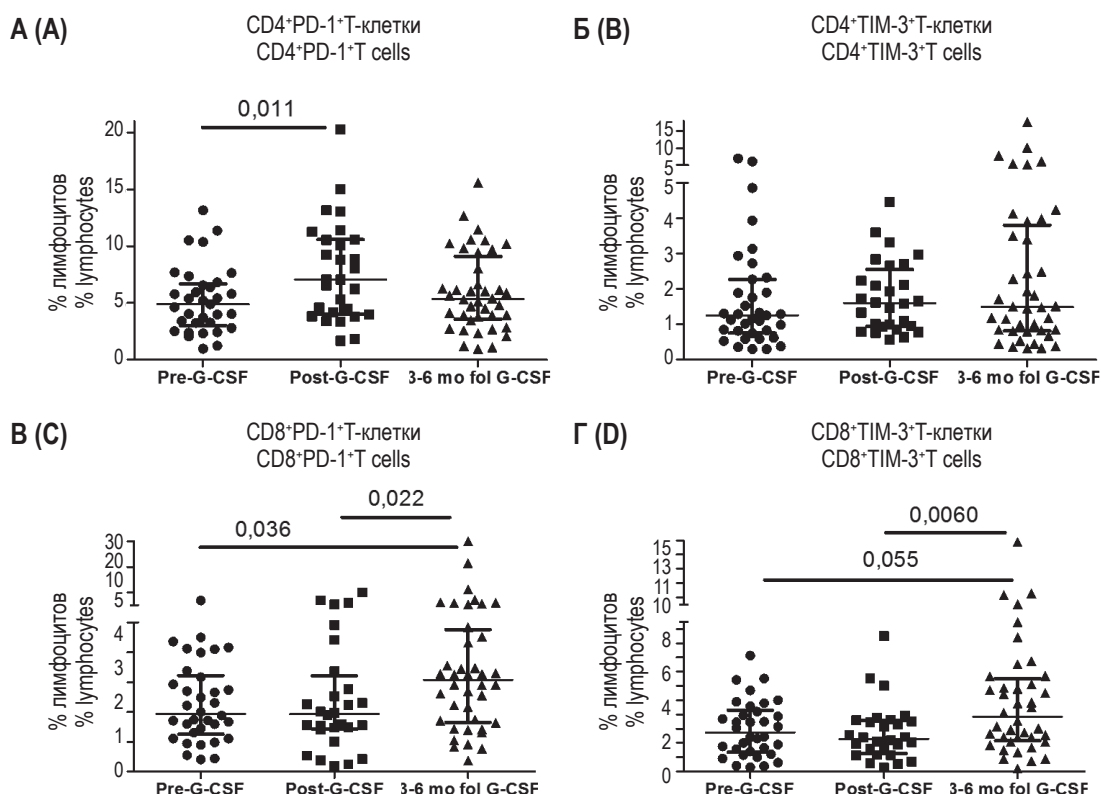


Рисунок 1. Относительное содержание Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, до и после мобилизации препаратами гранулоцитарного колониестимулирующего фактора больных множественной миеломой
Примечание. Представлены индивидуальные значения, медиана, интерквартильный диапазон. Значимость различий между группами оценена по U-критерию Манна–Уитни.

Figure 1. Relative counts of T cells expressing PD-1 and TIM-3 in patients with multiple myeloma receiving granulocyte colony-stimulating factor drugs

Note. Data are presented as individual values, median, interquartile range. P values are assessed with the Mann–Whitney U test.

ТАБЛИЦА 1. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ПОПУЛЯЦИЙ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК И Т-ЛИМФОЦИТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ PD-1 И TIM-3 У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

TABLE 1. CORRELATION ANALYSIS BETWEEN CIRCULATING MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS AND PD-1⁺ AND TIM-3⁺T CELLS IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

Популяции Т-клеток T cell subsets	Г-МС*, % G-MDSCs, %	М-МС**, % M-MDSCs, %
CD4 ⁺ PD-1 ⁺ , %	$r_s = 0,067$, $p = 0,75$, $n = 26$	$r_s = 0,070$, $p = 0,74$, $n = 26$
CD4 ⁺ TIM-3 ⁺ , %	$r_s = 0,28$, $p = 0,17$, $n = 26$	$r_s = 0,064$, $p = 0,76$, $n = 26$
CD8 ⁺ PD-1 ⁺ , %	$r_s = 0,38$, $p = 0,056$, $n = 26$	$r_s = 0,15$, $p = 0,45$, $n = 26$
CD8 ⁺ TIM-3 ⁺ , %	$r_s = 0,14$, $p = 0,50$, $n = 26$	$r_s = -0,032$, $p = 0,88$, $n = 26$

Примечание. * Г-МС – гранулоцитарные миелоидные супрессорные клетки; ** М-МС – моноцитарные миелоидные супрессорные клетки.

Note. * G-MDSCs, granulocyte myeloid-derived suppressor cells; ** M-MDSCs, monocyte myeloid-derived suppressor cells.

шее действие Г-КСФ на различные популяции CD4⁺Т-клеток (Th2, Th17, Treg) [13]. В нашем исследовании *in vivo* нельзя исключить влияния Г-КСФ-стимулированных МС на экспансию CD4⁺PD-1⁺Т-клеток, тем не менее не удалось выявить прямых корреляционных взаимосвязей между содержанием популяций МС и Т-клеток. С другой стороны, Zhao и соавт. была описана блокада протеинкиназы, ассоциированной с зета-цепью-70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70, ZAP-70), участвующей в проведении сигнала от Т-клеточного рецептора, в CD4⁺Т-клетках после мобилизации препаратами Г-КСФ [14]. На этом же механизме основаны ингибиторные эффекты при стимуляции рецептора PD-1 на Т-лимфоцитах [9]. Патогенетическое и клиническое значение клеток миелоидного ряда и ассоциированных с ними растворимых факторов нуждается в дальнейшем изучении.

Не относящееся к задачам данного исследования и описанное в ходе работы увеличение содержания CD8⁺Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы, к моменту кондиционирования и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, по-видимому, связано с проводимой после мобилизации поддерживающей терапией и согласуется с данными литературы [1, 3, 5].

Заключение

Таким образом, мобилизация гемопоэтических стволовых клеток препаратами Г-КСФ у больных ММ сопровождается транзитным увеличением популяций МС и CD4⁺PD-1⁺Т-клеток. При этом содержание CD4⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺Т-клеток на фоне курса Г-КСФ не изменялось.

Список литературы / References

1. Busch A., Zeh D., Janzen V., Mügge L.O., Wolf D., Fingerhut L., Hahn-Ast C., Maurer O., Brossart P., von Lilienfeld-Toal M. Treatment with lenalidomide induces immunoactivating and counter-regulatory immunosuppressive changes in myeloma patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, Vol. 177, no 2, pp. 439-453.
2. Condamine T., Mastio J., Gabrilovich D.I. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 98, no 6, pp. 913-922.
3. Fostier K., Caers J., Meuleman N., Broos K., Corthals J., Thielemans K., Schots R., de Keersmaecker B. Impact of lenalidomide maintenance on the immune environment of multiple myeloma patients with low tumor burden after autologous stem cell transplantation. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 29, pp. 20476-20489.
4. He Z.N., Zhang C.Y., Zhao Y.W., He S.L., Li Y., Shi B.L., Hu J.Q., Qi R.Z., Hua B.J. Regulation of T cells by myeloid-derived suppressor cells: emerging immunosuppressor in lung cancer. *Discov. Oncol.*, 2023, Vol. 14, no. 1, 185. doi: 10.1007/s12672-023-00793-1.
5. Krämer I., Engelhardt M., Fichtner S., Neuber B., Medenhoff S., Bertsch U., Hillengass J., Raab M.S., Hose D., Ho A.D., Goldschmidt H., Hundemer M. Lenalidomide enhances myeloma-specific T-cell responses *in vivo* and *in vitro*. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 5, e1139662. doi: 10.1080/2162402X.2016.1139662.
6. Li W., Zhang X., Chen Y., Xie Y., Liu J., Feng Q., Wang Y., Yuan W., Ma J. G-CSF is a key modulator of MDSC and could be a potential therapeutic target in colitis-associated colorectal cancers. *Protein Cell*, 2016, Vol. 7, no 2, pp. 130-140.
7. Lv M., Zhao X.S., Hu Y., Chang Y.J., Zhao X.Y., Kong Y., Zhang X.H., Xu L.P., Liu K.Y., Huang X.J. Monocytic and promyelocytic myeloid-derived suppressor cells may contribute to G-CSF-induced immune tolerance in haplo-identical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am. J. Hematol.*, 2015, Vol. 90, no. 1, pp. E9-E16.
8. Ostrand-Rosenberg S., Fenselau C. Myeloid-derived suppressor cells: immune-suppressive cells that impair antitumor immunity and are sculpted by their environment. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, no 2, pp. 422-431.
9. Sheppard K.A., Fitz L.J., Lee J.M., Benander C., George J.A., Wooters J., Qiu Y., Jussif J.M., Carter L.L., Wood C.R., Chaudhary D. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett.*, 2004, Vol. 574, no. 1-3, pp. 37-41.
10. Tao J., Han D., Gao S., Zhang W., Yu H., Liu P., Fu R., Li L., Shao Z. CD8⁺ T cells exhaustion induced by myeloid-derived suppressor cells in myelodysplastic syndromes patients might be through TIM3/Gal-9 pathway. *J. Cell. Mol. Med.*, 2020, Vol. 24, no 1, pp. 1046-1058.
11. Tyrtinova T., Batorov E., Aristova T., Ushakova G., Sizikova S., Denisova V., Chernykh E. Decreased circulating myeloid-derived suppressor cell count at the engraftment is one of the risk factors for multiple myeloma relapse after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Heliyon*, 2024, Vol. 10, no 5, e26362. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e26362.
12. Wherry E.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no 8, pp. 486-499.

13. Yang J.Z., Zhang J.Q., Sun L.X. Mechanisms for T cell tolerance induced with granulocyte colony-stimulating factor. *Mol. Immunol.*, 2016, Vol. 70, pp. 56-62.
14. Zhao S., Gu Z., Wang L., Guan L., Wang F., Yang N., Luo L., Gao Z., Song Y., Wang L., Liu D., Gao C. G-CSF inhibits LFA-1-mediated CD4⁺ T cell functions by inhibiting Lck and ZAP-70. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 31, pp. 51578-51590.

Авторы:

Баторов Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Аристова Т.А. — врач-гематолог ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Денисова В.В. — к.м.н., заведующая отделением
гематологии с БТКМ, врач-гематолог ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Ушакова Г.Ю. — к.м.н., врач-гематолог
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Authors:

Batorov E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate,
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
Novosibirsk, Russian Federation

Aristova T.A., Hematologist, Research Institute of Fundamental
and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Denisova V.V., PhD (Medicine), Head, Department
of Hematology and BMT, Hematologist, Research Institute
of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk,
Russian Federation

Ushakova G.Yu., PhD (Medicine), Hematologist, Research
Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 28.03.2024
Отправлена на доработку 02.04.2024
Принята к печати 06.04.2024

Received 28.03.2024
Revision received 02.04.2024
Accepted 06.04.2024

ОСОБЕННОСТИ ГИСТОТОПОГРАФИИ ЛИМФОЦИТОВ И КЛЕТОК СТРОМЫ С ВЫСОКИМ УРОВНЕМ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ПАЦИЕНТОВ С В-ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Аникаева М.С.¹, Толстолицкая Т.О.², Сергеев В.Г.^{1, 2}

¹ ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

² ФГБОУ ВО «Ижевская медицинская академия», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Резюме. Малигнизация лимфопозза в лимфатических узлах (ЛУ) сопровождается структурной перестройкой лимфатических узлов и изменением характера гликозилирования мембранных и цитоплазматических белков. Для гистохимического выявления трансформирующихся лимфоидных клеток и ремоделируемой стромы лимфоузлов мы использовали лектин томата *Lycopersicon esculentum*, который способен связываться с поверхностными и цитоплазматическими гликопротеинами большинства клеточных элементов ЛУ. Целью исследования стало изучение особенностей архитектоники клеток с высоким уровнем гликозилирования белков в ЛУ пациентов с В-хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ). Материалом исследования послужили биоптаты надключичных и шейных ЛУ пациентов БУЗ УР «Первая республиканская клиническая больница МЗ УР» с верифицированным диагнозом «В-ХЛЛ» (16 пациентов) в возрасте 49-73 лет, полученные до начала лечения, с их информированного добровольного согласия. Контрольными образцами послужили биоптаты ЛУ из этих же областей организма 12 лиц в возрасте 48-70 лет с реактивной гиперплазией лимфатических узлов. Парафиновые срезы ЛУ толщиной 7 мкм окрашивали с помощью ФИТЦ-конъюгированного ЛТ и флуоресцентного красителя йодид пропидия (ИП) и исследовали в микроскопе Nikon Eclipse E200, оснащенный люминесцентным блоком и цифровым фотоаппаратом. Анализ препаратов лимфатических узлов пациентов с В-ХЛЛ свидетельствовал о значительных изменениях в гистотопографии клеток и внеклеточных структур с высоким уровнем гликозилирования. В частности, в кортикальном веществе фолликулы замещались массивом из малых лимфоцитов, на фоне которых выявлялись центры пролиферации с лимфоцитами с дисперсной упаковкой ИП-меченного хроматина. В этой

Адрес для переписки:

Сергеев Валерий Георгиевич
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный
университет»
426011, Удмуртская Республика, г. Ижевск,
ул. Холмогорова, 29, кв. 117.
Тел.: 8 (912) 465-73-39.
E-mail: cellbio@ya.ru

Address for correspondence:

Valery G. Sergeev
Udmurt State University
29 Kholmogorov St, Apt 117
Izhevsk, Udmurt Republic
Phone: +7 (912) 465-73-39.
E-mail: cellbio@ya.ru

Образец цитирования:

М.С. Аникаева, Т.О. Толстолицкая, В.Г. Сергеев
«Особенности гистотопографии лимфоцитов
и клеток стромы с высоким уровнем гликозилирования
в лимфатических узлах пациентов с В-хроническим
лимфолейкозом» // Медицинская иммунология, 2024.
Т. 26, № 4. С. 807-812.
doi: 10.15789/1563-0625-НОН-16909

© Аникаева М.С. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.S. Anikaeva, T.O. Tolstolitskaya, V.G. Sergeev
“Histotopography of highly glycosylated lymphocytes and
stromal cells in lymph nodes of patients with B-chronic
lymphocytic leukaemia”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4,
pp. 807-812.
doi: 10.15789/1563-0625-НОН-16909

© Anikaeva M.S. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-НОН-16909

области мы также наблюдали равномерную сеть из тонких ЛТ-меченых ретикулярных волокон и большое количество кровеносных сосудов малого калибра. Макрофагподобные клетки, отчетливо идентифицируемые в ЦР фолликулов контрольных ЛУ, отсутствовали у пациентов с В-ХЛЛ. Однако отмечалось их повышенное число и интенсивность люминесцентного свечения относительно контроля в области, примыкающей к субкапсулярному синусу и в паракортикальной области вокруг коллагеновых тяжей, образующихся на основе кондуитов, а также вокруг соединительнотканых трабекул мозгового вещества. Обнаруженные отличия гистотопографии клеток ЛУ с высоким уровнем гликозилирования при В-ХЛЛ позволяют рассматривать предлагаемый способ окрашивания как информативный и облегчающий диагностирование этого заболевания при гистологическом исследовании.

Ключевые слова: лимфоциты, В-хронический лимфолейкоз, гликозилирование, лимфоузлы, строма лимфоузлов

HISTOTOPOGRAPHY OF HIGHLY GLYCOSYLATED LYMPHOCYTES AND STROMAL CELLS IN LYMPH NODES OF PATIENTS WITH B-CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA

Anikaeva M.S.^a, Tolstolutsкая T.O.^b, Sergeev V.G.^{a, b}

^a Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

^b Izhevsk Medical Academy, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Abstract. Malignant transformation of lymphopoiesis in lymph nodes (LN) is accompanied by structural rearrangement of the LN stroma and changes in the glycosylation of membrane and cytoplasmic proteins. For the histochemical detection of transforming lymphoid cells and remodeled LN stroma, we used the tomato lectin *Lycopersicon esculentum*, which is able to bind to surface and cytoplasmic glycoproteins of the majority of LN cells. The study aimed to investigate the characteristics of cell architectonics with a high level of protein glycosylation in the LN of patients with B-chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). The study material were biopsy specimens of supraclavicular and cervical LNs from patients of the First Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Udmurt Republic with a confirmed diagnosis of B-CLL (16 patients), aged 49-73 years, obtained prior to treatment with their informed voluntary consent. LN biopsies from the same body regions of 12 individuals aged 48-70 years with reactive LN hyperplasia served as control samples. Paraffin sections of 7 µm thick LN were stained with FITC-conjugated tomato lectin and fluorescent dye propidium iodide (IP) and examined using a Nikon Eclipse200 microscope equipped with a luminescence unit and digital camera. Analysis of LN preparations from patients with B-CLL revealed significant changes in the histotopography of cells and extracellular structures with a high degree of glycosylation. Follicles in the cortex were replaced by an array of small lymphocytes against a background of proliferating centers containing lymphocytes with dispersed packing of IP-labelled chromatin. In this area we also observed a uniform network of thin lectin-labelled reticular fibres and a large number of small blood vessels. Macrophage-like cells, clearly identifiable in the germinal centres of follicles in control, were absent in B-CLL. Their increased number and intensity of luminescence was observed in the subcapsular sinus area and in the paracortical area around collagen bundles formed by conduits, as well as around connective tissue trabeculae of the brain substance. The differences observed in the histological topography of highly glycosylated LN cells in B-CLL suggest that the proposed staining method is informative and facilitates the diagnosis of this disease in histological studies.

Keywords: lymphocytes, B-chronic lymphocytic leukaemia, glycosylation, lymph nodes, lymph node stroma

Введение

Малигнизация лимфопоеза в лимфатических узлах (ЛУ) ведет к их структурной перестройке и изменению динамики внутриузловых миграционных процессов, нарушающих в свою очередь процесс дифференцировки лимфоцитов, не подвергшихся трансформации [2]. Становится очевидным, что для диагностирования того или иного типа лимфом, помимо идентификации молекулярного цитофенотипа трансформированных лимфатических клеток, необходимо дополнительное описание перестроек стромы малигнизированных ЛУ. В связи с этим актуальной практической задачей становится поиск информативных и недорогих маркеров, позволяющих получать одновременно описание не только лимфоцитов на разных стадиях развития, но и гистотопографии стромы ЛУ.

В качестве одного из перспективных методических подходов, отвечающих поставленной задаче, может стать гистохимическое выявление внутриклеточных и мембранных, aberrантно гликозилированных белков при помощи растительных лектинов — олигомерных белков, которые специфически связывают моно- и олигосахариды, входящие в состав гликопротеинов и гликолипидов [4]. Гликозилирование рассматривается как один из наиболее распространенных и важных этапов посттрансляционных модификаций белков, характер которого влияет на фолдинг и взаимодействие с другими белками, и лежит в основе таких процессов, как адгезия, передача сигналов, клеточная дифференцировка и миграция [7]. При опухолевой трансформации меняется характер гликозилирования клеточных белков [9], ведущий к нарушениям межклеточной коммуникации и взаимодействию с матриксом, диссоциации и инвазии опухолевых клеток, опухолевому ангиогенезу и образованию метастазов [8].

Для гистохимического выявления стромальных и трансформированных лимфоидных клеток, на наш взгляд, перспективно использование лектина томата, который способен связываться с поверхностными гликопротеинами лимфоцитов [1], эндотелием капилляров [6], клетками макрофагальной линии [3] и опухолевыми клетками [5], т. е. может служить универсальным маркером для большинства клеточных элементов ЛУ.

Целью нашего исследования стало описание гистотопографической организации клеток с вы-

соким уровнем гликозилирования в лимфатических узлах пациентов с В-хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ) в сравнении с контролем, в качестве которого исследовались лимфатические узлы с реактивной гиперплазией.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили биоптаты надключичных и шейных лимфоузлов пациентов БУЗ УР «Первая республиканская клиническая больница МЗ УР» с верифицированными диагнозами «В-ХЛЛ» (16 пациентов) в возрасте 49-73 лет, полученные до начала лечения, с информированного добровольного согласия пациентов. Контрольную группу составили биоптаты лимфатических узлов 12 лиц в возрасте 48-70 лет с реактивной гиперплазией лимфатических узлов. Биоптаты лимфатических узлов фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Отмывка от фиксатора, обезвоживание в батарее спиртов восходящей концентрации и пропитывание парафином проводили по общепринятой стандартной методике. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм монтировали на предметные стекла и после депарафинизации в ксилоле и проведения по батарее спиртов нисходящей концентрации окрашивали лектином томата *Lycopersicon esculentum*, конъюгированным с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) (1:500; Sigma-Aldrich, США). Препараты заключали в среду, содержащую флуоресцентный краситель йодид пропидия (ИП), позволяющий визуализировать гетерохроматин ядер (Abscam, Великобритания). Гистологические препараты изучали в микроскопе Nikon Eclipse E200, оснащенный люминесцентным блоком и фотоприставкой MicroPublisher 3.3 RTV (QImaging, Канада).

Результаты и обсуждение

Окрашивание гистологических срезов узлов с В-ХЛЛ и реактивной гиперплазией ФИТЦ-конъюгированным лектином томата и йодидом пропидия позволило обнаружить характерные особенности архитектонической организации малигнизированных ЛУ, отличающие их от контрольных, реактивно гиперплазивных ЛУ. У пациентов контрольной группы выявленные нами изменения в строении ЛУ не отличались от допустимых норм. Окраска ФИТЦ-конъюгированным лектином томата позволила

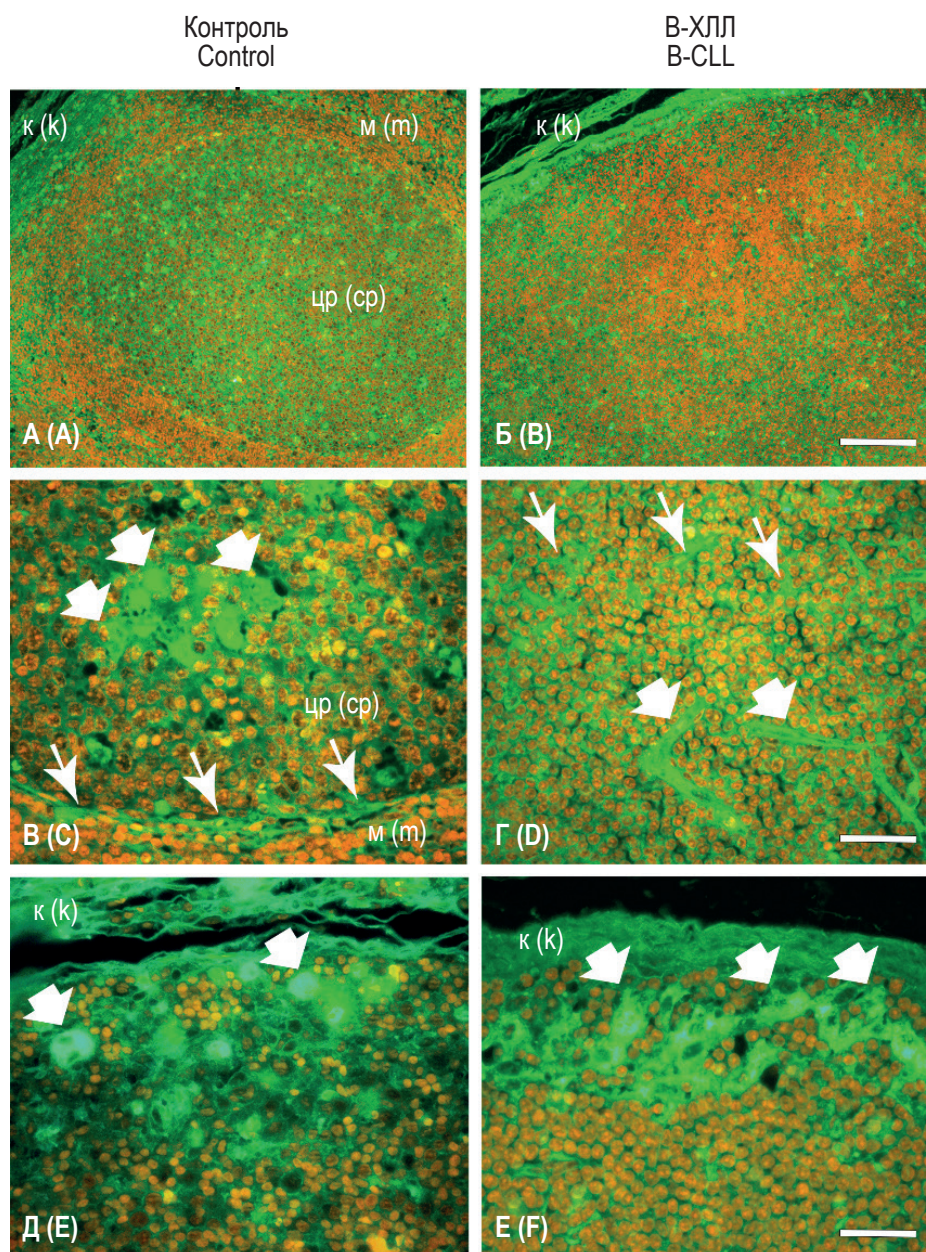


Рисунок 1. Клетки и внеклеточные элементы стромы лимфатических узлов пациентов с реактивной гиперплазией (контроль) и В-хроническим лимфолейкозом, окрашенные ФИТЦ-конъюгированным лектином томата (зеленое окрашивание) и йодидом пропидия (красное окрашивание)

Примечание. А – фолликул в кортексе лимфоузла. Обозначения: к – капсула; цр – центр размножения; м – мантия. Б – кортекс лимфоузла. Обозначения: к – капсула. Увеличения для А и Б: ок. 10 $\times$. Длина масштабного отрезка = 500 мкм. В – фрагмент фолликула. Обозначения: цр – центр размножения; м – мантия; толстые стрелки – макрофагоподобные клетки; тонкие стрелки – ретикулярные клетки и волокна на границе мантии и центра размножения; Г – фрагмент кортекса. Обозначения: тонкие стрелки – ретикулярные клетки и волокна; толстые клетки – кровеносные сосуды. Увеличения для В и Г: ок. 40 $\times$. Длина масштабного отрезка = 90 мкм. Д, Е – макрофагоподобные клетки в субкапсулярной зоне (выделены стрелками). Обозначения: к – капсула. Ув: ок. 40 $\times$. Длина масштабного отрезка = 80 мкм.

Figure 1. Cells and extracellular elements of lymph node stroma of patients with reactive hyperplasia (control) and B-chronic lympholeukaemia stained with FITC-conjugated tomato lectin (green staining) and propidium iodide (red staining)

Note. A, follicle in lymph node cortex. Notations: k, capsule; cp, germinal centre; m, mantle. B, cortex of lymph node. Notations: k, capsule. Magnifications for A and B: ocular 10 $\times$. Scale length = 500 μ m. C, follicle fragment. Notations: cp, germinal centre; m, mantle; thick arrows, macrophage-like cells; thin arrows, reticular cells and fibres at the border of mantle and germinal centre; G, cortex fragment. Notations: thin arrows – reticular cells and fibres; thick arrows, blood vessels. Magnifications for C and D: ocular 40 $\times$. Scale length = 90 μ m. E, F, macrophage-like cells in the subcapsular zone (highlighted by arrows). Notations: k, capsule. Magnifications: 40 $\times$. Scale length = 80 μ m.

выявить капсулу органа из плотных коллагеновых волокон и небольшого числа фиброцитов (рис. 1А). От субкапсулярного краевого синуса до глубокой коры отходили коллагеновые пучки, образующие межфолликулярные трабекулы. В области фолликулов пучки коллагеновых волокон изгибались по контуру центров размножения (ЦР) фолликулов, образуя вместе с ретикулярными клетками своеобразную «капсулу» на границе между ЦР и мантией (рис. 1В). Кортикальная зона была расширена, содержала лимфоидные фолликулы различного размера (рис. 1А). Центры размножения (ЦР) фолликулов состояли из лимфоидных клеток на разных этапах развития, о чем свидетельствовали отличия не только в площади клеток, но и в плотности упаковки и распределении в ядре меченого ИП гетерохроматина. Крупные параиммунобласты, центробласты и центроциты характеризовались последовательно нарастающим количеством в ядрах люминесцирующего продукта, тогда как зрелые лимфоциты, образующие мантию фолликулов, имели яркое свечение плотноупакованного гетерохроматина. В субкапсулярной зоне (СЗ) и ЦР обращали на себя клетки с большой площадью цитоплазмы, имевшие неправильную или отросчатую форму, соответствующие по внешнему виду клеткам макрофагальной линии (рис. 1Д). Примечательно, что в цитоплазме макрофагopodobных клеток ЦР, в отличие от таковых в СЗ, обнаруживались включения различного размера, часто окрашиваемые ИП, что свидетельствует о высокой фагоцитарной активности этих клеток.

Анализ препаратов лимфатических узлов пациентов с В-ХЛЛ, свидетельствовал о значительных изменениях в гистотопографии клеток и внеклеточных структур с высоким уровнем гликозилирования. Паренхима коркового слоя лимфоузлов содержала небольшое количество остаточных герминативных центров и в основном была заполнена массивом из малых лимфоцитов с круглыми ядрами с плотным, интенсивно окрашенным хроматином (рис. 1Б). На их фоне выявлялись менее окрашенные центры пролиферации (ЦП) с лимфоцитами большего размера и менее плотной упаковкой ИП-меченого хроматина. Кортикальная область характеризовалась наличием дезорганизованной сети из тонких ретикулярных волокон и клеток, а также большим количеством кровеносных сосудов малого калибра (рис. 1Г). Макрофагподобные клетки в этой

области отсутствовали, но обращает на себя внимание их повышенное количество и степень люминесцентного свечения относительно контроля в субкапсулярной области (рис. 1Е). За счет контактирующих отростков они образовывали своеобразную сеть на границе краевого синуса и паренхимы ЛУ. Такая же плотная сеть из контактирующих макрофагподобных клеток окружала утолщенные пучки правильно ориентированных коллагеновых волокон, образующих трабекулы в паракортикальной области и мозговой области ЛУ. Наличие таких трабекул служило отличительной чертой ЛУ пациентов с В-ХЛЛ.

Заключение

Окрашивание биоптатов ЛУ при помощи ФИТЦ-конъюгированного лектина с докраской гетерохроматина йодидом пропидия позволяет получать четкую гистологическую картину структурной организации ключевых регуляторных элементов лимфопоеза – фолликулярных макрофагподобных клеток, ретикулярных клеток, сосудов микроциркуляции и ретикулярной стромы. Наблюдаемая картина значительно превосходит по информативности стандартную, получаемую при окраске гистологических срезов рутинными красителями, такими как гематоксилин и эозин, и может быть рекомендована для проведения качественной диагностики патологических процессов в лимфатических узлах.

Обнаруженная при помощи предлагаемого гистохимического окрашивания патологическая микроархитектура лимфатических узлов пациентов с В-ХЛЛ свидетельствует о нарушениях в них пространственно организованных взаимодействий между патрулирующими лимфоцитами, фибробластами и антигенпрезентирующими макрофагами, которые необходимы для эффективного противоопухолевого иммунного ответа. Ремоделирование стромы ЛУ может свидетельствовать о вовлеченности стромальных элементов в генез ХЛЛ и/или в процесс избегания малигнизированными клетками иммунного надзора. Поскольку при В-ХЛЛ все эти структуры экспрессируют гликаны на высоком уровне, логично полагать, что последние вовлечены в молекулярные механизмы малигнизированного лимфопоеза и могут в будущем рассматриваться в качестве терапевтической мишени для лечения злокачественных новообразований.

Список литературы / References

1. Blöchl C., Wang D., Mayboroda O.A., Lageveen-Kammeijer G.S.M., Wuhler M. Transcriptionally imprinted glycomic signatures of acute myeloid leukemia. *Cell Biosci.*, 2023, Vol. 13, no. 1, 31. doi: 10.1186/s13578-023-00981-0.
2. Cerreto M., Foà R., Natoni A. The role of the microenvironment and cell adhesion molecules in chronic lymphocytic leukemia. *Cancers (Basel)*, 2023, Vol. 15, no. 21, 5160. doi: 10.3390/cancers15215160.
3. Chaves Filho A.J.M., Jucá P.M., Soares M.V.R., de Oliveira C.A., de Sousa R.C., Lós D.B., Russo R.C., Yaochite J.N.U., Macedo D.S. In vitro immunogenic profile of recombinant SARS-CoV2 S1-RBD peptide in murine macrophage and microglial cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 2023, Vol. 118, e220144. doi: 10.1590/0074-02760220144.
4. de Sousa G.F., Lund R.G., da Silva Pinto L. The Role of plant lectins in the cellular and molecular processes of skin wound repair: an overview. *Curr. Pharm. Des.*, 2023, Vol. 29, no. 33, pp. 2618-2625.
5. Godinho-Pereira J., Vaz D., Figueira I., Aniceto-Romão J., Krizbai I., Malhó R., Rocha J., Carvalheiro M.C., Simões S., Gaspar M.M., Brito M.A. Breast cancer brain metastases: implementation and characterization of a mouse model relying on malignant cells inoculation in the carotid artery. *Cells.*, 2023, Vol. 12, no. 16, 2076. doi: 10.3390/cells12162076.
6. Jiao C., Adler K., Liu X., Sun W., Mullins R.F., Sohn E.H. Visualization of mouse choroidal and retinal vasculature using fluorescent tomato lectin perfusion. *Transl. Vis. Sci. Technol.*, 2020, Vol. 9, no. 1, 1. doi: 10.1167/tvst.9.1.1.
7. Reily C., Stewart T.J., Renfrow M.B., Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2019, Vol. 15, pp. 346-366.
8. Su H., Wang M., Pang X., Guan F., Li X., Cheng Y. When glycosylation meets blood cells: a glance of the aberrant glycosylation in hematological malignancies. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 2021, Vol. 180, pp. 85-117.
9. Suzuki O. Glycosylation in lymphoma: Biology and glycotherapy. *Pathol. Int.*, 2019, Vol. 69, no. 8, pp. 441-449.

Авторы:

Аникаева М.С. — аспирант кафедры физиологии, клеточной биологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Толстоуцкая Т.О. — к.м.н., доцент кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Ижевская медицинская академия», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Сергеев В.Г. — д.б.н., заведующий кафедрой физиологии, клеточной биологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; заведующий экспериментально-учебной лабораторией ФГБОУ ВО «Ижевская медицинская академия», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Authors:

Anikaeva M.S., Postgraduate Student, Department of Physiology, Cell Biology and Biotechnology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Tolstolutskaia T.O., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Izhevsk Medical Academy, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Sergeev V.G., PhD, MD (Biology), Head, Department of Physiology, Cell Biology and Biotechnology, Udmurt State University; Head, Experimental and Educational Laboratory, Izhevsk Medical Academy, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 04.04.2024
Принята к печати 12.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 04.04.2024
Accepted 12.04.2024

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ЭНХАНСЕРНОЙ РНК LINC00910, КОРРЕЛИРУЮЩЕЙ С ИММУНОРЕГУЛЯТОРОМ STAT3, В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ

Стасевич Е.М.^{1,2}, Симонова А.В.¹, Уварова А.Н.¹, Жеремян Э.А.¹,
Корнеев К.В.¹, Богомолова Э.А.¹, Демин Д.Э.¹

¹ ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт», г. Долгопрудный, Московская обл., Россия

Резюме. Фактор транскрипции STAT3 играет ключевую роль в передаче сигнала от рецепторов цитокинов и поэтому выполняет роль иммунорегулятора. В то же время, в различных типах раковых клеток STAT3 принимает участие в молекулярных механизмах онкогенеза. В частности, для глиобластомы была показана связь иммунорегулятора STAT3 с устойчивостью к наиболее распространенному для лечения этого типа рака химиическому агенту темозоломиду. Кроме того, в литературе есть данные о том, активация данного онкогена в клетках глиобластомы способна играть ключевую роль в модуляции толерогенного микроокружения опухоли, ослабляя противоопухолевый иммунный ответ и способствуя агрессивному течению заболевания. Таким образом, подавление STAT3 может влиять не только на рост клеток и устойчивость к химиотерапии, но и также на микроокружение опухоли, усиливая иммунный ответ.

С развитием технологий секвенирования появились данные о том, что большая часть транскрибируемого материала в клетке является некодирующей. Все больше популярности набирает исследование длинных некодирующих РНК в онкогенезе, для которых была показана функциональная роль в развитии различных заболеваний, в том числе в онкологии. В частности, особое внимание привлекает подтип длинных некодирующих РНК, транскрибируемый с энхансерных элементов, называемый энхансерные РНК, так как данный класс РНК обладает высокой специфичностью в различных клетках и тканях. Анализ коэкспрессии генов в опухолях глиобластомы выявил корреляцию экспрессии STAT3 с энхансерной РНК LINC00910, ген которой находится в одном хромосомном домене с геном STAT3. Ранее по литературным данным LINC00910 была ассоциирована с колоректальным раком и

Адрес для переписки:

Стасевич Екатерина Михайловна
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.
Тел.: 8 (499) 135-14-05.
E-mail: ogstasevich@gmail.com

Address for correspondence:

Ekaterina M. Stasevich
Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences
32 Vavilov St
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (499) 135-14-05.
E-mail: ogstasevich@gmail.com

Образец цитирования:

Е.М. Стасевич, А.В. Симонова, А.Н. Уварова,
Э.А. Жеремян, К.В. Корнеев, Э.А. Богомолова,
Д.Э. Демин «Анализ экспрессии энхансерной РНК
LINC00910, коррелирующей с иммунорегулятором
STAT3, в клетках глиобластомы» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 813-818.
doi: 10.15789/1563-0625-AOE-16923

© Стасевич Е.М. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.M. Stasevich, A.V. Simonova, A.N. Uvarova,
E.A. Zheremyan, K.V. Korneev, E.A. Bogomolova, D.E. Demin
“Analysis of enhancer RNA LINC00910 expression correlating
with the immunoregulator STAT3 in glioblastoma cells”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 4, pp. 813-818.
doi: 10.15789/1563-0625-AOE-16923

© Stasevich E.M. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-AOE-16923

раком желудка. Данные базы GeneHancer также указывают на возможное участие энхансерной РНК LINC00910 в регуляции иммунорегулятора STAT3. Мы провели эффективный нокдаун энхансерной РНК LINC00910 с использованием метода РНК-интерференции, который привел к 8-10-кратному снижению его экспрессии в клеточных линиях глиобластомы. Снижение экспрессии LINC00910 не оказало значительного влияния на экспрессию гена *Stat3* в клеточных линиях глиобластомы DBTRG-05MG и U251. Это указывает на то, что корреляция экспрессии РНК LINC00910 с экспрессией гена *Stat3* не является следствием прямого участия LINC00910 в регуляции гена *Stat3* в этих клетках. Дальнейшие исследования с использованием подобранной интерферирующей РНК позволят уточнить роль энхансерной РНК LINC00910 в других сигнальных путях, а также потенциальную связь данной энхансерной РНК с развитием рака.

Ключевые слова: энхансерная РНК, эРНК, *Stat3*, глиобластома, РНК-интерференция, некодирующая РНК, LINC00910

ANALYSIS OF ENHANCER RNA LINC00910 EXPRESSION CORRELATING WITH THE IMMUNOREGULATOR STAT3 IN GLIOBLASTOMA CELLS

Stasevich E.M.^{a,b}, Simonova A.V.^a, Uvarova A.N.^a, Zheremyan E.A.^a,
Korneev K.V.^a, Bogomolova E.A.^a, Demin D.E.^a

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The transcription factor STAT3 serves as an immunoregulator by playing a crucial role in cytokine receptor signaling. However, in various cancer cell types, STAT3 is involved in the molecular mechanisms of oncogenesis. Specifically, in glioblastoma, the STAT3 immunoregulator has been linked to resistance to temozolomide, the most commonly used chemical agent for treating this type of cancer. Furthermore, literature suggests that activation of this oncogene in glioblastoma cells can significantly impact the tolerogenic tumor microenvironment, weakening the antitumor immune response and contributing to the aggressive course of the disease. Therefore, suppressing STAT3 may not only affect cell growth and resistance to chemotherapy but also enhance the immune response by improving the tumor microenvironment.

The development of sequencing technologies has revealed that most of the transcribed material in the cell is noncoding. Long non-coding RNAs are gaining popularity in the study of oncogenesis due to their functional role in the development of various diseases, including oncology. A subtype of long non-coding RNAs transcribed from enhancer elements, known as enhancer RNAs, has garnered attention due to their high specificity in various cells and tissues. Gene co-expression analysis in glioblastoma tumors showed a correlation between STAT3 expression and the enhancer RNA LINC00910, which is located in the same chromosomal domain as the *Stat3* gene. Previous literature has shown that LINC00910 is associated with both colorectal and gastric cancer. Additionally, data from the GeneHancer database suggests that the enhancer RNA LINC00910 may be involved in regulating the STAT3 immunoregulator. RNA interference was used to effectively knockdown the enhancer RNA LINC00910, resulting in an 8- to 10-fold reduction in its expression in glioblastoma cell lines. The reduction of LINC00910 expression did not significantly affect *Stat3* gene expression in glioblastoma cell lines DBTRG-05MG and U251. This suggests that the correlation between LINC00910 RNA expression and STAT3 gene expression is not due to LINC00910's direct involvement in STAT3 gene regulation in these cells. Further studies using the selected interfering RNA will help to clarify the role of the enhancer RNA LINC00910 in other signalling pathways, as well as its potential relationship with cancer development.

Keywords: enhancer RNA, eRNA, *Stat3*, glioblastoma, RNA interference, non-coding RNA, LINC00910

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-24-00130).

Введение

Глиобластома является тяжелым онкологическим заболеванием с пятилетней выживаемостью около 10%. Стандартная терапия этого наиболее распространенного вида рака мозга заключается в хирургическом удалении опухоли, лучевой терапии и воздействии алкилирующим химическим агентом темозоломидом. Однако процент летальных исходов остается высоким, в частности из-за высокой устойчивости к темозоломиду [2]. STAT3 является одним из важных онкогенов, влияющих на клеточный рост и устойчивость глиобластомы к химиотерапевтическим препаратам. Известно, что нокдаун STAT3 или его ингибирование увеличивают чувствительность клеток глиобластомы к темозоломиду [4, 7]. Помимо регуляции опухолевой инвазии, ангиогенеза, пролиферации раковых клеток, а также предотвращения их апоптотической гибели, STAT3 играет ключевую роль в поддержании химиорезистентности глиобластомы, подавляя противоопухолевый иммунный ответ, что делает STAT3 потенциальной иммунотерапевтической мишенью [1]. Цитокины, экспрессируемые стволовыми клетками глиобластомы, активируют иммунорегуляторный белки B7-H4 в опухолевых макрофагах посредством STAT3-сигналинга, что в дальнейшем блокирует функцию Т-клеток и способствует иммунному избеганию опухолевых клеток [8, 13]. Таким образом, воздействие на STAT3 может являться перспективным направлением иммунотерапии рака.

Некодирующие РНК составляют большую часть транскриптов в клетке [7]. Энхансерные РНК (эРНК) – подтип длинных некодирующих РНК, транскрибируемый с энхансерных элементов. Известно, что экспрессия эРНК коррелирует с активностью тканеспецифического энхансера [12]. Для многих эРНК была показана способность влиять на экспрессию онкогенов, что влияет на клеточную пролиферацию и устойчивость к химиотерапии [10, 11]. эРНК, влияющая на экспрессию STAT3, может быть как маркером активности конкретного энхансера, что даст понимание в механизме регулирования STAT3, так и потенциальной мишенью для подавления экспрессии STAT3.

Материалы и методы

Ведение клеточных линий и нокдаун

В работе использовались клеточные линии глиобластомы DBTRG-05MG и U251. Клеточные линии велись в среде DMEM с содержанием

глюкозы 4,5 г/л (НПП «ПанЭко», Россия), с добавлением смеси антибиотиков из пенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (НПП «ПанЭко», Россия), 1% раствора заменимых аминокислот (НПП «ПанЭко», Россия) и 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, Biosera, Франция).

Подавление экспрессии эРНК LINC00910 производилось с помощью метода РНК-интерференции. Для этого с помощью программы InvivoGen siRNA Wizard v3.1 tool (<https://www.invivogen.com/sirnazard/>) были подобраны последовательности малых интерферирующих РНК (siRNA). Нокдаун эРНК LINC00910 производился с помощью siRNA: GUCGGACAACUAGCCAUUAUCTdTdT; AGAU AUGGCUAGUUGUCCGACdTdT (ООО «ДНК-Синтез», Россия). В качестве контроля были использованы рандомизированные РНК: GUCUCCACUCCGAAGUAUAGAdTdT; UCUAUACUUCGGAGUGGAGACdTdT (ООО «ДНК-Синтез», Россия). Доставка siRNA производилась с помощью реагента Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, США).

Через час после трансфекции к клеточным линиям был добавлен темозоломид (TMZ) в концентрации 20 мкг/мл, растворенный в DMSO. В качестве контроля был использован растворитель терапевтического вещества DMSO.

Выделение РНК и полимеразная цепная реакция в реальном времени

Выделение тотальной РНК из клеток производилось через 24 часа после трансфекции с помощью реагента ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) по протоколу, рекомендованному в наборе. кДНК из тотальной РНК получали с помощью набора реагентов MMLV RT kit (ЗАО «Евроген», Россия) с использованием олиго-дТ праймеров и случайных нуклеотидных праймеров в соотношении 1 к 1, согласно инструкции. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась с помощью реагентов qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия) и специфичных праймеров: LINC00910 – TCTGCACCCAAACCAGATGC; TCAGGCGGTGATACTTGCTC, STAT3 – ATGGAGATTGCCCGGATTGTG; GCTGCTGTGGGGTGGTTG. Нормировка производилась на ген домашнего хозяйства GAPDH – CAAGGTCATCCATGACAACCTTG; GGCCATCCACAGTCTTCTGG.

Результаты и обсуждение

Для нахождения эРНК, способной контролировать экспрессию гена *Stat3*, был проведен поиск с использованием различных баз данных. По базе данных эРНК eRic (<https://hanlaboratory.com/eRic/>) были отобраны РНК, коррелирующие по экспрессии со STAT3. Среди отобран-

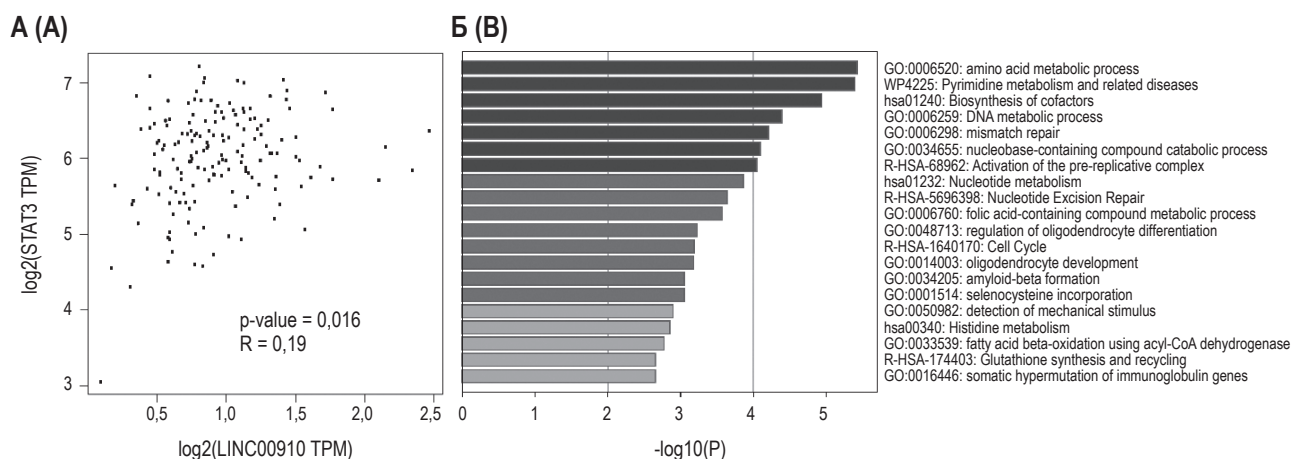


Рисунок 1. Корреляционный анализ эРНК LINC00910

Примечание. А – на рисунке представлен корреляционный анализ эРНК LINC00910 и STAT3 в образцах глиобластомы человека (корреляционный коэффициент Пирсона). Для расчета взяты данные РНК секвенирования по глиобластомам из проекта TCGA. Б – обогащение функциональных групп с тысячей положительно коэкспрессируемых с LINC00910 генов в кортексах человека из проекта GTEx.

Figure 1. Correlation analysis of LINC00910 eRNA

Note. A, the figure displays the correlation analysis of LINC00910 and STAT3 eRNA in human glioblastoma samples using Pearson's correlation coefficient. RNA sequencing data on glioblastomas from the TCGA project were used for calculation. B, enrichment of functional groups with thousand positively co-expressed with LINC00910 genes in human cortexes from the GTEx project.

ных вариантов была обнаружена одна эРНК, про которую была найдена информация в литературе. Было показано, что происходит значительное повышение экспрессии LINC00910 в мононуклеарных клетках периферической крови при колоректальном раке [5]. При раке желудка

LINC00910 была гиперметилована и высоко экспрессировалась при раке желудка [6]. Также по данным базы GeneHancer Double Elite энхансер (GH17J043366), перекрывающийся с РНК LINC00910, может взаимодействовать с промотором STAT3. Используя данные базы GEPIA

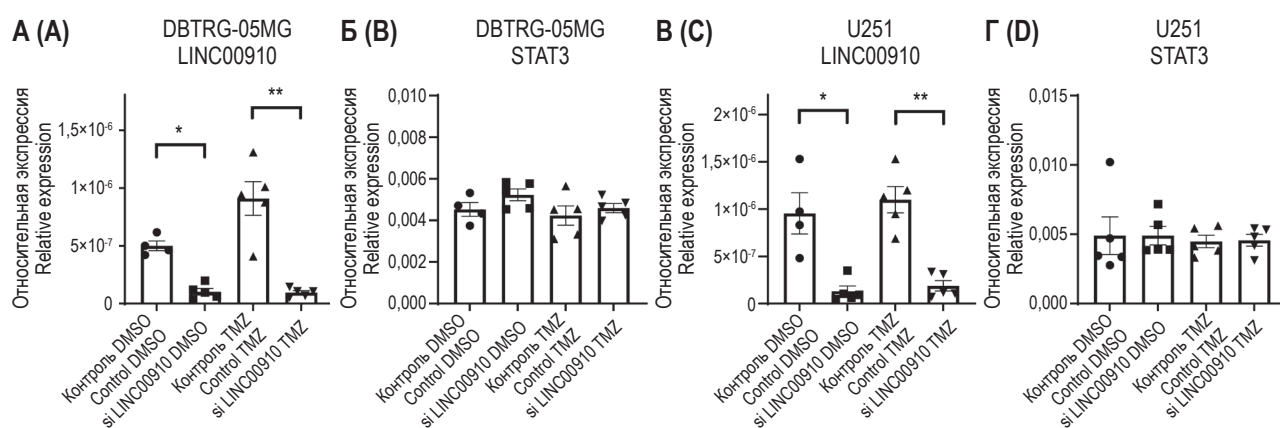


Рисунок 2. Нокдаун РНК LINC00910 в клеточных линиях глиобластомы

Примечание. На рисунке изображена экспрессия РНК LINC00910 (А, В) и STAT3 (Б, Г) в клеточных линиях DBTRG-05MG (А, Б) и U251 (В, Г) при подавлении РНК LINC00910 (si LINC00910) при добавлении TMZ и растворителя DMSO. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ (критерий Манна–Уитни). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего.

Figure 2. LINC00910 RNA knockdown in glioblastoma cell lines

Note. The figure displays the expression of LINC00910 (A, C) and STAT3 (B, D) RNA in DBTRG-05MG (A, B) and U251 (C, D) cell lines when LINC00910 RNA (si LINC00910) was suppressed by the addition of TMZ and DMSO solvent. Statistical significance is indicated by *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Mann–Whitney test). The data are presented as the mean value and standard error of the mean.

(<http://gepia.cancer-pku.cn>), была также подтверждена корреляция между эРНК LINC00910 и STAT3 (рис. 1А). В кортексах человека, представленных в проекте GTEx, был произведен анализ коэкспрессии генов с LINC00910, как описано в [3]. Среди полученных функциональных кластеров были обнаружены группы, связанные с репарацией ДНК и клеточным циклом, что соответствует предположению об участии LINC00910 в регуляции хемирезистентности и клеточного роста.

На клеточных линиях глиобластомы был произведен нокаут эРНК LINC00910 с помощью РНК-интерференции (рис. 2). Экспрессия LINC00910 снизилась в среднем в 6-8 раза при добавлении si LINC00910, как при добавлении темозоломида, так в контрольных образцах (рис. 2А, В).

При нокауте LINC00910 экспрессия STAT3 осталась неизменной (рис. 2Б, Г). Таким образом, в клетках глиобластомы DBTRG-05MG и U251 эффект на онкоген STAT3 не наблюдается. При этом отдельно отметим, что часто можно наблюдать специфичный для клеток эффект, таким образом в других клеточных линиях глиобластомы может наблюдаться воздействие от эРНК LINC00910 на STAT3.

Заключение

STAT3 — важный онкоген и иммуносупрессор в глиобластоме. С помощью различных баз данных был осуществлен поиск эРНК, коррелирующих с STAT3 и энхансер которых потенциально взаимодействует с промотором STAT3. Среди кандидатов мы остановили свое внимание на РНК LINC00910, так как она аннотирована и имела упоминания в научной литературе.

Для подавления РНК LINC00910 были успешно подобраны малые интерферирующие РНК. Нокаут производился на клеточных линиях глиобластомы DBTRG-05MG и U251, и снижение экспрессии LINC00910 составило около 0,15 от экспрессии РНК в контрольных образцах. Такое изменение экспрессии свидетельствует о высокой эффективности подобранной малой интерферирующей РНК. Однако предварительные прогнозы касательно влияния LINC00910 на сигнальный путь STAT3 в этих клеточных линиях, основанные на данных биоинформатических баз, не нашли подтверждения. В свете этих результатов представляется целесообразным провести дальнейшие исследования для оценки влияния данной РНК на другие сигнальные пути с использованием отработанной методики.

Список литературы / References

1. Chang N., Ahn S.H., Kong D.-S., Lee H.W., Nam D.-H. The role of STAT3 in glioblastoma progression through dual influences on tumor cells and the immune microenvironment. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2017, Vol. 451, pp. 53-65.
2. Cruz J.V.R., Batista C., de Holanda Afonso B., Alexandre-Moreira M.S., Dubois L.G., Pontes B., Neto V.M., de Almeida Mendes F. Obstacles to glioblastoma treatment two decades after temozolomide. *Cancers*, 2022, Vol. 14, no. 13, 3203. doi: 10.3390/cancers14133203.
3. Demin D.E., Murashko M.M., Uvarova A.N., Stasevich E.M., Shyrokov E.Yu., Gorlachev G.E., Zaretsky A.R., Korneev K.V., Ustiugova A.S., Tkachenko E.A., Kostenko V.V., Tatosyan K.A., Sheetikov S.A., Spirin P.V., Kuprash D.V., Schwartz A.M. Adversary of DNA integrity: A long non-coding RNA stimulates driver oncogenic chromosomal rearrangement in human thyroid cells. *Int. J. Cancer*, 2023, Vol. 152, no. 7, pp. 1452-1462.
4. Lee E.S., Ko K.-K., Joe Y.A., Kang S.-G., Hong Y.-K. Inhibition of STAT3 reverses drug resistance acquired in temozolomide-resistant human glioma cells. *Oncol. Lett.*, 2011, Vol. 2, no. 1, pp. 115-121.
5. Li Z., Wang D., Zhang W., Shi H., Zhu M. Novel PBMC LncRNA signatures as diagnostic biomarkers for colorectal cancer. *Pathol. Res. Pract.*, 2024, Vol. 253, 154985. doi: 10.1016/j.prp.2023.154985
6. Lv Z., Sun L., Xu Q., Xing C., Yuan Y. Joint analysis of lncRNA m 6 A methylome and lncRNA/mRNA expression profiles in gastric cancer. *Cancer Cell Int.*, 2020, Vol. 20, pp. 1-14.
7. Kohsaka S., Wang L., Yachi K., Mahabir R., Narita T., Itoh T., Tanino M., Kimura T., Nishihara H., Tanaka S. STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression. *Mol. Cancer Ther.*, 2012, Vol. 11, no. 6, pp. 1289-1299.
8. Piperi C., Papavassiliou K.A., Papavassiliou A.G. Pivotal role of STAT3 in shaping glioblastoma immune microenvironment. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 11, 1398. doi: 10.3390/cells8111398.
9. Quinn J.J., Chang H.Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat. Rev. Genet.*, 2016, Vol. 17, no. 1, pp. 47-62.
10. Stasevich E.M., Uvarova A.N., Murashko M.M., Khabusheva E.R., Sheetikov S.A., Prassolov V.S., Kuprash D.V., Demin D.E., Schwartz A.M. Enhancer RNA AL928768.3 from the IGH locus regulates MYC expression and controls the proliferation and chemoresistance of Burkitt lymphoma cells with IGH/MYC translocation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 9, 4624. doi: 10.3390/ijms23094624.

11. Stasevich E.M., Murashko M.M., Zinevich L.S., Demin D.E., Schwartz A.M. The role of non-coding RNAs in the regulation of the proto-oncogene MYC in different types of cancer. *Biomedicines*, 2021, Vol. 9, no. 8, 921. doi: 10.3390/biomedicines9080921.
12. Wu H., Nord A.S., Akiyama J.A., Shoukry M., Afzal V., Rubin E.M., Pennacchio L.A., Visel A. Tissue-specific RNA expression marks distant-acting developmental enhancers. *PLoS Genet.*, 2014, Vol. 10, no. 9, e1004610. doi: 10.1371/journal.pgen.1004610.
13. Yao Y., Ye H., Qi Z., Mo L., Yue Q., Baral A., Hoon D.S.B., Vera J.C., Heiss J.D., Chen C.C., Hua W., Zhang J., Jin K., Wang Y., Zang X., Mao Y., Zhou L. B7-H4 (B7x)-Mediated Cross-talk between glioma-initiating cells and macrophages via the IL6/JAK/STAT3 pathway lead to poor prognosis in glioma patients. *Clin. Cancer Res.*, 2016, Vol. 22, no. 11, pp. 2778-2790.

Авторы:

Стасевич Е.М. — младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук»; аспирант ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт», г. Долгопрудный, Московская обл., Россия

Симонова А.В. — старший лаборант лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва, Россия

Уварова А.Н. — к.б.н., младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва, Россия

Жеремян Э.А. — старший лаборант лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва, Россия

Корнеев К.В. — к.б.н., научный сотрудник центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва, Россия

Богомолова Э.А. — старший лаборант лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва, Россия

Демин Д.Э. — к.б.н., младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва, Россия

Authors:

Stasevich E.M., Junior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; PhD Student, Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation

Simonova A.V., Senior Laboratory Assistant, Laboratories for the Transmission of Intracellular Signals in Normal and Pathological Conditions, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Uvarova A.N., PhD (Biology), Junior Laboratory Assistant, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Zheremyan E.A., Senior Laboratory Assistant, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Korneev K.V., PhD (Biology), Laboratory Assistant, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Bogomolova E.A., Senior Laboratory Assistant, Laboratories for the Transmission of Intracellular Signals in Normal and Pathological Conditions, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Demin D.E., PhD (Biology), Junior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 04.04.2024
Принята к печати 11.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 04.04.2024
Accepted 11.04.2024

ОЦЕНКА ЛИМФОИДНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ (TILs) ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

**Заботина Т.Н., Борунова А.А., Черткова А.И., Шоуа И.Б.,
Кадагидзе З.Г.**

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства
здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Несмотря на успехи в ранней диагностике и лекарственном лечении больных раком молочной железы (РМЖ), отдаленные результаты лечения по-прежнему остаются малоудовлетворительными, в этой связи возрастает роль исследований, направленных на изучение различных механизмов развития этого заболевания. Установлено, что степень инфильтрации опухоли иммунными клетками и их состав напрямую связаны с развитием заболевания и ответом на терапию. Многопараметровая проточная цитометрия (ПЦ) позволяет проводить исследования субпопуляционного состава TILs.

Целью работы явилось изучение особенностей лимфоидного микроокружения (TILs) опухоли больных первично-операбельным и местно-распространенным РМЖ методом ПЦ.

В исследование включены больные первично-операбельным РМЖ (группа 1, n = 121) и местно-распространенным (группа 2, n = 80), получающим лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследовали TILs опухоли, полученной интраоперационно или путем корр-биопсии. Больные были разделены на 3 подгруппы: 1-я подгруппа – степень инфильтрации до 1%, 2-я подгруппа – степень инфильтрации от 1% до 10%, 3-я подгруппа – степень инфильтрации свыше 10%.

Для больных РМЖ 1-й группы оказалось характерным высокая функциональная активность и концентрация клеток эффекторного звена при низкой степени инфильтрации опухоли, а по мере нарастания количества лимфоцитов в опухоли отмечалось увеличение пула CD4⁺ клеток и CD4 Treg одновременно со снижением количества и функциональной активности эффекторных TILs. Во 2-й группе не выявлено достоверных различий клеточного состава TILs в подгруппах со слабой и средней степенью инфильтрации, а вариант с инфильтрацией более 10% был зафиксирован только у одной пациентки. Отсутствие связи субпопуляционной структуры TILs в подгруппах с разной степенью инфильтрации опухоли свидетельствует о сходном характере локального иммунного ответа при местно-распространенном РМЖ.

Таким образом, в отличие от больных местно-распространенным раком молочной железы, у пациентов первично-операбельным РМЖ прослеживается изменение типа локального иммунного ответа

Адрес для переписки:

Заботина Татьяна Николаевна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр онкологии имени Н.Н. Блохина»
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.
Тел.: 8 (903) 015-22-11.
E-mail: tatzabotina@yandex.ru

Address for correspondence:

Tatiana N. Zabolina
N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology
24 Kashirskoe Highway
Moscow
115522 Russian Federation
Phone: +7 (903) 015-22-11.
E-mail: tatzabotina@yandex.ru

Образец цитирования:

Т.Н. Заботина, А.А. Борунова, А.И. Черткова,
И.Б. Шоуа, З.Г. Кадагидзе «Оценка лимфоидного
микроокружения опухоли (TILs) при раке молочной
железы методом проточной цитометрии»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4.
С. 819-826.

doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16855

© Заботина Т.Н. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.N. Zabolina, A.A. Borunova, A.I. Chertkova, I.B. Shoua,
Z.G. Kadagidze "Analysis of the lymphoid tumor
microenvironment (TILs) in breast cancer by flow cytometry",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 4, pp. 819-826.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16855

© Zabolina T.N. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-AOT-16855

от эффекторного к регуляторному. Высокая степень инфильтрации опухоли характеризуется истощением функции клеток эффекторного звена.

Ключевые слова: цитометрия, субпопуляции лимфоцитов, микроокружение опухоли, TILs, рак молочной железы, иммунофенотип

ANALYSIS OF THE LYMPHOID TUMOR MICROENVIRONMENT (TILs) IN BREAST CANCER BY FLOW CYTOMETRY

Zabotina T.N., Borunova A.A., Chertkova A.I., Shoua I.B., Kadagidze Z.G.

N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Despite the success in early diagnosis and drug treatment of breast cancer patients, long-term treatment results are still unsatisfactory, and in this regard, the role of research aimed at studying various mechanisms of development of this disease is increasing. It has been established that the degree of tumor infiltration by immune cells and their composition are directly related to the development of the disease and the response to therapy. Multiparameter flow cytometry (PC) allows studies of the subpopulation composition of TILs. The aim of the work was to study the features of the lymphoid microenvironment (TILs) of tumors in patients with primary operable and locally advanced breast cancer by PC. The study included patients with primary operable breast cancer (group 1, $n = 121$) and locally advanced (group 2, $n = 80$) receiving treatment at the N. N. Blokhin NMRCO. The TILs of a tumor obtained intraoperatively or by a core-biopsy were examined. The patients were divided into 3 subgroups: 1 subgroup – the degree of infiltration up to 1%, 2 subgroup – the degree of infiltration from 1 to 10%, and 3 subgroup – the degree of infiltration over 10%. Patients of group 1 were characterized by high functional activity and concentration of effector cells with a low degree of tumor infiltration, and as the number of lymphocytes in the tumor increased, an increase in the pool of CD4⁺ cells and CD4 Treg was noted simultaneously with a decrease in the number and functional activity of effector TILs. In group 2 were no significant differences in the cellular composition of TILs in subgroups with a weak and moderate degree of infiltration, and a variant with infiltration of more than 10% was recorded in only one patient. The lack of association of the TILs subpopulation structure in subgroups with varying degrees of tumor infiltration indicates a similar nature of the local immune response in locally advanced breast cancer.

Thus, unlike patients with locally advanced breast cancer, patients with primary operable breast cancer show a change in the type of local immune response from effector to regulatory. A high degree of tumor infiltration is characterized by depletion of effector cell function.

Keywords: flow cytometry, lymphocyte subpopulations, tumor microenvironment, TILs, breast cancer, immunophenotype

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является лидирующей нозологической формой среди онкологических заболеваний у женщин и занимает первое рейтинговое место на протяжении последних десятилетий [1]. Достигнуты значительные успехи в ранней диагностике и лекарственном лечении РМЖ. Этому способствовали, в том числе, выделение различных биологических типов опухоли на основе молекулярно-биологических маркеров и индивидуализация лечения. В то

же время, отдаленные результаты лечения РМЖ остаются малоудовлетворительными, в этой связи возрастает роль исследований, направленных на изучение различных механизмов развития этого заболевания. В настоящее время не вызывает сомнения утверждение, что иммунная система способна распознавать опухоль и генерировать как локальный, так и системный иммунный ответ, направленный на подавление опухолевого роста [2, 5]. Установлено, что степень инфильтрации опухоли иммунными клетками и их состав напрямую связаны с развитием заболевания

и ответом на терапию [6]. Однако используемый методический подход иммуногистохимического анализа не позволяет проводить многопараметровое фенотипическое исследование иммунных клеток на уровне «единственной клетки» в пределах многоклеточного организма и ограничивает клиническое применение этих данных.

Цель работы — изучение особенностей лимфоидного микроокружения (TILs) опухоли больных первично-операбельным и местно-распространенным раком молочной железы методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

В исследование включены больные раком молочной железы, получающие хирургическое (первично-операбельный РМЖ, группа 1, $n = 121$) и лекарственное неoadъювантное (местно-распространенный РМЖ, группа 2, $n = 80$) лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Средний возраст больных первично-операбельным РМЖ составлял $56,1 \pm 12,0$ (мин-макс: 24-76), больных местно-распространенным РМЖ — $47,4 \pm 10,6$ (мин-макс: 29-66). Исследовали TILs опухолевой ткани, полученной интраоперационно или путем корр-биопсии. В зависимости от содержания TILs в опухолевой ткани, больные разделены на 3 подгруппы: 1-я подгруппа — степень инфильтрации до 1%, 2-я подгруппа — степень инфильтрации от 1% до 10%, 3-я подгруппа — степень инфильтрации свыше 10%. С целью получения клеточных суспензий фрагментацию ткани проводили с использованием системы Medimachine (BD Biosciences, США). Опухоль гомогенизировали в нестерильных одноразовых контейнерах (Medicons), пропускали через фильтры Filcons с диаметром пор не более 50 мкм. Иммунофлуоресцентное окрашивание образцов проводили по стандартной методике с использованием коммерческих моноклональных антител (МКА) к дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека, конъюгированных различными флуорохромами (BD Biosciences, Beckman Coulter, США). Количественный анализ степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами, а также анализ структуры субпопуляций лимфоидных клеток (TILs) проводили на проточном цитометре аналитического типа FACSCanto II (BD Biosciences, США) и Navios (Beckman Coulter, США). Использовали стандартные настройки и протоколы сбора и Dotplot анализа образцов, учитывали не менее 500-5000 клеток в CD45⁺ гейте. Обработку FSC файлов цитометрических данных проводили с помощью программного пакета Kaluza (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 17 (IBM SPSS Statistics, США). Определяли медиану и 1-й и 3-й квартили — Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), оценку распределения исследуемых показателей проводили по критерию нормальности Колмогорова—Смирнова. Различия между показателями оценивали с применением непараметрического U-критерия Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

В исследованиях иммунного микроокружения важными факторами являются как степень инфильтрации опухоли иммунными клетками, так и непосредственно клеточный состав иммунных клеток. На первом этапе было проведено изучение степени инфильтрации опухоли лимфоцитами (TILs) пациентов с первично-операбельным и местно-распространенным РМЖ по окрашиванию образцов анти-CD45 МКА. Количество TILs значительно варьировало в обеих клинических группах от 0,1 до -30,5. По степени инфильтрации опухоли лимфоцитами больные были разделены на 3 подгруппы: с низким, средним и высоким уровнем TILs. В качестве примера приводим рисунок с данными проточной цитометрии для каждой подгруппы (рис. 1А). При анализе частоты встречаемости различных вариантов инфильтрации лимфоцитами опухолевой ткани среди пациентов двух клинических групп оказалось, что большая часть больных (48,8%, 59/121) в группе 1 представлена образцами пациентов со средней степенью TILs (1-10%), а в группе 2 (66,3%, 53/80) — с низким содержанием TILs (до 1%). Доля образцов опухолевой ткани с высокой (более 10%) степенью инфильтрации наблюдалась в группе больных первично-операбельным РМЖ (9,9%, 12/121), среди второй группы только у одной пациентки (1,3%, 1/80) выявлено высокое содержание TILs в ткани. Распределение больных по частоте встречаемости пациентов с различной степенью инфильтрации опухоли лимфоидными клетками представлено на рисунке (рис. 1Б).

Известно, что в зависимости от условий клетки иммунной системы проявляют как проопухолевые, так и противоопухолевые функции. Проточно-цитометрическое многопараметровое исследование иммунофенотипа лимфоцитов позволяет судить о функциональном проявлении TILs в микроокружении опухоли. Именно лимфоциты являются основными иммунокомпетентными клетками у человека, и обусловлено это тем, что в их составе большая часть приходится на Т-клетки, обладающие способностью к

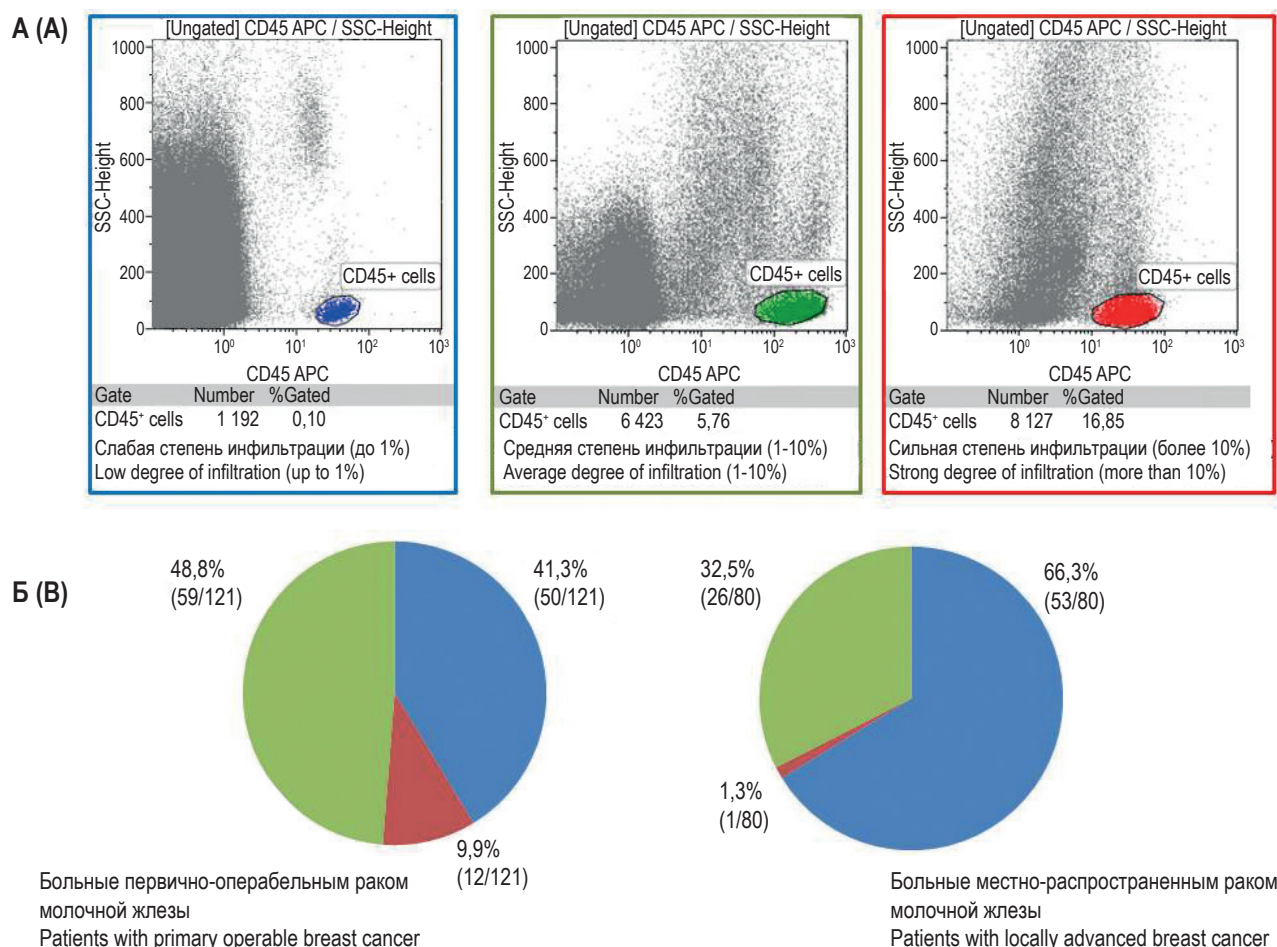


Рисунок 1. Исследование степени инфильтрации TILs в образцах опухолевой ткани больных РМЖ

Примечание. А – проточно-цитометрический анализ образцов опухоли с различной степенью инфильтрации TILs. Б – частота встречаемости различных вариантов степени инфильтрации TILs у больных первично-операбельным РМЖ и местно-распространенным РМЖ.

Figure 1. Investigation of the degree of infiltration of TILs in tumor tissue samples of breast cancer patients

Note. A, flow cytometric analysis of tumor samples with varying degrees of TILs infiltration. B, the frequency of occurrence of various variants of the degree of infiltration of TILs in patients with primary operable breast cancer and locally advanced breast cancer.

формированию иммунологической памяти и, как следствие, осуществлению иммунного контроля. Для выполнения конкретных задач лимфоциты способны рекрутировать любые лейкоциты. Следует признать, что большинство публикаций по изучению микроокружения опухоли представляют данные, полученные путем иммуногистохимического исследования, причем чаще всего это CD8⁺ клетки [8]. Однако с учетом высокой фенотипической гетерогенности этой субпопуляции, ее тесной взаимосвязи с NK-клетками, CD4-лимфоцитами, активированными клетками, наивными клетками, существует необходимость детализации ее структуры для понимания функционального потенциала специфического иммунного контроля опухолевого роста.

Важным является определение не только линейных популяций лимфоцитов – Т-, В-, NK-клеток, но и определение минорных субпопуляций, опосредующих эффекторные и регуляторные механизмы генерации локального иммунного ответа в ткани опухоли. Отличительной особенностью клеток регуляторного ряда является их высокая степень фенотипической гетерогенности по сравнению с клетками эффекторного звена. В то же время пул эффекторных клеток значительно преобладает над общим пулом клеток с регуляторными функциями. Здесь следует отметить, что современная иммунотерапия в онкологии как раз и развивается по пути блокады, элиминации или истощения регуляторных клеток и активации специфических клеток эффекторного ряда.

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНО-ОПЕРАБЕЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (N = 121) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ИНФИЛЬТРАЦИИ ОПУХОЛИ ЛИМФОЦИТАМИ

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH PRIMARY OPERABLE BREAST CANCER (N = 121) DEPENDING ON THE DEGREE OF TUMOR INFILTRATION BY LYMPHOCYTES

Показатель Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) % Indicator Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) %	Слабая степень инфильтрации (до 1%) Low degree of infiltration (up to 1%) (n = 50)	Средняя степень инфильтрации Average degree of infiltration (1-10%) (n = 59)	Сильная степень инфильтрации (более 10%) Strong degree of infiltration (more than 10%) (n = 12)	Слабая-средняя степень ин- фильтрации опухоли Weak-medium degree of tumor infiltration p*	Слабая-сильная степень ин- фильтрации опухоли Weak-strong degree of tumor infiltration p*	Сильная-средняя степень ин- фильтрации опухоли Strong-medium degree of tumor infiltration p*
CD45 ⁺ TILs	0,4 (0,3-0,7)	2,7 (1,6-4,6)	15,6 (11,7-20,1)	0,000	0,000	0,000
CD45 ⁺ CD3 ⁺	89,6 (84,3-95,4)	89,4 (86,1-93,5)	87,5 (81,4-91,7)	0,883	0,317	0,212
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺	36,5 (26,1-47,4)	46,3 (39,0-55,7)	51,7 (44,0-58,1)	0,005	0,005	0,245
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	49,4 (36,4-62,3)	42,9 (33,8-52,4)	33,9 (30,6-42,8)	0,051	0,003	0,039
CD45 ⁺ CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	7,0 (3,1-12,5)	4,9 (1,6-11,8)	0,9 (0,4-6,0)	0,287	0,014	0,051
CD45 ⁺ HLA-DR	10,8 (3,4-13,8)	8,6 (2,1-16,3)	1,3 (0,8-11,2)	0,709	0,051	0,080
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	5,3 (2,4-9,4)	2,0 (0,9-3,9)	1,1 (0,4-1,7)	0,000	0,000	0,019
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	8,1 (3,8-13,9)	5,2 (2,9-8,9)	4,1 (1,8-6,8)	0,069	0,012	0,273
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	2,1 (1,1-6,4)	3,1 (0,8-6,6)	4,8 (3,3-8,1)	0,961	0,283	0,270
CD45 ⁺ CD16 ⁺ Perforin ⁺	8 (3,5-14,5)	3,7 (2,1-8,5)	2,4 (1,5-5,2)	0,012	0,004	0,173
Цитотоксический потенциал CD16 ⁺ клеток Cytotoxic potential of CD16 ⁺ cells	74,8 (50,8-94,1)	63,3 (39,7-80,9)	39,2 (28,7-53,1)	0,164	0,008	0,016
CD45 ⁺ CD8 ⁺ Perforin ⁺	6,6 (3,1-9,6)	4,1 (1,8-8,7)	3,2 (1,5-7,0)	0,139	0,092	0,387
Цитотоксический потенциал CD8 ⁺ клеток Cytotoxic potential of CD8 ⁺ cells	16,7 (10,2-50,8)	12,6 (4,6-19,0)	8,6 (3,4-26,6)	0,132	0,096	0,537
CD45 ⁺ CD4 ⁺ /CD45 ⁺ CD8 ⁺	0,7 (0,4-1,1)	1,0 (0,7-1,6)	1,4 (1,0-1,7)	0,004	0,002	0,096
CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺	3,4 (1,6-5,8)	4,0 (2,3-6,8)	6,4 (3,5-11,2)	0,296	0,021	0,058

Примечание. p* – значение достоверности различий непараметрических критериев по Манну–Уитни.

Note. p*, is the significance of the reliability of differences in nonparametric criteria according to Mann–Whitney.

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (N = 80) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ИНФИЛЬТРАЦИИ ОПУХОЛИ ЛИМФОЦИТАМИ

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER (N = 80) DEPENDING ON THE DEGREE OF TUMOR INFILTRATION BY LYMPHOCYTES

Показатель Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) % Indicator Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) %	Слабая степень инфильтрации (до 1%) Low degree of infiltration (up to 1%) (n = 53)	Средняя степень инфильтрации (1-10%) Average degree of infiltration (n = 26)	Сильная степень инфильтрации (более 10%) Strong degree of infiltration (more than 10%) (n = 1)	Слабая-сильная степень инфильтрации опухоли Weak-strong degree of tumor infiltration p*
CD45 ⁺ TILs	0,3 (0,1-0,8)	2,7 (1,5-4,8)	20,5	0,000
CD45 ⁺ CD3 ⁺	87,0 (83,0-90,8)	90,6 (82,5-93,8)	89,9	0,238
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺	45,9 (39,0-52,3)	43,2 (36,4-52,9)	33,7	0,441
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	40,5 (32,1-46,6)	43,1 (35,5-53,0)	62,2	0,104
CD45 ⁺ CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	11,4 (6,1-21,9)	17,7 (5,6-38,4)	21,6	0,266
CD45 ⁺ HLA-DR	15,7 (9,3-27,5)	21,2 (5,9-42,1)	24,5	0,372
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	6,0 (2,7-11,4)	3,2 (2,2-8,5)	4,8	0,052
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	8,1 (6,0-11,5)	9,4 (6,3-12,8)	12,1	0,507
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	3,1 (1,7-4,9)	2,5 (1,3-6,1)	3,3	0,694
CD45 ⁺ CD16 ⁺ Perforin ⁺	1,9 (1,3-4,2)	3,2 (1,2-4,3)	16,2	0,599
Цитотоксический потенциал CD16 ⁺ клеток Cytotoxic potential of CD16 ⁺ cells	25,0 (12,8-39,6)	30,0 (21,9-60,9)	29,4	0,363
CD45 ⁺ CD8 ⁺ Perforin ⁺	3,4 (1,6-11,2)	6,8 (1,3-11,9)	1,9	0,808
Цитотоксический потенциал CD8 ⁺ клеток Cytotoxic potential of CD8 ⁺ cells	10,4 (4,0-32,8)	14,3 (3,9-19,0)	55,9	0,746
CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{-low+}	4,1 (2,6-7,1)	5,8 (2,7-7,8)	10,38	0,434

Примечание. p* – значение достоверности различий непараметрических критериев по Манну–Уитни.

Note. p* is the significance of the reliability of differences in nonparametric criteria according to Mann–Whitney

Критическими характеристиками микро-окружения опухоли являются соотношение пула эффекторных и регуляторных клеток, субпопуляций Т-клеток, активированные и депо-наивных клеток, функциональная активность

эффекторных клеток [3]. Точное определение клеточного состава позволяет проводить много-параметровая проточная цитометрия. Интерес-ным оказалось сравнение иммунофенотипа TILs пациентов РМЖ в двух клинических группах с

учетом степени инфильтрации CD45⁺ клетками. Так, у первично-операбельных пациентов РМЖ (1-я группа) отмечалось достоверное увеличение пула CD45⁺CD3⁺CD4⁺ клеток по мере нарастания степени инфильтрации лимфоцитов, а CD45⁺CD3⁺CD8⁺ TILs, напротив, достоверно снижались, что сопровождалось достоверным увеличением иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8). Аналогично эффекторным CD8⁺ TILs, с увеличением степени инфильтрации опухоли лимфоцитами достоверно снижалось как количество NK-клеток, так и их функциональная активность. Следует отметить, что с увеличением степени инфильтрации лимфоцитами опухолевой ткани наблюдалось уменьшение функциональной активности пула CD45⁺CD3⁺CD8⁺ TILs. Вместе с тем, выявлено нарастание регуляторных/супрессорных лимфоцитов с фенотипом CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} параллельно с увеличением плотности лимфоцитов в микроокружении опухоли. На негативную роль регуляторных клеток для прогнозирования рака молочной железы также указывают многие исследователи [4, 7].

Таким образом, для больных первично-операбельным раком молочной железы оказалось характерным высокая функциональная активность и концентрация клеток эффекторного звена при низкой степени инфильтрации опухоли, а по мере

нарастания количества лимфоцитов в опухоли отмечалось увеличение пула CD45⁺CD3⁺CD4⁺ клеток и CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} одновременно со снижением количества и функциональной активности эффекторных TILs (табл. 1).

В группе больных местно-распространенным РМЖ не выявлено достоверных различий клеточного состава TILs в подгруппах со слабой и средней степенью инфильтрации, а вариант с инфильтрацией более 10% был зафиксирован только у одной пациентки (табл. 2). Отсутствие связи субпопуляционной структуры TILs в подгруппах с разной степенью инфильтрации опухоли свидетельствует о сходном характере локального иммунного ответа при местно-распространенном РМЖ.

Выводы

В отличие от больных местно-распространенным раком молочной железы, у пациенток первично-операбельным РМЖ прослеживается изменение типа локального иммунного ответа от эффекторного к регуляторному. Высокая степень инфильтрации опухоли характеризуется истощением функции клеток эффекторного звена. Многопараметровая характеристика субпопуляционной структуры TILs возможна только с применением многоцветной проточной цитометрии.

Список литературы / References

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 239 с. [The state of oncological care for the population of Russia in 2022. Edited by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova]. Moscow: P. Herzen Moscow State Medical Research Institute – branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” Ministry of Health of Russia, 2022. 239 p.
2. Blok E.J., Engels C.C., Dekker-Ensink G. Exploration of tumour-infiltrating lymphocytes as a predictive biomarker for adjuvant endocrine therapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2018, Vol. 171, pp. 65-74.
3. Goff S.L., Danforth D.N. The role of immune cells in breast tissue and immunotherapy for the treatment of breast cancer. *Clin. Breast Cancer*, 2021, Vol. 21, no. 1, pp. e63-e73.
4. Lan H.R., Du W.L., Liu Y., Mao C.S., Jin K.T., Yang X. Role of immune regulatory cells in breast cancer: Foe or friend? *Int. Immunopharmacol.*, 2021, Vol. 96, 107627. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107627.
5. Levy E.M., Roberti M.P., Mordoh J. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, Vol. 2011, 676198. doi: 10.1155/2011/676198.
6. Lundgren C., Bendahl P.O., Ekholm M. Tumour-infiltrating lymphocytes as a prognostic and tamoxifen predictive marker in premenopausal breast cancer: data from a randomised trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res.*, 2020, Vol. 22, 140. doi: 10.1186/s13058-020-01364-w.
7. Usman A.N., Ahmad M., Sinrang A.W., Natsir S., Takko A.B., Ariyandy A., Ilhamuddin I., Eragradini A.R., Hasan I.I., Hasyim S. Regulatory T cells on prognosis of breast cancer. *Breast Dis.*, 2023, Vol. 42, no. 1, pp. 213-218. doi: 10.3233/BD-239002.
8. Virassamy B., Caramia F., Savas P., Sant S., Wang J., Christo S.N., Byrne A., Clarke K., Brown E., Teo Z.L., von Scheidt B., Freestone D., Gandolfo L.C., Weber K., Teply-Szymanski J., Li R., Luen S.J., Denkert C., Loibl S.,

Lucas O., Swanton C., Speed T.P., Darcy P.K., Neeson P.J., Mackay L.K., Loi S. Intratumoral CD8(+) T cells with a tissue-resident memory phenotype mediate local immunity and immune checkpoint responses in breast cancer. *Cancer Cell*, 2023, Vol. 41, no. 3, pp. 585-601.

Авторы:

Заботина Т.Н. — д.б.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии и инновационных технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Борунова А.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Черткова А.И. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шоуа И.Б. — к.б.н., врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кадагидзе З.Г. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии и инновационных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Zabotina T.N., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Borunova A.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Chertkova A.I., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Shoua I.B., PhD (Biology), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Kadagidze Z.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology and Innovative Technologies, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

Поступила 01.04.2023
Отправлена на доработку 03.04.2023
Принята к печати 16.04.2024

Received 01.04.2023
Revision received 03.04.2023
Accepted 16.04.2024

УВЕЛИЧЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО IL-4 КАК ОТВЕТ НА ТЕРАПИЮ ВЕНЕТОКЛАКСОМ В КСЕНОГРАФТНЫХ МОДЕЛЯХ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

Богданова Д.А.^{1,3}, Шиндяпин В.В.¹, Колосова Е.Д.³, Пухальская Т.В.^{1,3},
Будкина Н.А.¹, Шатилова А.А.^{2,4}, Демидов О.Н.^{1,3}

¹ АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет
имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Резюме. Несмотря на значительный прогресс в фундаментальных и доклинических исследованиях острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), пятилетняя выживаемость пациентов с ОМЛ остается низкой, что подчеркивает острую необходимость в поиске новых комбинированных методах лечения. За последнее десятилетие повышенное внимание было сосредоточено на выявлении подходящих иммуно-терапевтических стратегий для борьбы с ОМЛ и, в частности, на воздействии на лейкозные клетки и их предшественники с помощью цитокинов. Также одним из уже зарекомендовавших себя подходов для лечения ОМЛ является таргетная терапия. Однако в связи с увеличением вариантов лечения возникает несколько проблем, связанных с пониманием, как подобрать наиболее эффективную терапию и как комбинировать различные лекарственные средства. Венетоклакс — таргетный препарат, мощный и высокоселективный ингибитор белка В-клеточной лимфомы-2 (BCL-2), который является одним из основных анти-апоптотических белков клетки. Венетоклакс стал важным и широко используемым препаратом для лечения ОМЛ. Ингибирование BCL-2 в клетках ОМЛ приводит к сдвигу клеточного ответа в сторону гибели по механизму апоптоза. Исследование подходов для улучшения терапии ОМЛ все еще является сложной задачей в связи с ограниченностью экспериментальных моделей. Несмотря на улучшение протоколов *ex vivo* культивирования, *in vivo* модели остаются единственным способом изучения гетерогенного по своей природе ОМЛ и влияния микроокружения на развитие лейкоза.

Адрес для переписки:

Богданова Дарья Алексеевна
АНОО ВО «Научно-технологический университет
«Сириус»»
354340, Россия, Краснодарский край, Федеральная
территория «Сириус», Олимпийский пр., 1.
Тел.: 8 (952) 273-34-87.
E-mail: dasha351rus@gmail.com

Address for correspondence:

Daria A. Bogdanova
Sirius University of Science and Technology
1 Olympic Ave
Federal Territory Sirius
Krasnodar Region
354340 Russian Federation
Phone: + 7 (952) 273-34-87.
E-mail: dasha351rus@gmail.com

Образец цитирования:

Д.А. Богданова, В.В. Шиндяпин, Е.Д. Колосова,
Т.В. Пухальская, Н.А. Будкина, А.А. Шатилова,
О.Н. Демидов «Увеличение сывороточного IL-4 как
ответ на терапию венетоклаксом в ксенографтных
моделях острого миелоидного лейкоза» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 4. С. 827-834.
doi: 10.15789/1563-0625-IIS-16926

© Богданова Д.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.A. Bogdanova, V.V. Shindyapin, E.D. Kolosova,
T.V. Pukhalskaya, N.A. Budkina, A.A. Shatilova,
O.N. Demidov "Increase in serum IL-4 in response to
venetoclax therapy in xenograft models of acute myeloid
leukaemia", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4, pp. 827-834.
doi: 10.15789/1563-0625-IIS-16926

© Bogdanova D.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IIS-16926

В своем исследовании мы показываем, что в ксенографтной мышинной модели острого миелоидного лейкоза в мышцах линии NSG-SGM3 происходит увеличение сывороточного IL-4 в ответ на терапию венетоклаксом. Ранее было показано, что IL-4 может вызывать апоптоз клеток ОМЛ. Эти данные открывают новые перспективы в использовании стратегий, основанных на синергизме венетоклакса и IL-4 при запуске апоптоза. Данные также показывают увеличение уровня сывороточного человеческого MCP-1 при приживлении лейкозных клеток OCI-AML-2 в сыворотке мышей с ксенографтами, который снижается после терапии венетоклаксом, что может служить прогностическим маркером успешности проводимой терапии. Очевидным преимуществом ксенографтных моделей на мышах стала возможность отделить экспрессию и секрецию мышинных цитокинов и хемокинов, определяющих реакцию микроокружения, от цитокинового профиля самих человеческих опухолевых клеток. В целом, полученные нами данные свидетельствуют о дополнительных функциональных особенностях действия венетоклакса на опухолевые клетки посредством регуляции цитокиновой секреции и перспективности использования линии иммунодефицитных мышей линии NSG-SGM3 для тестирования новых подходов лечения ОМЛ.

Ключевые слова: ксенографтная модель, острый миелоидный лейкоз, мыши линии NSG-SGM3, венетоклак, IL-4, апоптоз

INCREASE IN SERUM IL-4 IN RESPONSE TO VENETOCLAX THERAPY IN XENOGRAFT MODELS OF ACUTE MYELOID LEUKAEMIA

Bogdanova D.A.^{a, c}, Shindyapin V.V.^a, Kolosova E.D.^c,
Pukhalskaya T.V.^{a, c}, Budkina N.A.^a, Shatilova A.A.^{b, d}, Demidov O.N.^{a, c}

^a Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russian Federation

^b Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

^c Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

^d Institute of Medicine and Life Sciences, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. Despite significant progress in basic and preclinical research into acute myeloid leukaemia (AML), the five-year survival rate for patients with AML remains poor, highlighting the urgent need for new combination therapies. Over the past decade, increased attention has been focused on identifying suitable immunotherapeutic strategies to combat AML, in particular targeting leukaemia cells and their precursors with cytokines. Targeted therapy is also an established approach for the treatment of AML. However, with the increasing number of treatment options, there are challenges in understanding how to select the most effective therapy and how to combine different drugs. Venetoclax is a targeted agent, a potent and highly selective inhibitor of B cell lymphoma protein-2 (BCL-2), one of the cell's major anti-apoptotic proteins. Research into approaches to improve the treatment of AML remains challenging due to the limitations of experimental models. Despite improvements in *ex vivo* culture protocols, *in vivo* models remain the only way to study the inherently heterogeneous nature of AML and the influence of the microenvironment on leukaemia development. In our study, we show that in a xenograft mouse model of acute myeloid leukaemia in mice of the NSG-SGM3 line, there is an increase in serum IL-4 in response to venetoclax therapy. IL-4 has previously been shown to induce apoptosis in AML cells. These data provide new perspectives for the use of strategies based on the synergism of venetoclax and IL-4 in inducing apoptosis. The data also show an increase in serum human MCP-1 levels upon engraftment of OCI-AML-2 leukaemia cells in the serum of xenografted mice, which decreases after venetoclax therapy and may serve as a prognostic marker for the success of ongoing therapy. An obvious advantage of xenograft models in mice was the ability to separate the expression and secretion of murine cytokines and chemokines that determine the microenvironmental response from the cytokine profile of the human tumor cells themselves. Overall, our data suggest additional functional features of venetoclax action on tumor cells through the regulation of cytokine secretion and the prospect of using the immunodeficient mouse line NSG-SGM3 to test new approaches to the treatment of AML.

Keywords: xenograft model, acute myeloid leukaemia, NSG-SGM3 mice, venetoclax, IL-4, apoptosis

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ 19-75-20128).

Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — наиболее распространенный острый лейкоз у взрослых. Считается, что ОМЛ возникает в результате соматически приобретенных мутаций, что является довольно распространенным процессом во время старения человека [2]. Однако ОМЛ может возникнуть как *de novo*, так и вторично по отношению к другим процессам, включая предшествующие гематологические нарушения или воздействие иммуносупрессивной или цитотоксической терапии. Поиск новых препаратов против ОМЛ является актуальной задачей, однако не менее важным вопросом является поиск терапевтических подходов с использованием комбинаций уже применяемых препаратов, а также более глубокое понимание фундаментальных механизмов действующих веществ. С 2017 года произошло быстрое расширение арсенала лекарственных средств против этого заболевания, появились такие препараты, как олутасидениб, эназидениб, венетоклакс и др. [5]. Однако с увеличением вариантов лечения возникают вопросы: как подобрать наиболее эффективную терапию и как комбинировать лекарственные средства для профилактики рецидивов. Венетоклакс стал важным и широко используемым препаратом первой линии для лечения ОМЛ. Ингибирование BCL-2 в клетках ОМЛ с помощью венетоклакса приводит к сдвигу клеточного ответа в сторону апоптоза. Несмотря на значительное улучшение показателей ответа по сравнению с монотерапией азациитидином, почти 30-40% пациентов с ОМЛ изначально невосприимчивы к лечению венетоклаксом (первичная резистентность). У другой части пациентов, несмотря на продолжительную ремиссию после прекращения терапии, может возникать рецидив ОМЛ, устойчивый к венетоклаксу (приобретенная резистентность) [5]. Поскольку венетоклакс — новый препарат, используемый часто в терапии пациентов с ОМЛ независимо от возраста, клинико-патогенетических характеристик заболевания и выбранной схемы лечения, важно исследовать механизмы резистентности к терапии на основе венетоклакса.

С уточнением знаний о том, как клетки ОМЛ ведут себя в организме, происходит разработка новых иммунотерапевтических стратегий лечения, таких как терапия с помощью лимфоцитов, несущих химерные антигенные рецепторы Т-клеток (от англ. *chimeric antigen receptor*, CAR-T), би-специфические активаторы Т-клеток (BiTE) и ингибиторы контрольных то-

чек [14]. Более того, стало очевидно, что развитие и прогрессирование ОМЛ связано с нарушением регуляции иммунных реакций. В частности, недавние исследования показали, как лейкозные клетки манипулируют и изменяют микроокружение опухоли, создавая уникальную нишу, которая напрямую способствует их выживанию, а также устойчивости к лекарствам. Сами клетки ОМЛ человека секретируют широкий спектр цитокинов/хемокинов, участвующих в пролиферации blastов, хемотаксисе иммунокомпетентных клеток и способствующие прогрессированию заболевания [12]. Так, клетки ОМЛ способны секретировать иммуноингибирующие факторы, такие как IL-10, IL-35, трансформирующий ростовой фактор β (TGF- β), которые делают микроокружение более иммуносупрессивным и способствуют ускользанию опухолевых клеток от иммунного надзора [4]. Сообщалось также, что большинство клеток ОМЛ, экспрессируют TNF и IL-1 β , как факторы, способствующие росту и выживанию. Кроме того, двойное ингибирование TNF и IL-1 β синергично с эффектом лечения ингибитором NF- κ B оказывает противолейкемический эффект на мышинных моделях *in vivo* [8]. Интересно отметить, что IL-4 является негативным регулятором клеток ОМЛ. IL-4 индуцировал апоптоз клеток ОМЛ STAT6-зависимым образом, тем самым раскрывая ранее неизвестную роль IL-4, как ингибитора роста и выживания клеток ОМЛ [13]. Дополнительное использование стратегий, направленных на систему иммунного контроля ОМЛ, представляется перспективным подходом для увеличения показателей выживаемости пациентов, которые зачастую в силу своего возраста плохо переносят классическую химиотерапию, имеющую множество негативных побочных эффектов.

Основной сложностью при работе с ОМЛ является ограниченное число экспериментальных моделей. Так, на сегодняшний день, несмотря на улучшение систем культивирования клеток *ex vivo*, значительный рост первичных клеток ОМЛ при сохранении их наивных свойств в течение длительного периода остается сложной задачей [7]. Кроме того, значительная гетерогенность клеток от пациента к пациенту и вовлеченность микроокружения опухолевых клеток усложняют изучение общих механизмов, контролирующих биологию ОМЛ *ex vivo* и *in vitro*. Таким образом, комплексная функциональная характеристика многих патогенных явлений может быть решена только с использованием *in vivo* моделей на животных, в частности на генетически модифицированных линиях мышей. Мыши линии NSG-SGM3 являются золотым стандартом для создания ксенографтных моделей ОМЛ, так как

экспрессируют человеческие цитокины интерлейкин-3 (IL-3), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор стволовых клеток (KITLG) [3], которые поддерживают приживание и рост миелоидных клеток.

В нашей работе мы исследовали цитокиновый ответ в ксенографтных моделях ОМЛ в мышцах линии NSG-SGM3 при лечении венетоклаксом.

Материалы и методы

Мыши

Мышей линии NSG-SGM3 в возрасте 6-9 недель содержали на базе Автономного экспериментально-биологического комплекса для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1660). Все манипуляции с животными были выполнены в соответствии протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике ИМБ РАН (Протокол № 4 от 04.03.2024).

Трансплантация клеток OCI-AML-2 иммунодефицитным мышам NSG-SGM3

Для эксперимента использовали мышей в возрасте 6-9 недель. Клетки линии OCI-AML-2 вводили по 1×10^6 клеток в среде RPMI в объеме 100 мкл в латеральную хвостовую вену мышам NSG-SGM3. Приживание по данному протоколу происходит в 100% случаев, как описано нами ранее [1]. Были сформированы 2 группы мышей, контрольные, получающие инъекции 7% раствором DMSO (NT), и получающие лечение венетоклаксом 75 мг/кг (Venetoclax), по 5-6 животных в каждой. Инъекции проводились интраперитонеально через день, начиная с 8-го дня после введения OCI-AML-2 и заканчивая 18-м днем эксперимента. Для анализа цитокинов, также производился забор крови для сыворотки у группы из 5 интактных мышей линии NSG-SGM3.

Измерение продукции цитокинов

Анализ продукции цитокинов в сыворотке крови мышей проводили с использованием мультиплексной технологии Luminex xMAP и набора MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel в соответствии со стандартным протоколом производителя (Merck).

Измерение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени (qRT-PCR)

Тотальную РНК выделяли из крови и костного мозга мышей с помощью реагента ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Москва, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Одноцепочечную комплементарную ДНК (кДНК) получали пу-

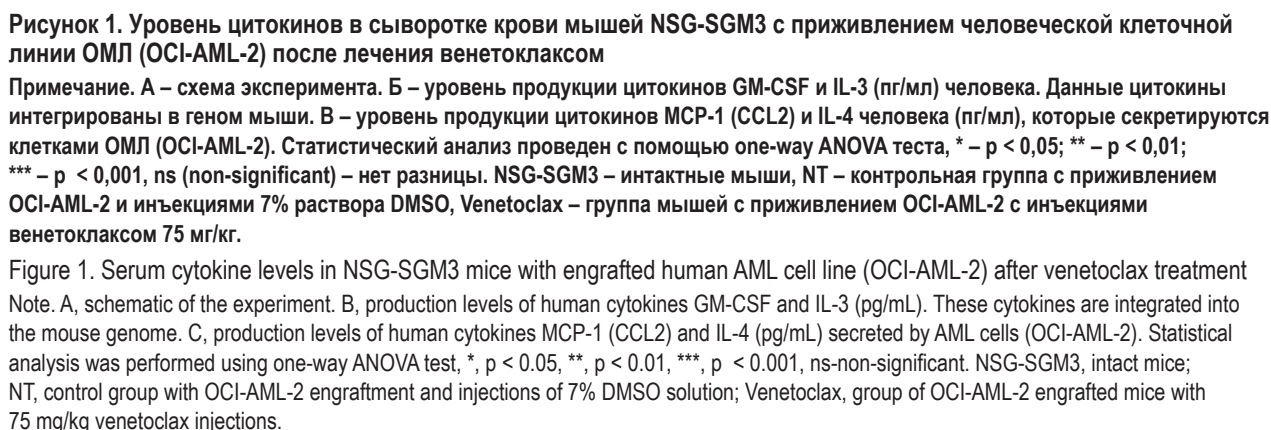
тем обратной транскрипции 500 нг РНК с помощью набора для RT-PCR MINT (ЗАО «Евроген», Москва, Россия). qRT-PCR проводили с использованием SYBR Green (5X qPCRmix-HS SYBR+LowROX, ЗАО «Евроген», Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Данные нормировали на экспрессию Gapdh. Режим амплификации был одинаков для всех праймеров: 95 °C 5 мин, 40X (95 °C 15 сек, 60 °C 60 сек). Каждый образец анализировали в трех экземплярах. Экспрессию генов анализировали методом 2-ΔΔCt. Последовательности праймеров для гена *Cxcl2* (Прямой: CTCAAGGGCGGTCAAAAAGT, Обратный: TTTTCTTTCTCTTTGGTTCTTCC) для гена *Gapdh* (Прямой: CATCACTGCCACCCAGAAGACTG, Обратный: ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG).

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 6 при помощи теста one-way ANOVA. Различия считали достоверными при * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, ns (non-significant) — нет разницы.

Результаты и обсуждение

Схема эксперимента представлена на рисунке 1А, мышам вводили 1×10^6 клеток OCI-AML-2 в хвостовую вену, после чего через неделю начинали курс лечения: контрольной группе (NT) вводили 7% раствор DMSO, а группе венетоклакс (Venetoclax), препарат в концентрации 75 мг/кг в течении 10 дней, с инъекцией интраперитонеально через день. На 19-й день мыши были выведены из эксперимента с забором сыворотки, цельной крови и костного мозга. Сыворотка была проанализирована с помощью мультиплексного анализа на цитокины. Было показано, что после приживания опухолевой линии ОМЛ человека и лечения венетоклаксом уровень секреции GM-CSF и IL-3 человека мышью NSG-SGM3 не изменялся (рис. 1Б). Это является важным фактором, так как эти цитокины необходимы для приживания и поддержания пролиферации клеток ОМЛ в организме мыши. При этом, как показал анализ, сами опухолевые клетки OCI-AML-2, после приживания в мыши, начинали секретировать человеческий MCP-1 (CCL2). У контрольных мышей уровень этого цитокина в крови не определялся (рис. 1В). MCP-1 (CCL2) — цитокин, инициирующий хемотаксис и трансэндотелиальную миграцию моноцитов [11]. Интересно, что экспрессия и продукция MCP-1 обнаруживаются на высоком уровне в клетках ОМЛ [11]. Следовательно, по его уровню можно судить об успешном приживлении клеток ОМЛ в мыши, при этом после лечения венетоклаксом происходит достоверное



снижение его уровня в сыворотке. Возможно, уровень сывороточного MCP-1 может являться прогностическим маркером успешности лечения и облегчения опухолевого бремени в ксенографтных моделях ОМЛ в мышах NSG-SGM3. Однако наиболее интересным фактом является то, что в ответ на венетоклакс опухолевые клетки ОМЛ начинают секретировать высокие уровни IL-4. IL-4 в основном известен как противовоспалительный цитокин, который регулирует моноциты/макрофаги и подавляет секрецию провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 и TNF [13]. Хотя было описано, что IL-4 оказывает, как положительное, так и отрицательное воздействие на раковые клетки [10], механистическая основа отрицательного воздействия увеличения IL-4 остается неясной. В случае ОМЛ было показано, что IL-4 индуцирует опосредованный каспазой-3 апоптоз клеток ОМЛ, что согласуется с ранее описанной ролью IL-4 в индукции апоптоза моноцитов [7]. Стоит отметить, что, так как венетоклакс является таргетным препаратом, увеличивающим чувствительность к апоптозу, секреция

IL-4 при этом может создавать дополнительную петлю положительной обратной связи, которая будет увеличивать процент клеток, входящих в апоптоз [13]. Peña-Martínez P. и соавт. впервые продемонстрировали, что IL-4 является негативным регулятором клеток ОМЛ и одним из первых цитокинов, которые идентифицированы в этой роли. Авторы предложили его как один из подходов при лечении ОМЛ [13].

Еще одним важным и перспективным подходом для лечения ОМЛ является воздействие на микроокружение опухоли, а именно нишу костного мозга. Ксенографтные модели мышей обладают важным преимуществом, в мышах NSG-SGM3 можно отделить экспрессию и секрецию мышечных цитокинов и хемокинов, определяющих реакцию микроокружения, от цитокинового профиля приживляемых человеческих опухолевых клеток. Так была обнаружена тенденция к увеличению экспрессии мышечного *Cxcl2* в крови и костном мозге ксенографтных моделей ОМЛ в мышах линии NSG-SGM3 (рис. 2). В предыдущих исследованиях показано, что экс-

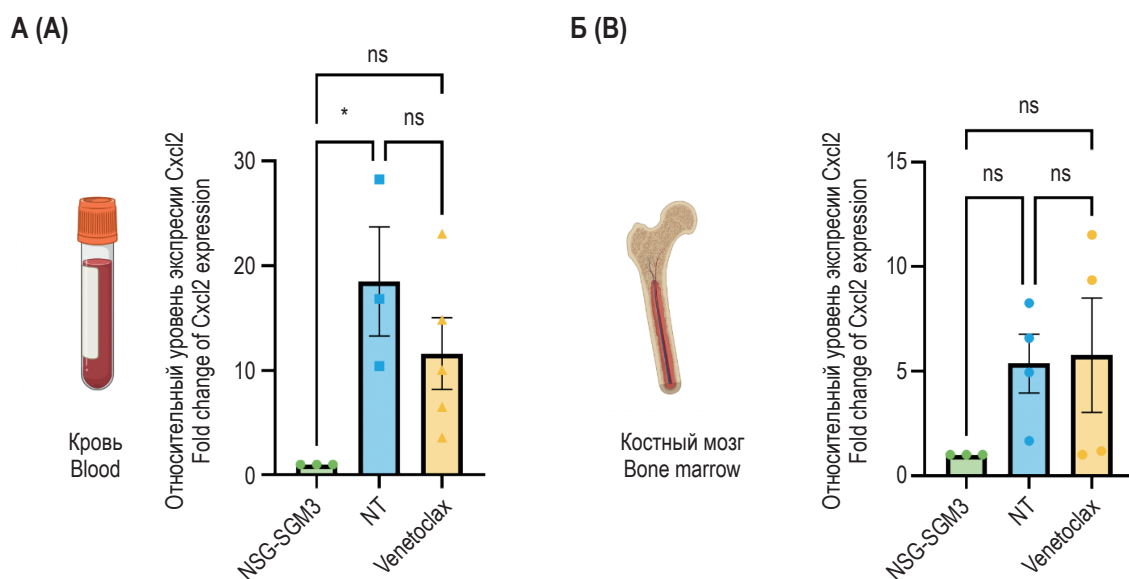


Рисунок 2. Экспрессия *Cxcl2* мыши в крови и костном мозге NSG-SGM3 с приживлением человеческой клеточной линии ОМЛ (OCI-AML-2) после лечения венетоклаксом

Примечание. Относительный уровень экспрессии *Cxcl2* А – в крови, Б – костном мозге ксенографтных моделей мышей NSG-SGM3 с приживлением человеческой OCI-AML-2 после лечения венетоклаксом. Статистический анализ проведен с помощью one-way ANOVA теста, * – $p < 0,05$, ns – нет разницы. NSG-SGM3 – интактные мыши, NT – контрольная группа с приживлением OCI-AML-2 с инъекциями 7% раствора DMSO, Venetoclax – группа мышей с приживлением OCI-AML2, пролеченная венетоклаксом 75 мг/кг в течение 10 дней.

Figure 2. Expression of mouse *Cxcl2* in blood and bone marrow of NSG-SGM3 xenografted human AML cell line (OCI-AML-2) after venetoclax treatment

Note. Relative expression level of *Cxcl2* A, in blood; B, in bone marrow of NSG-SGM3 xenografted mouse models transplanted with human OCI-AML-2 after venetoclax treatment. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test, *, $p < 0.05$, ns-non-significant.. NSG-SGM3, intact mice; NT, control group of mice engrafted with OCI-AML-2 by injection of 7% DMSO solution; Venetoclax, group of mice engrafted with OCI-AML2 treated with venetoclax 75 mg/kg for 10 days.

прессия и секреция Cxcl2 у мыши в мезенхимальных стволовых клетках (МСК) значительно повышаются в гипоксическом микроокружении ОМЛ. В качестве «коммуникатора» CXCL2 может рекрутировать МСК в окружение опухолевых клеток, тем самым защищая клетки ОМЛ и поддерживая их устойчивость к терапии [9]. Прогностическая ценность CXCL2 при различных видах рака, включая гематологические злокачественные новообразования и лейкемию, была подтверждена различными исследованиями [6].

Заключение

Наша работа подтвердила преимущества использования NSG-SGM3 мышей для моделирования ОМЛ человека. Интересно, что помимо прямого действия венетоклакса на митохондриальный апоптоз, терапия венетоклаксом вызывает увеличение секреции IL-4, способного потенцировать гибель клеток ОМЛ. Дополнительное введение IL-4 может в значительной степени сместить клеточный ответ ОМЛ в сторону апоптоза и увеличить эффективность терапии.

Дальнейшее изучение ОМЛ *in vivo* поможет определить важные мишени, в том числе и цитокины, воздействуя на которые можно увеличить эффективность противоопухолевой терапии.

Благодарности

Работа Богдановой Д.А., Будкиной Н.А., Пухальской Т.В. частично финансировалась Министерством науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-10-2021-093; Проект НИР-ИМБ-2102). Мыши содержались в виварии Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН. Также выражаем благодарность магистру Научно-технологического университета «Сириус» Литвиновой А.А. и сотрудникам лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН Друцкой М.С., Губернаторовой Е.О., Сысоеву Ф.А., за помощь в проведении экспериментов.

Список литературы / References

1. Байдюк Е.В., Белоцерковская Е.В., Гиршова Л.Л., Голотин В.А., Левчук К.А., Васютина М.Л., Портная Я.А., Щелина Е.В., Бреднева О.Г., Петухов А.В., Зарицкий А.Ю., Демидов О.Н. Создание ксенографтных моделей от больных острыми миелоидными лейкозами с использованием иммунодефицитных мышей линии NSG-SGM3 // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика, 2021. Т. 14, № 4. С. 414-425. [Baidyuk E.V., Belotserkovskaya E.V., Girshova L.L., Golotin V.A., Levchuk K.A., Vasyutina M.L., Portnaya Y.A., Schelina E.V., Bredneva O.G., Petukhov A.V., Zaritsky A.Yu., Demidov O.N. «Construction of xenography models from survivors of acute mieloid leacoses with the use of immunodeficient muses of the NSG-SGM3 line. *Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika* = *Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice*, 2021, Vol. 14, no. 4, pp. 414-425. (In Russ.)]
2. Belotserkovskaya E., Golotin V., Uyanik B., Demidov O.N. Clonal haematopoiesis – a novel entity that modifies pathological processes in elderly. *Cell Death Discov.*, 2023, Vol. 19, no. 9 (1), 345. doi: 10.1038/s41420-023-01590-z.
3. Billerbeck E., Barry W.T., Mu K., Dorner M., Rice C.M., Ploss A. Development of human CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2Rγ(null) humanized mice. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 11, pp.3076-3086.
4. Cools N., van Tendeloo V.F.I., Smits E.L.J.M., Lenjou M., Nijs G., van Bockstaele D.R., Berneman Z.N., Ponsaerts P. Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-β/IL-10 double-positive CD4⁺ regulatory T cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 2008, Vol. 12, pp. 690-700.
5. Dhakal P., Bates M., Tomasson M.H., Sutamtewagul G., Dupuy A., Bhatt V.R. Acute myeloid leukemia resistant to venetoclax-based therapy: What does the future hold? *Blood Rev.*, 2023, Vol. 59, no. 10, 1036. doi: 10.1016/j.blre.2022.101036.
6. Hao X., Gu M., Sun J., Cong L. A-kinase interacting protein 1 might serve as a novel biomarker for worse prognosis through the interaction of chemokine (C-X-C motif) ligand 1/chemokine (C-X-C motif) ligand 2 in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2020, Vol. 34, 230520. doi: 10.1002/jcla.23052.
7. Ito S., Barrett A.J., Dutra A., Pak E., Miner S., Keyvanfar K., Hensel N.F., Rezvani K., Muranski P., Liu P., Larochelle A., Melenhorst J.J. Long term maintenance of myeloid leukemic stem cells cultured with unrelated human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res.*, 2015, Vol. 14, pp. 95-104.
8. Li J., Volk A., Zhang J., Cannova J., Dai S., Hao C., Hu C., Sun J., Xu Y., Wei W., Breslin P., Nand S., Chen J., Kini A., Zhu J., Zhang J. Sensitizing leukemia stem cells to NF-kappaB inhibitor treatment *in vivo* by inactivation of both TNF and IL-1 signaling. *Oncotarget*, 2017, Vol. 31, no. 8 (5), pp 8420-8435.

9. Li L., Zhao L., Man J., Liu B. CXCL2 benefits acute myeloid leukemia cells in hypoxia. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2021, Vol. 43, no. 5, pp. 1085-1092.
10. Li Z., Chen L., Qin Z. Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 6, pp. 415-422.
11. Macanas-Pirard P., Quezada T., Navarrete L., Broekhuizen R., Leisewitz A., Nervi B., Ramírez P.A. The CCL2/CCR2 axis affects transmigration and proliferation but not resistance to chemotherapy of acute myeloid leukemia cells. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 1, e0168888. doi: 10.1371/journal.pone.0168888.
12. Mirantes C., Passegue E., Pietras E.M. Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Exp. Cell Res.*, 2014, Vol. 329, pp. 248-254.
13. Peña-Martínez P., Eriksson M., Ramakrishnan R., Chapellier M., Högborg C., Orsmark-Pietras C., Richter J., Andersson A., Fioretos T., Järås M. Interleukin 4 induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells in a Stat6-dependent manner. *Leukemia*, 2018, Vol. 32, no. 3, pp. 588-596.
14. Tettamanti S., Pievani A., Biondi A., Dotti G., Serafini M. Catch me if you can: how AML and its niche escape immunotherapy. *Leukemia*, 2022, Vol. 36, no. 1, pp 13-22.

Авторы:

Богданова Д.А. — аспирант, младший научный сотрудник, направление «Иммунобиология и биомедицина», АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус; младший научный сотрудник, Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Шиндяпин В.В. — аспирант, младший научный сотрудник, направление «Иммунобиология и биомедицина», АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

Колосова Е.Д. — лаборант-исследователь, Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Пухальская Т.В. — лаборант-исследователь, Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург; магистр АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

Будкина Н.А. — магистр АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

Шатилова А.А. — младший научный сотрудник НИО иммуноонкологии НИЦ персонализированной онкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины» ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург; младший научный сотрудник ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Демидов О.Н. — д.м.н., профессор, АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия, в.н.с., Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Bogdanova D.A., Postgraduate Student, Junior Research Associate, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius; Junior Research Associate, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Shindyapin V.V., Postgraduate Student, Junior Research Associate, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russian Federation

Kolosova E.D., Senior Laboratory Assistant, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Pukhalskaya T. V., Senior Laboratory Assistant, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg; Master Student, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russian Federation

Budkina N. A., Master Student, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russian Federation

Shatilova A.A., Junior Research Associate, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg; Junior Research Associate, Institute of Medicine and Life Sciences, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Demidov O.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius; Senior Research Associate, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 04.04.2024
Принята к печати 10.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 04.04.2024
Accepted 10.04.2024

РАЗЛИЧИЯ ЦИТОКИНОВОГО СОСТАВА СЫВОРОТКИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ МУТАЦИИ В ГЕНЕ RAS И ОТВЕТА НА ЛЕЧЕНИЕ ТАРГЕТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ АНТИТЕЛ

Златник Е.Ю., Сагакянц А.Б., Владимирова Л.Ю., Тишина А.В.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Цитокины и хемокины играют двойственную — про- и антионкогенную — роль в опухолевой прогрессии. Таргетные препараты моноклональных антител — анти-VEGF-A (бевацизумаб) и анти-EGFR (цетуксимаб, панитумумаб) широко применяются в лечении метастатического колоректального рака (мКРР) и назначаются в зависимости от наличия или отсутствия, соответственно, мутаций в гене RAS.

Цель работы — оценка гетерогенности мКРР в зависимости от наличия или отсутствия мутации в гене RAS по цитокиновому составу сыворотки и изучение его связи с ответом на лечение таргетными препаратами на основе моноклональных антител.

В сыворотках 50 больных мКРР, 25 из которых имели мутацию в гене RAS (KRAS) и получали анти-VEGF-терапию, а остальные 25 — анти-EGFR-препараты, до начала лечения и через 4 курса после него определяли 20 цитокинов методом мультиплексного анализа. Результаты анализировали отдельно у больных с полным, частичным ответом на лечение и с прогрессированием заболевания.

Результаты показали, что до лечения у больных с KRAS-мутацией уровни GM-CSF, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13 превышали показатели больных без этой мутации, а содержание IL-8, IP-10, MIG, MIP-1 α было, напротив, ниже. У больных с полным эффектом от анти-EGFR-терапии отмечено повышение уровней IL-15 и MIG, а содержание GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, MCP-1 снижалось, некоторых из них — многократно. Напротив, прогрессирование отмечено у больных с наиболее низкими исходными уровнями большинства исследованных цитокинов, которые после лечения резко возрастали. У больных, получавших анти-VEGF-терапию прогрессирование сопровождалось снижением всех исследованных цитокинов/хемокинов, а полный ответ — снижением уровней IL-6, IL-5 и IL-10 (двух последних до нулевых значений) при возрастании содержания MIG.

Адрес для переписки:

Златник Елена Юрьевна
ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии»
344019, Россия, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63.
Тел.: 8 (961) 272-69-68.
E-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Address for correspondence:

Elena Yu. Zlatnik
National Medical Research Centre for Oncology;
63 14th Liniya
Rostov-on-Don
344019 Russian Federation
Phone: +7 (961) 272-69-68.
E-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Ю. Златник, А.Б. Сагакянц, Л.Ю. Владимирова,
А.В. Тишина «Различия цитокинового состава
сыворотки больных колоректальным раком
в зависимости от наличия мутации в гене RAS
и ответа на лечение таргетными препаратами
антител» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 4. С. 835-842.
doi: 10.15789/1563-0625-DIS-16903

© Златник Е.Ю. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.Yu. Zlatnik, A.B. Sagakyants, L.Yu. Vladimirova,
A.V. Tishina "Difference in serum cytokines between metastatic
colorectal cancer patients with mutant and wild type RAS in
response to targeted treatment with monoclonal antibodies",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 4, pp. 835-842.
doi: 10.15789/1563-0625-DIS-16903

© Zlatnik E.Yu. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DIS-16903

Итак, уровни сывороточных цитокинов у больных мКРР различны при наличии или отсутствии мутации в гене KRAS; разный ответ на таргетные препараты на основе моноклональных антител отражается на динамике цитокинового состава сыворотки. Превалирование многих цитокинов с проонкогенными и проангиогенными свойствами у больных мКРР с мутацией в гене KRAS можно рассматривать как в числе свойств, определяющих неблагоприятный прогноз при наличии этой мутации.

Ключевые слова: цитокины, хемокины, мультиплексный анализ, колоректальный рак, KRAS-мутация, лечение препаратами моноклональных антител

DIFFERENCE IN SERUM CYTOKINES BETWEEN METASTATIC COLORECTAL CANCER PATIENTS WITH MUTANT AND WILD TYPE RAS IN RESPONSE TO TARGETED TREATMENT WITH MONOCLONAL ANTIBODIES

Zlatnik E.Yu., Sagakyants A.B., Vladimirova L.Yu., Tishina A.V.

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Cytokines and chemokines play dual — pro- and antioncogenic — roles in tumor progression. Targeted medications of monoclonal antibodies, anti-VEGF (bevacizumab) and anti-EGFR (cetuximab, panitumumab), are widely used in treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) and are prescribed in dependence upon presence or absence of mutations in the RAS gene. The aim of the study was to assess mCRC heterogeneity in the dependence upon presence or absence of mutation in RAS gene according to serum cytokine composition and its dynamics in the response to antitumor therapy using targeted medications of monoclonal antibodies. Levels of 20 cytokines were estimated by Multiplex analysis in serum of 50 patients with mCRC (25 KRAS⁺ and 25 KRAS⁻, who received anti-VEGF therapy, bevacizumab and anti EGFR therapy, cetuximab/panitumumab respectively) before and after 4 courses of treatment. The results were analyzed separately in patients with complete, partial response and progression of the disease. The results showed that before the treatment in KRAS⁺ patients the levels of GM-CSF, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, and IL-13 exceeded the ones in KRAS⁻ patients; on the contrary, they had lower amounts of IL-8, IP-10, MIG, and MIP-1 α . In patients who received anti-EGFR therapy and developed complete response, the increase of IL-15 and MIG along with a 2 to 3-fold decrease in GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, and MCP-1 was noted. Progression of the disease was observed in patients with initially low levels of the vast majority of the studied cytokines with dramatically elevation after non-effective anti-EGFR treatment. In patients having received anti-VEGF therapy, progression was followed by decrease in all of the studied cytokine and chemokine levels, while complete response resulted in decreases in IL-6, IL-5 and IL-10 (the last ones up to 0) and the increase of MIG. Thus, serum levels of cytokines in patients with mCRC were shown to be different in dependence of KRAS mutation; different response to targeted monoclonal antibodies may be reflected by the dynamics of serum cytokines' composition. Prevailing of many prooncogenic and proangiogenic cytokines in KRAS⁺ mCRC patients may be considered in terms of their unfavorable prognosis.

Keywords: cytokines, chemokines, multiplex analysis, colorectal cancer, KRAS mutation, monoclonal antibodies for treatment

Введение

В настоящее время широко исследуется роль цитокинов в иммуноонкологии. Показано их двойственное значение: с одной стороны — противоопухолевое как медиаторов иммунного ответа, с другой — проонкогенное как индукторов провоспалительного микроокружения опухоли и участников ее «иммуноредактирования», спо-

собствующего ее прогрессированию. Описаны их системные и локальные уровни при различных злокачественных опухолях, дана оценка многим из них в качестве факторов прогноза, средств для иммунотерапии, мишеней для противоопухолевого лечения [3, 9].

Цитокины сыворотки, маркирующие системное воспаление [12], показали прогностическую значимость неудовлетворительного ответа боль-

ных колоректальным раком (КРР) II-IV стадий на схемы химиотерапии, содержащие 5-фторурацил, что отмечено для высоких уровней IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10 и IL-13 [1, 6]. Системное воспаление, ассоциированное со снижением общей и бессобытийной выживаемости больных при лечении КРР схемами, содержащими 5-ФУ, сопровождается повышением уровней IL-6, IL-10, TNF α [4]. Одним из клинически применяемых препаратов для антицитокиновой терапии является бевацизумаб (моноклональное антитело к VEGF-A), использование которого в курсе химиотерапии позволяет улучшить результаты лечения мКРР [11]. В этом контексте представляется важным противовоспалительное и проангиогенное действие ряда интерлейкинов (IL-1 β , IL-6, IL-8), а также TNF α , которые функционируют как агонисты VEGF-A. Ряд работ показывает, что высокий уровень TGF- β , IL-1 и снижение MIF связаны с резистентностью опухолей к анти-VEGF-препаратам, однако отмечена недостаточная изученность вопроса о взаимосвязи этих и других цитокинов с ответом на антиангиогенную терапию КРР [14].

КРР характеризуется гетерогенностью в зависимости от наличия/отсутствия мутаций, из которых наиболее часто встречаются мутации в гене RAS [2].

Эпидермальный фактор роста (EGFR) был одной из первых мишеней для лечения метастатического КРР (мКРР), однако только 15% больных чувствительны к его ингибиторам — цетуксимабу и панитумумабу. Генетические и эпигенетические изменения KRAS, BRAF, PI3K, PTEN, вовлеченные в регуляцию EGFR и его сигнальных путей, отчасти могут объяснить резистентность к анти-EGFR-терапии. На экспериментальных моделях и на клиническом материале показано, что проонкогенное действие экспрессии EGFR реализуется через продукцию IL-6, IL-1 α , IL-1 β и IL-8 [8].

Целью данной работы явилась оценка гетерогенности мКРР в зависимости от наличия или отсутствия мутации в гене KRAS по цитокиновому составу сыворотки и изучение его связи с ответом на лечение таргетными препаратами на основе моноклональных антител.

Материалы и методы

В исследование включены 55 пациентов с клинико-морфологически подтвержденным диагнозом «метастатический колоректальный рак», получавших лечение в отделении противоопухолевой лекарственной терапии «НМИЦ онкологии». Перед началом исследования и проведением любых процедур, предусмотренных в работе,

все больные ознакомились и подписали добровольное согласие. Всем пациентам в процессе диагностики проводилось молекулярно-генетическое исследование согласно клиническим рекомендациям, указывающим на необходимость стратификации больных мКРР для лечения в зависимости от их мутационного статуса: больные с мутациями в гене RAS (в большинстве случаев — KRAS) должны получать анти-VEGF, а имеющие дикий тип RAS — анти-EGFR терапию [13]. Всем больным проводили 4 курса лекарственного лечения по схеме mFOLFOX6. В I группу вошли 26 пациентов, имеющие дикий тип гена RAS, получавших, кроме химиотерапии, препараты анти-EGFR (цетуксимаб, панитумумаб), во II группу — 29 больных, имеющих мутацию в гене KRAS, у которых химиотерапия была дополнена анти-VEGF-терапией (бевацизумаб). Распределение больных по полу, возрасту, локализации первичного очага и метастазов было сопоставимо в обеих группах. Результаты лечения оценивали по критериям RECIST, включающим полный ответ, частичный ответ и прогрессирование заболевания.

До начала и после завершения 4 курсов лечения проводили изучение концентрации цитокинов в сыворотке крови больных методом мультиплексного анализа набором Bio-Plex Pro Human Immunotherapy 20-Plex Panel (Bio-Rad, США), позволяющим определить содержание 20 цитокинов, хемокинов и факторов роста: GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF α . Оценку результатов осуществляли на Luminex 200 Analyser (Bio-Rad, США) с программным обеспечением Bio-Plex Manager Software. Результаты исследования выражали в пг/мл.

Статистическую обработку проводили по критерию Манна–Уитни, т. к. показатели не имели нормального распределения. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты представлены в таблице 1 и на рисунках 1 и 2.

Клиническую оценку ответа удалось провести у 50 (89%) пациентов, т. к. 5 (11%) больных выбыли из исследования. При проведении анти-VEGF-терапии полный ответ достигнут у 4 больных, частичный — у 16, прогрессирование развилось у 5 больных. Для группы, получавшей анти-EGFR-терапию, эти показатели составили 5, 14 и 6 соответственно. Полученные данные сопоставимы с результатами отечественных и зарубежных исследователей [5]. Сравнительная

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ мКРР С РАЗЛИЧНЫМ СТАТУСОМ RAS/ KRAS ДО НАЧАЛА ЛЕЧЕНИЯ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}), пг/мл

TABLE 1. CYTOKINES LEVELS IN SERUM OF mCRC PATIENTS WITH DIFFERENT RAS/KRAS STATUS BEFORE THE TREATMENT, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), pg/mL

Цитокины Cytokines	Мутационный статус опухоли и вариант лечения Tumor mutation status and treatment variant	
	мутация в гене KRAS (анти-VEGF) KRAS mutation (anti-VEGF) n = 25	дикий тип гена RAS (анти-EGFR) RAS wild type (anti-EGFR) n = 25
GM-CSF	11,7 (9,5-14,1)	6,2* (5,2-7,9)
IFN γ	2,6 (1,9-2,9)	3,6 (2,5-5,2)
IL-2	16,9 (15,6-20,3)	13,3* (11,8-14,1)
IL-4	4,3 (1,5-6,5)	5,3 (2,7-6,5)
IL-5	58,4 (47,3-66,8)	35,5* (35,0-45,1)
IL-6	20,6 (15,9-27,9)	9,3* (5,8-12,1)
IL-7	27,3 (20,9-33,6)	0*
IL-8	71,3 (60,3-94,8)	136,3* (120,6-150,4)
IL-10	5,0 (4,7-5,4)	0*
IL-13	3,8 (2,7-4,4)	0*
IL-15	208,5 (196,4-313,9)	185,3 (152,9-225,3)
IL-17A	20,0 (14,5-25,7)	20,0 (15,8-22,4)
IL-18	53,6 (47,8-64,8)	60,6 (50,0-75,7)
IP-10	679,3 (590,2-865,2)	1083,6* (931,5-1225,6)
MCP-1	35,7 (26,0-49,3)	35,8 (25,2-40,7)
MIG	365,3 (230,5-473,9)	504,0* (481,9-898,6)
MIP-1 α	10,0 (5,8-18,5)	34,7* (22,3-41,5)
MIP-1 β	428,4 (388,3-547,4)	442,6 (408,1-540,0)
RANTES	14634,5 (12376-17448)	14591,0 (11777,1-22864,2)
TNF α	116,8 (99,6-133,3)	124,0 (112,8-156,3)

Примечание. * – статистически значимые различия показателей по критерию Манна–Уитни (p < 0,05).

Note. *, statistically significant difference according to Mann–Whitney criterion (p < 0.05).

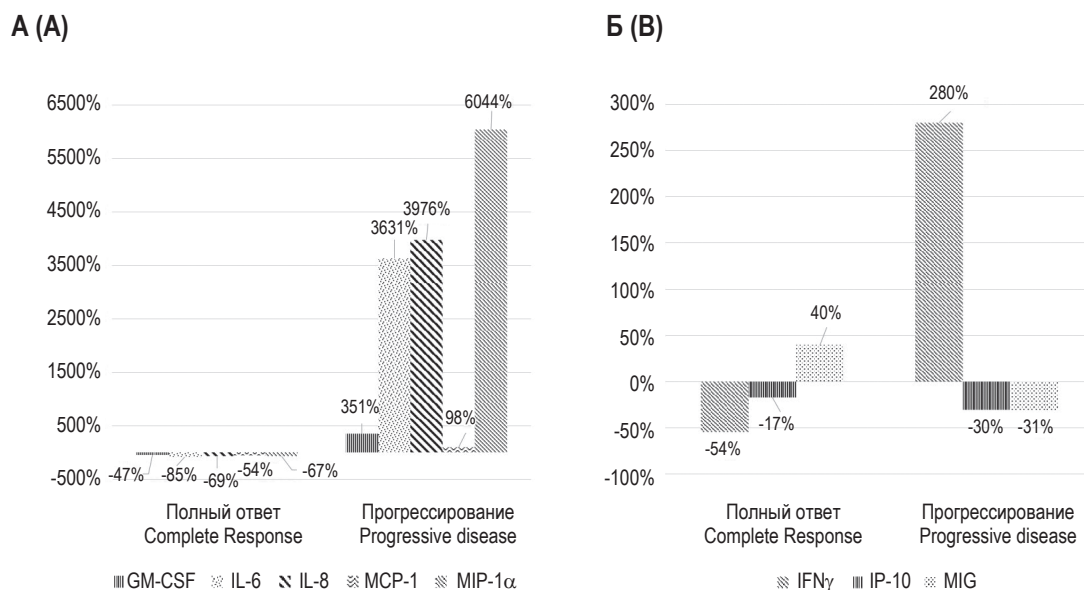


Рисунок 1. Динамика состава цитокинов у больных мКРР при различном ответе на лечение анти-EGFR препаратами (% от исходного уровня)

Примечание. А – провоспалительные цитокины и хемокины. Б – IFNγ и индуцируемые им цитокины.

Figure 1. The dynamics of cytokine composition in mCRC patients with different response to anti-EGFR therapy (% from the initial level)

Note. A, proinflammatory cytokines and chemokines. B, IFNγ and IFNγ-induced cytokines.

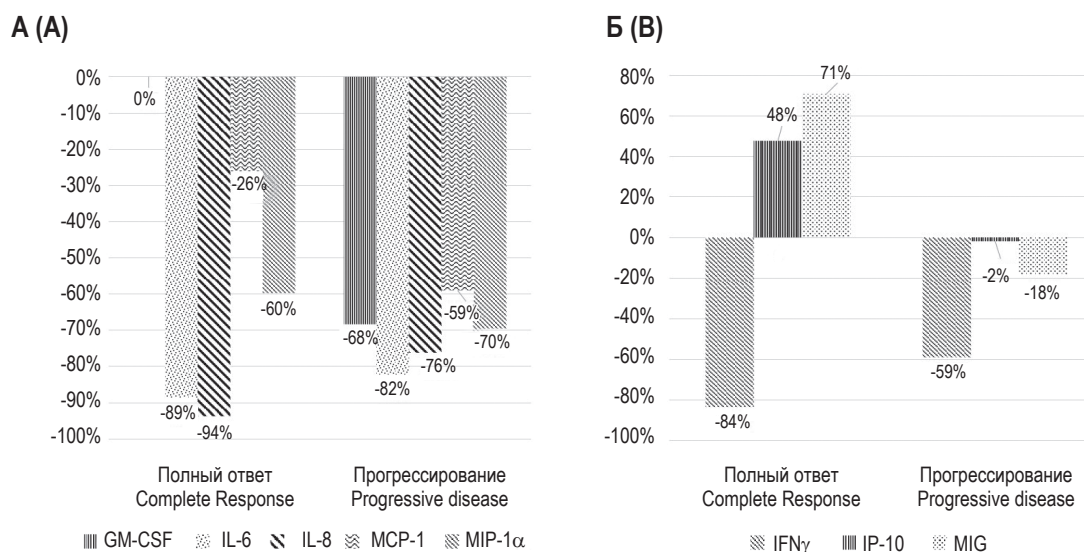


Рисунок 2. Динамика состава цитокинов у больных мКРР при различном ответе на лечение анти-VEGF-препаратами (% от исходного уровня)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. The dynamics of cytokine composition in mCRC patients with different response to anti-VEGF therapy (% from the initial level).

Note. As for Figure 1.

характеристика исходного уровня цитокинов у больных сравниваемых групп представлена в таблице 1, из которой видны статистически значимые различия уровней сывороточных цитокинов в зависимости от мутационного статуса больных

мКРР. Так, при наличии мутации в гене KRAS отмечены более высокие концентрации GM-CSF, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13 и более низкие – IL-8, IP-10, MIG, MIP-1α.

На рисунках 1 и 2 представлена динамика исследованных цитокинов, хемокинов и факторов роста у больных с различным эффектом лечения.

При применении анти-EGFR-терапии различия в динамике между цитокиновым составом больных мКРП с различным ответом на лечение были наиболее выраженными (рис. 1А, Б).

Различный ответ на лечение характеризовался разной динамикой уровней цитокинов. Так, отмечено снижение уровней большинства провоспалительных цитокинов на 47-85% от исходного при полном ответе на лечение и многократное (на 98-6044%) повышение при прогрессировании, причем максимальное возрастание отмечено для MIP-1 α , IL-6, IL-8 (рис. 1А), а данные, характеризующие частичный ответ на лечение, находились в промежуточном диапазоне значений. У больных, получавших анти-EGFR-терапию выявлена парадоксальная динамика по уровням IFN γ и индуцируемых им цитокинов: повышение IFN γ наблюдалось при прогрессировании заболевания, а снижение — при полном ответе на лечение. При этом противоположные изменения отмечены по уровню MIG — снижение с 623,7 (LQ 588,5; UQ 872,7) до 430,2 (LQ 427,9; UQ 442,4) пг/мл при прогрессировании и возрастание с 504,0 (LQ 427,3; UQ 646,1) до 703,9 (LQ 650,4; UQ 987,6) пг/мл при полном ответе. Все отмеченные изменения были статистически значимыми ($p < 0,05$).

Кроме того, у больных с различным ответом на лечение анти-EGFR-препаратами наблюдался различный исходный фон части исследованных цитокинов: полный ответ отмечен у больных с более высокими исходными значениями GM-CSF, IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, MCP-1, MIP-1 α , тогда как частичный ответ и особенно прогрессирование выявлено у больных с исходно низкими уровнями этих цитокинов.

Изменения цитокинового состава сыворотки больных мКРП после анти-VEGF терапии носили иной характер: отмечено выраженное снижение уровня провоспалительных цитокинов и хемокинов вне зависимости от ответа на лечение (рис. 2А). Такая же динамика была и у IFN γ (рис. 2Б). Разнонаправленные изменения наблюдались только по уровню MIG, который, как и в случае успешной анти-EGFR-терапии, повышался при полном ответе, а при прогрессировании заболевания снижался (рис. 2Б). Что касается показателей исходного фона у этих больных, то для полного ответа были характерны высокие уровни IFN γ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-15, MIP-1 α , MIP-1 β и низкие — IP-10, IL-18, MIG, RANTES. У больных с наступившим после анти-VEGF-терапии прогрессированием выявлены высокие исходные значения цитокинов IFN γ , IL-4, IL-8, IL-15,

IL-17A, IL-18, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , RANTES. Таким образом, только часть цитокинов оказалась связана с последующим ответом на лечение.

Итак, обнаружены различия исходных показателей цитокинового состава сыворотки больных мКРП в зависимости от мутационного статуса RAS/KRAS, а также различия их динамики при разном ответе на лечение препаратами моноклональных антител против EGFR и VEGF. Различия, полученные в зависимости от наличия/отсутствия мутации в гене RAS, позволяют предположить, что провоспалительные и туморогенные эффекты у больных с KRAS-мутацией связаны с Th2-хелперами, стимулируемыми IL-5 и IL-13, а также с IL-6 и IL-10, а вклад миграции клеток воспаления (нейтрофилов, моноцитов) менее выражен, чем при диком типе RAS. Напротив, при диком типе RAS отмеченные более высокие концентрации хемокинов IL-8, IP-10, MIG, MIP-1 α предполагают более существенную составляющую, связанную с клеточными факторами, которые проявляют проонкогенное действие. Хемокины IL-8, MIP-1 α и MIP-1 β обладают провоспалительным действием, привлекая в опухоль нейтрофилы, проонкогенная роль которых хорошо известна, а IP-10 является хемоаттрактантом для лимфоцитов, включая Tregs [10]. Единственный считающийся противоопухолевым цитокином, имеющий исходно высокий уровень у больных с диким типом RAS — это MIG — монокин-индукторный интерферон-гамма, который стимулирует миграцию Т-клеток, особенно CTL, в опухоль, усиливает поляризацию Т-хелперов в сторону Th1 и их ответ на IFN γ , а также способствует ответу на ингибиторы иммунных контрольных точек [15]. Тем не менее нами выявлены его разнонаправленные изменения с уровнем самого IFN γ , особенно выраженные в динамике лечения при разном ответе на него. При использовании обеих схем лечения установлено, что полный ответ сопровождается повышением уровня MIG и IP-10, также относящегося к IFN γ -индуцируемым медиаторам. Возможно, такой результат отражает фазность динамики этих трех функционально взаимосвязанных цитокинов.

С учетом того, что высокие концентрации цитокинов и хемокинов в сыворотках считаются признаком активации патологического процесса, будь то воспаление или опухолевый рост, возрастание уровней многих из них после лечения, найденное у обследованных нами больных с прогрессированием заболевания, в целом укладывается в эти представления. В качестве одного из механизмов резистентности мКРП к анти-EGFR-терапии в литературе описано усиление регуляции сигнатур провоспалительных цитоки-

нов IL-1 α , IL-1 β и IL-8 [8]. Хотя в применяемую нами панель не входил IL-1, повышение уровня IL-8 при прогрессировании заболевания вследствие нечувствительности к цетуксимабу/панитумабу и снижение уровня этого хемокина при развитии полного эффекта вполне соответствуют приведенным данным. Что касается действия бевацизумаба на содержание цитокинов, то снижение многих из них после лечения можно объяснить тем, что они были исходно повышены, однако не удалось установить различий в зависимости от ответа на лечение, кроме упомянутого уровня MIG.

Исходные уровни различных лабораторных показателей рассматриваются в литературе как возможные факторы прогноза ответа больных на лечение; в этом плане могут иметь значение и цитокины, тем более что как бевацизумаб, так и цетуксимаб являются препаратами моноклональных антител и, следовательно, вариантом не только таргетной, но и иммунотерапии. Полученные нами данные о том, что исходные значения целого ряда сывороточных цитокинов и хемокинов были выше общих по группе именно у больных, ответивших на ингибиторы EGFR, и наиболее низкими — у больных с развившимся впоследствии прогрессированием, пока не нашли однозначного объяснения. В работе, если не в полной мере объясняющей этот парадокс, то приводящей подобные данные на примере гиперэкспрессирующих EGFR опухолей головы и

шей, было показано, что у больных с исходно регистрируемыми уровнями сывороточного IL-1 α , показатели выживаемости без прогрессирования при применении цетуксимаба были более благоприятными, чем у больных с нулевыми значениями данного цитокина до начала лечения [7]. Поскольку IL-1 является ключевым цитокином иммунного ответа, индуцирующий каскад остальных, в т. ч. исследованных нами цитокинов и хемокинов, мы предполагаем возможность экстраполяции описанных данных и на них.

Заключение

Итак, показан ряд различий цитокинового состава сыворотки больных мКРР с разным мутационным статусом гена RAS, получавших препараты моноклональных антител в качестве таргетной терапии и продемонстрировавших разный ответ на них. Применение анти-EGFR-антител в комплексном лечении больных мКРР вызывает снижение уровня большинства исследованных цитокинов/хемокинов при благоприятном ответе и возрастание — при отсутствии ответа на лечение; после применения анти-VEGF-терапии уровни большинства цитокинов снижаются вне зависимости от эффекта. Отмеченные различия между исходными показателями цитокинового состава сыворотки больных с отсутствием/наличием мутации в гене RAS подтверждают характеристику последнего варианта КРР как более неблагоприятного.

Список литературы / References

1. Златник Е.Ю., Новикова И.А., Бондаренко Е.С., Ульянова Е.П., Ситковская А.О. Характеристика системного и локального иммунитета и стволовых опухолевых клеток у больных колоректальным раком с различной распространенностью, динамикой и прогнозом // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 1. С. 1439-1452. [Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Bondarenko E.S., Uljanova E.P., Sitkovskaya A.O. Characteristics of local and system immunity, and features of cancer stem cells in patients with different stage, dynamics and prognosis of colorectal carcinoma. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 1, pp. 121-134. (In Russ.)] doi 10.15789/1563-0625-COL-2352.
2. Кит О.И., Дженкова Е.А., Мирзоян Э.А., Геворкян Ю.А., Сагакянц А.Б., Тимошкина Н.Н., Каймакчи О.Ю., Каймакчи Д.О., Толмах Р.Е., Дашков А.В., Колесников В.Е., Милакин А.Г., Полуэктов С.И. Молекулярно-генетическая классификация подтипов колоректального рака: современное состояние проблемы // Южно-Российский онкологический журнал, 2021. Т. 2, № 2. С. 50-56. [Kit O.I., Dzhenkova E.A., Mirzoyan E.A., Gevorkyan Yu.A., Sagakyants A.B., Timoshkina N.N., Kaymakchi O.Yu., Kaymakchi D.O., Tolmakh R.E., Dashkov A.V., Kolesnikov V.E., Milakin A.G., Poluektov S.I. Molecular genetic classification of colorectal cancer subtypes: current state of the problem. *Yuzhno-Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal = South Russian Journal of Cancer*, 2021, Vol. 2, no. 2, pp. 50-56. (In Russ.)]
3. Никипелова Е.А., Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Новикова И.А. Колоканцерогенез: онкоиммунология локальных изменений // Злокачественные опухоли, 2016. № 4S1 (21). С. 81-86. [Nikipelova E.A., Kit O.I., Shaposhnikov A.V., Zlatnik E.Y., Novikova I.A. Colocarcinogenesis: oncoimmunology of local changes. *Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumours* 2016, no. 4, Special edition, pp. 81-86. (In Russ.)]
4. Abdellateif M.S., Salem S.E., Badr D.M., Shaarawy S., Hussein Marwa M., Zekri A-R., Fouad M.A. The prognostic significance of 5-fluorouracil induced inflammation and immuno-modulation in colorectal cancer patients. *J. Inflamm. Res.*, 2020, Vol. 31, no. 13. pp. 1245-1259.
5. Bond M.J.G., Bolhuis K., Loosveld O.J.L., de Groot J.W.B., Droogendijk H., Helgason H.H., Hendriks M.P., Klaase J.M., Kazemier G., Liem M.S.L., Rijken A.M., Verhoef C., de Wilt J.H.W., de Jong K.P., Gerhards M.F.,

van Amerongen M.J., Engelbrecht M.R.W., van Lienden K.P., Molenaar I.Q., de Valk B., Haberkorn B.C.M., Kerver E.D., Erdkamp F., van Alphen R.J., Mathijssen-van Stein D., Komurcu A., Lopez-Yurda M., Swijnenburg R.J., Punt C.J.A.; Dutch Colorectal Cancer Study Group. First-line systemic treatment strategies in patients with initially unresectable colorectal cancer liver metastases (CAIRO5): an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study from the Dutch Colorectal Cancer Group. *Lancet Oncol.*, 2023, Vol. 24, no. 7, pp. 757-771.

6. Czajka-Francuz P., Francuz T., Cison-Jurek S., Czajkac A., Fajkis M., Szymczak B., Kozaczka M., Malinowski K.P., ojciech Zasada W., Wojnar J., Chudek J. Serum cytokine profile as a potential prognostic tool in colorectal cancer patients – one center study. *Rep. Pract. Oncol. Radiother*, 2020, Vol. 25, no. 6, pp. 867-875.

7. Espinosa-Cotton M., Rodman S.N., Ross K.A., Jensen I.J., Sangodeyi-Miller K., McLaren A.J., Dahl R.A., Gibson-Corley K.N., Koch A.T., Yang-Xin Fu, Badovinac V.P., Laux D., Narasimhan B., Simons A.L. Interleukin-1 alpha increases anti-tumor efficacy of cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma. *J. ImmunoTher. Cancer*, 2019, Vol. 7, 79. doi: 10.1186/s40425-019-0550-z.

8. Gelfo V., Rodia M.-T., Pucci M., Dall'Ora M., Santi S., Solmi R., Roth L., Lindzen M., Bonafè M., Bertotti A., Caramelli E., Lollini P.-L., Trusolino L., Yarden Y., D'Uva G., Lauriola M. A module of inflammatory cytokines defines resistance of colorectal cancer to EGFR inhibitors. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 44, pp. 72167-72183.

9. Lee H.-M., Lee H.-J., Chang J.-E. Inflammatory Cytokine: An Attractive Target for Cancer Treatment. *Biomedicines*, 2022, Vol. 10, no. 9, pp. 2116-2126.

10. Lunardi S., Lim S.Y., Muschel R.J., Brunner T.B. IP-10/CXCL10 attracts regulatory T cells: Implication for pancreatic cancer. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 2, no. 4, 9, e1027473. doi: 10.1080/2162402X.2015.1027473.

11. Mager L.F., Wasmer M.H., Rau T.T., Krebs P. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front. Oncol.*, 2016, Vol. 6, 96. doi: 10.3389/fonc.2016.00096.

12. Tuomisto A.E., Mäkinen M.J., Väyrynen J.P. Systemic inflammation in colorectal cancer: Underlying factors, effects, and prognostic significance. *World J. Gastroenterol.*, 2019, Vol. 25, no. 31, pp. 4383-4404.

13. van Cutsem E., Cervantes A., Adam R., Sobrero A., Van Krieken J.H., Aderka D., Aranda Aguilar E., Bardelli A., Benson A., Bodoky G., Ciardiello F., D'Hoore A., Diaz-Rubio E., Douillard J.Y., Ducreux M., Falcone A., Grothey A., Gruenberger T., Haustermans K., Heinemann V., Hoff P., Köhne C.H., Labianca R., Laurent-Puig P., Ma B., Maughan T., Muro K., Normanno N., Österlund P., Oyen W.J., Papamichael D., Pentheroudakis G., Pfeiffer P., Price T.J., Punt C., Ricke J., Roth A., Salazar R., Scheithauer W., Schmoll H.J., Tabernero J., Taïeb J., Tejpar S., Wasan H., Yoshino T., Zaanen A., Arnold D. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.*, 2016, Vol. 27, pp. 1386-1422.

14. Xie Y.-H., Chen Y.-X., Fang J.-Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2020, Vol. 5, no. 1, 22. doi: 10.1038/s41392-020-0116-z.

15. Zhang N., Tan Q., Tao D., Song Y., Song W., Wang J., Ma L., Wu D., Feng Y., Yao J., Han X., Shi Y. Cytokines screening identifies MIG (CXCL9) for postoperative recurrence prediction in operated non-small cell lung cancer patients. *Cytokine*, 2022, Vol. 149, 155759. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155759.

Авторы:

Златник Е.Ю. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории Иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Сагакянц А.Б. — к.б.н., доцент, заведующий лабораторией иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Владимирова Л.Ю. — д.м.н., профессор, заведующая отделением противоопухолевой лекарственной терапии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Тишина А.В. — врач-онколог отделения онкогематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Zlatnik E.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Sagakyants A.B., PhD (Biology), Associate Professor, Head, Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Vladimirova L.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Tumor Drug Treatment Department, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Tishina A.V., Oncologist, Department of Hematology, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 04.04.2024
Принята к печати 18.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 04.04.2024
Accepted 18.04.2024

ДИНАМИКА БИОМАРКЕРОВ АУТОФАГИИ И НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ АТЕРОТРОМБОТИЧЕСКОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Луговая А.В.^{1,2}, Калинина Н.М.^{1,3}, Иванов А.М.⁴, Никитин Ю.В.⁴,
Сухина И.А.⁴, Митрейкин В.Ф.¹, Забиров С.Ш.⁵, Кирилкин Г.Э.¹

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» Северо-Западного отделения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

⁵ СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святителя Луки», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Постишемическое нейровоспаление является критическим патофизиологическим процессом в рамках всей схемы церебральной ишемии. Оно характеризуется микроглиальной и астроглиальной активацией и сопровождается нарушениями врожденного и адаптивного иммунного ответа. Ранние этапы повреждения целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) сопровождаются выходом в циркуляцию аутоантигенов головного мозга, в частности нейроспецифического белка S100B. Согласно последним экспериментальным данным активационная аутофагия ассоциирована с постишемическим нейровоспалением и участвует в его регуляции, влияя на исход острого периода ишемического инсульта (ИИ). Предоставлены экспериментальные доказательства участия аутофагии в регуляции продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов. Показано, что при остром ИИ активационная аутофагия влияет на баланс про- и противовоспалительных цитокинов. Цель исследования: количественно оценить ключевые биомаркеры аутофагии, ранний биомаркер повреждения ГЭБ нейропептид S100B, про- и противовоспалительные цитокины в динамике острого периода

Адрес для переписки:

Луговая Анна Владимировна
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Л. Толстого, 6-8, корп. 11.
Тел./факс: 8 (921) 315-97-48, 8 (812) 338-66-11.
E-mail: lugovaya2710spb@icloud.com

Address for correspondence:

Anna V. Lugovaya
First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University
6-8 L. Tolstoy St, Bldg 11
St. Petersburg
197022 Russian Federation
Phone/fax: +7 (921) 315-97-48, +7 (812) 338-66-11.
E-mail: lugovaya2710spb@icloud.com

Образец цитирования:

А.В. Луговая, Н.М. Калинина, А.М. Иванов,
Ю.В. Никитин, И.А. Сухина, В.Ф. Митрейкин,
С.Ш. Забиров, Г.Э. Кирилкин «Динамика биомаркеров
аутофагии и нейровоспаления в остром периоде
атеротромботического ишемического инсульта»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4.
С. 843-852. doi: 10.15789/1563-0625-TDO-16662

© Луговая А.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Lugovaya, N.M. Kalinina, A.M. Ivanov, Yu.V. Nikitin,
I.A. Sukhina, V.P. Mitreikin, S.Sh. Zabirov, G.E. Kirilkin
“The dynamics of biomarkers of autophagy and
neuroinflammation in the acute period of atherothrombotic
ischemic stroke”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4,
pp. 843-852. doi: 10.15789/1563-0625-TDO-16662

© Lugovaya A.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-TDO-16662

ИИ. Выявить взаимосвязь между биомаркерами аутофагии и показателями воспаления. Обследованы 112 пациентов с острым ИИ и группа контроля – 56 человек. Пациентам проводили динамическое клинично-неврологическое обследование на 1-е, 7-е и 14-е сутки от начала заболевания. В эти же временные интервалы осуществляли забор крови на исследование. Уровень аутофагии в лейкоцитах периферической крови определяли методом проточной цитометрии с помощью оценки внутриклеточной экспрессии белков аутофагии LC3, p62 и средней интенсивности флуоресценции красителя Cyto-ID, специфически распознающего активные аутофагосомы. Концентрацию в сыворотке цитокинов TNF α (фактор некроза опухоли- α), IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 (интерлейкин-1 β , интерлейкин-4, интерлейкин-6, интерлейкин-8, интерлейкин-10, интерлейкин-18), нейропептида S100B и биомаркеров аутофагии Beclin-1, LC3 и p62 определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. Обнаружено статистически достоверное повышение исследуемых биомаркеров по сравнению с группой контроля. Максимальное повышение показателей воспаления и нейропептида S100B отмечалось на 1-е, а биомаркеров аутофагии – на 7-е сутки заболевания. Установленные корреляционные связи свидетельствуют об участии активационной аутофагии в регуляции постischemического нейровоспаления и ее вовлечении в ишемическое поражение головного мозга на ранних этапах острого периода ИИ (1-7-е сутки).

Ключевые слова: аутофагия, постischemическое нейровоспаление, острый ишемический инсульт, биомаркеры нейровоспаления, провоспалительные цитокины, биомаркеры аутофагии, Beclin-1, LC3, p62, нейропептид S100B

THE DYNAMICS OF BIOMARKERS OF AUTOPHAGY AND NEUROINFLAMMATION IN THE ACUTE PERIOD OF ATHEROTHROMBOTIC ISCHEMIC STROKE

Lugovaya A.V.^{a,b}, Kalinina N.M.^{a,c}, Ivanov A.M.^d, Nikitin Yu.V.^d, Sukhina I.A.^d, Mitreikin V.P.^a, Zabirov S.Sh.^e, Kirilkin G.E.^a

^a First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, North-Western Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

^c A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^d S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

^e City Clinical Hospital of St. Luke, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Postischemic neuroinflammation is a critical pathophysiological process within the entire pattern of cerebral ischemia. It is characterized by microglial and astroglial activation and is accompanied by disturbances in the innate and adaptive immune response. The early damage of the blood-brain barrier (BBB) integrity is accompanied by the brain autoantigens release into circulation, in particular, the neurospecific protein S100B. According to recent experimental data, activated autophagy is associated with postischemic neuroinflammation, involved in its regulation and influences the outcome of the ischemic stroke (IS) acute period. Experimental evidence is provided for the autophagy involvement in the regulation of proinflammatory cytokines and chemokines production. The influence of activated autophagy on the pro- and anti-inflammatory cytokines balance in acute IS has been demonstrated. Purpose of the study: to quantitatively evaluate key autophagy biomarkers, the early biomarker of BBB damage S100B, pro- and anti-inflammatory cytokines in the dynamics of the IS acute period. To identify the relationship between autophagy and inflammation biomarkers, 112 patients with acute IS and 56 healthy persons were examined. Patients underwent dynamic clinical neurological examination and blood testing on the 1st, 7th and 14th days from the disease's onset. The level of autophagy in peripheral blood leukocytes was determined by flow cytometry by assessing the intracellular expression of autophagy proteins LC3, p62 and mean fluorescence intensity of the Cyto-ID dye, which specifically recognizes active autophagosomes. Serum concentrations of TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6,

IL-8, IL-10, IL-18, neuropeptide S100B and autophagy biomarkers Beclin-1, LC3, p62 were determined by ELISA. A statistically significant increase in the studied biomarkers was found compared to the control group. The maximum increase in inflammation indicators and neuropeptide S100B was observed on the 1st, and autophagy biomarkers – on the 7th day of the disease. Established correlations indicate the participation of activated autophagy in the postischemic neuroinflammation regulation and its involvement in ischemic brain damage in the early stages of the IS acute period (days 1-7).

Keywords: autophagy, postischemic neuroinflammation, acute ischemic stroke, biomarkers of neuroinflammation, proinflammatory cytokines, autophagy biomarkers, Beclin-1, LC3, p62, neuropeptide S100B

Введение

Постинсультный воспалительный ответ играет важную роль в патогенезе острого ИИ. С одной стороны он направлен на удаление некротизированной ткани из зоны ишемии, с другой стороны – приводит к увеличению объема очага поражения и отягощает заболевание. Первоначальное повреждение нейронов возникает в течение нескольких минут после ишемической атаки, тогда как воспалительная реакция, способствующая прогрессированию патологии, может продолжаться от нескольких дней до нескольких месяцев [6, 11].

В ответ на острую ишемию развиваются местные и системные воспалительные реакции, а также иммунный ответ [10]. Стойкий аутоиммунный ответ на антигены мозга имеет негативные долгосрочные последствия, в том числе когнитивные нарушения, такие как постинсультная деменция. Следует подчеркнуть, что иммунная активация способствует вторичному повреждению тканей головного мозга при остром ИИ [8].

Нарушение целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) способствует распаду мозговой ткани и выходу в периферическую кровь (ПК) аутоантигенов головного мозга, что приводит к активации иммунной системы и притоку периферических иммунокомпетентных клеток в центральную нервную систему [11]. К числу подобных аутоантигенов относится ранний биомаркер повреждения ГЭБ глиальный белок S100B. Установлено, что концентрация S100B в сыворотке крови резко возрастает в первые часы после сосудистой катастрофы и сохраняется повышенной в течении 2-3 дней или дольше в зависимости от степени тяжести заболевания. Сывороточный уровень S100B коррелирует с показателями неврологического статуса [4]. Прирост концентрации S100B в острейшем периоде ИИ рассматривается в качестве предиктора геморрагической трансформации или развития вазогенного отека [3].

Установлено, что после ишемической атаки происходит поляризация микроглии в провоспалительный фенотип M1, характеризующийся секрецией провоспалительных цитокинов, в частности TNF α (фактор некроза опухоли α), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, IL-21 (интерлейкин-1 β , интерлейкин-6, интерлейкин-8, интерлейкин-18, интерлейкин-21). Таким образом, в остром периоде ИИ наблюдается дисбаланс цитокинового статуса с преобладанием провоспалительных цитокинов [4].

В остром периоде ИИ в крови пациентов регистрируется значительное повышение концентрации провоспалительных цитокинов. Согласно данным литературы, высокая концентрация IL-6 является показателем неблагоприятного прогноза и может способствовать развитию отсроченных когнитивных расстройств (нарушению памяти, деменции) [13]. Показано, что высокий уровень сывороточного IL-1 β коррелирует со степенью тяжести острого ИИ. В литературных источниках подчеркивается важнейшая роль этого интерлейкина в ишемическом повреждении головного мозга [13]. Повышение в сыворотке противовоспалительного цитокина IL-10, обладающего нейропротективным эффектом, напротив, свидетельствует о включении защитных компенсаторных механизмов и, как правило, сочетается с благоприятным исходом заболевания [12, 13].

В последнее время большой интерес вызывает перспектива модулирования аутофагии при остром ИИ, являющейся мощным регулятором воспалительных реакций [5, 9]. Установлено, что физиологическая (базовая) аутофагия участвует в регуляции продукции цитокинов и хемокинов и способствует поддержанию цитокинового баланса. Показано, что базовая аутофагия в нормальных физиологических условиях способствует поддержанию иммунологической толерантности, в то время как чрезмерная активация аутофагии или, напротив, ингибирование аутофагии приводят к развитию аутоиммунных процессов, воспалительных реакций врожденного и адаптивного иммунного ответа [7, 10].

Установлено, что при остром ИИ аутофагия задействована в важнейших этапах воспалительного каскада, выступая либо в качестве индуктора, либо в роли ингибитора постишемического нейровоспаления. Во многих противовоспалительных механизмах, реализуемых аутофагией при остром ИИ, участвуют ключевые белки аутофагии Beclin-1, LC3 и p62. Они выполняют роль регуляторов, подавляющих отдельные этапы постишемического воспалительного каскада, благотворно влияя на клинический исход заболевания [10].

Учитывая многочисленные механизмы, с помощью которых аутофагия влияет на отдельные этапы постишемического нейровоспаления, по мнению авторов, целесообразно рассмотрение возможных путей ее модуляции с целью воздействия на определенные мишени воспалительного процесса [5, 9].

В связи с тем, что в настоящий момент большинство литературных источников, освещающих данную проблему, приводят результаты экспериментальных исследований, представляет интерес сравнительная оценка биомаркеров аутофагии и постишемического воспаления в клинических условиях.

Цель исследования — количественно определить ключевые биомаркеры аутофагии, ранний биомаркер повреждения ГЭБ нейропептид S100B, про- и противовоспалительные цитокины в динамике острого периода ИИ. Выявить взаимосвязь между биомаркерами аутофагии и показателями воспаления.

Материалы и методы

Все исследования были согласованы с этическим комитетом ПСПбГМУ им. академика И.П. Павлова Минздрава России. Обследованы 112 пациентов (77 мужчин и 35 женщин, средний возраст $52,2 \pm 4,5$ года) в остром периоде впервые развившегося атеротромботического ИИ и 56 условно здоровых лиц по полу и возрасту сопоставимые с больными острым ИИ. Критерии включения в исследование: информированное согласие на участие в исследовании; возраст от 45 до 60 лет; верифицированный с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) впервые выявленный острый ИИ в системе внутренней сонной артерии (атеротромботический патогенетический вариант); неврологическая симптоматика менее 14 баллов по шкале NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale — шкала инсульта Национального института здоровья); пол па-

циентов: мужской, женский; не более 24 ч от начала развития заболевания.

По результатам клинико-неврологического и лабораторного обследований, а также результатам МРТ все пациенты были разделены на 2 группы: со среднетяжелым ($n = 82$) и тяжелым течением заболевания ($n = 30$). I группу (среднетяжелое течение) составили пациенты с тяжестью неврологической симптоматики не более 10 баллов по шкале NIHSS, не более 3 баллов по модифицированной шкале Рэнкина, с объемом поражения паренхимы головного мозга менее 50 см^3 . II группу (тяжелое течение) составили пациенты с тяжестью неврологической симптоматики более 10 баллов по шкале NIHSS, от 3 до 5 баллов по шкале Рэнкина, с объемом поражения головного мозга более 50 см^3 . III группу (контрольную) составили 56 условно здоровых лиц ($n = 56$).

Пациентам проводили динамическое клинико-неврологическое обследование с оценкой выраженности неврологического дефицита по шкале NIHSS, исследование объема очага поражения методом МРТ головного мозга, тестирование по модифицированной шкале Рэнкина на 1-е, 7-е и 14-е сутки от начала заболевания. В эти же временные интервалы осуществляли забор крови на исследование.

Для количественного определения аутофагосом в лейкоцитах периферической крови применяли набор для детекции аутофагии (CYTO-ID® Autophagy detection kit 2.0, Enzo, Великобритания), содержащий индикаторный краситель Cyto-ID. Этот катионный амфифильный краситель специфически встраивается в аутофагосомы на всех стадиях аутофагии и дает интенсивное зеленое свечение. Количество активных аутофагосом оценивали по средней интенсивности флуоресценции красителя Cyto-ID с помощью метода проточной цитометрии (MoFlo TM Astrios EQ, Beckman Coulter, США). Для оценки внутриклеточной экспрессии биомаркеров аутофагии LC3 и p62 проводили пермеабиллизацию мембраны лейкоцитов с последующим окрашиванием исследуемых образцов моноклональными антителами к белкам LC3 и p62 (Biorbyt Explore Bioreagents, Великобритания).

Концентрацию цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TNF α , биомаркеров аутофагии Beclin-1, LC3 и p62, белка S100B в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью соответствующих тест систем (ELISA Kits; Abcam, Великобритания) и (ELISA Kits; Enzo, Великобритания).

Результаты и обсуждение

Результаты оценки изучаемых показателей в динамике острого периода ИИ представлены в таблицах 1 и 2.

Статистически достоверное повышение внутриклеточной экспрессии биомаркеров аутофагии LC3, p62 и средней интенсивности флюоресценции красителя Cyto-ID в лейкоцитах периферической крови (ПК) отмечалось на протяжении всего периода исследования у пациентов обеих групп по сравнению с группой контроля (табл. 1). Максимальный уровень исследуемых показателей выявлен на 7-е сутки заболевания. У пациентов I группы (среднетяжелое течение заболевания) наблюдалась значительная тенденция к снижению уровня показателей аутофагии на 14-е сутки. У пациентов II группы (тяжелое течение заболевания) высокие значения биомаркеров аутофагии по сравнению с группой контроля наблюдались на протяжении всего исследования, включая 14-е сутки. Выявлена прямая корреляционная связь между средним уровнем флюоресценции Cyto-ID в общей популяции лейкоцитов, тяжестью неврологического дефицита по шкале NIHSS и объемом поражения головного мозга на 1-е ($r = 0,69$; $p < 0,05$ и $r = 0,73$; $p < 0,01$ соответственно) и 7-е сутки ($r = 0,78$; $p < 0,01$ и $r = 0,83$; $p < 0,01$ соответственно). Согласно данным экс-

периментальных исследований на ранних этапах острого периода ИИ действует активационная (деструктивная) аутофагия, участвующая в ишемическом повреждении клеток головного мозга. В конце острого периода при адекватно назначенной терапии происходит подавление активационной и включение базовой (физиологической) аутофагии, выполняющей защитную нейροпротективную функцию [7]. Таким образом, в совокупности с литературными данными, выявленные нами корреляционные связи между интенсивностью флюоресценции Cyto-ID и клинико-неврологическими показателями на 1-е и 7-е сутки позволяют предположить, что активность аутофагии клеток ПК может отражать активность деструктивной аутофагии в очаге поражения на ранних этапах острого периода ИИ.

Исследованием установлено, что в остром периоде ИИ наблюдается статистически достоверное по сравнению с контролем повышение концентрации исследуемых провоспалительных цитокинов, более выраженное у пациентов II группы (табл. 2). В обеих группах пациентов наблюдалось динамическое снижение концентрации биомаркеров воспаления. Тем не менее, даже на 14-е сутки средние значения показателей воспаления были статистически значимо повышены по сравнению с группой контроля, что свиде-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ БИОМАРКЕРОВ АУТОФАГИИ В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ДИНАМИКЕ ОСТРОГО ПЕРИОДА ИИ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF INTRACELLULAR EXPRESSION OF AUTOPHAGY BIOMARKERS IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES DURING THE ACUTE PERIOD OF IS

Показатель Index	Группы обследуемых лиц Groups of examined persons								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	1-е сутки 1 st day			7-е сутки 7 th day			14-е сутки 14 th day		
LC3, % позитивных клеток LC3, % positive cells	5,9**	7,5**	0,08	7,4**	11,8**	—	4,1*	9,6**	—
p62, % позитивных клеток p62, % positive cells	1,9*	3,1*	0,9	3,5*	4,2*	—	2,1*	3,6*	—
Cyto-ID, MFI [#]	6,8*	9,4*	1,1	8,9*	12,5**	—	4,5*	10,1**	—

Примечание. 1. I группа – среднетяжелое течение заболевания (n = 82); II группа – тяжелое течение заболевания (n = 30); III группа – контрольная (n = 56). 2. * – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,05$); ** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,01$); *** – различия по изучаемому показателю с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,001$). 3. # – средняя интенсивность флюоресценции.

Note. 1. I group, moderate course of the disease (n = 82); II group, severe course of the disease (n = 30); III group – control (n = 56). 2. *, differences in the studied indicator with the control group are statistically significant ($p < 0.05$); **, differences in the studied indicator with the control group are statistically significant ($p < 0.01$); ***, differences in the studied indicator with the control group are statistically significant ($p < 0.001$). 3. #, mean fluorescence intensity.

тельствует о продолжающейся воспалительной реакции. Показано, что нейровоспаление, спровоцированное ишемией, может продолжаться от нескольких дней до нескольких месяцев [6, 11].

Выявлено статистически значимое по сравнению с контролем (III группа) повышение биомаркеров аутофагии, более выраженное во II группе пациентов (табл. 2). Вызывает интерес неравномерное динамическое изменение биомаркеров аутофагии и показателей воспаления. В отличие от последних все изучаемые биомаркеры аутофагии достигают максимальных значений на 7-е сутки с незначительной тенденцией к снижению на 14-й день исследования. В совокупности с результатами, полученными при оценке показателей аутофагии в клетках ПК (табл. 1),

можно предположить, что активационная аутофагия в очаге поражения достигает своего пика на 7-е сутки острого периода ИИ.

Максимальные значения концентрации нейроспецифического белка S100B отмечались на 1-е сутки заболевания с последующим динамическим снижением (табл. 2). Следует подчеркнуть, что в 1-й день исследования белок S100B был повышен в 9 раз в группе с тяжелым течением ИИ по сравнению с группой со среднетяжелым течением заболевания. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что данный показатель коррелирует со степенью тяжести заболевания и является предиктором развития осложнений острого ИИ [3, 6].

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОДЕРЖАНИЯ БИОМАРКЕРОВ АУТОФАГИИ, ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ, НЕЙРОПЕПТИДА S100B В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ В ДИНАМИКЕ ОСТРОГО ПЕРИОДА ИИ

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE CONTENT OF BIOMARKERS OF AUTOPHAGY, PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES, NEUROPEPTIDE S100B IN THE PATIENT'S BLOOD SERUM IN THE DYNAMICS OF THE ACUTE PERIOD OF IS

Показатель Index	Группы обследуемых лиц Groups of examined persons								
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	1-е сутки 1 st day			7-е сутки 7 th day			14-е сутки 14 th day		
LC3, нг/л LC3, ng/L	175,8*	252,7**	89,3	216,4**	311,2**	—	196,1*	273,8**	—
Beclin-1, нг/л Beclin-1, ng/L	149,9*	188,9*	75,6	198,9*	230,7**	—	168,3*	203,9**	—
p62, пг/мл p62, pg/mL	37,5*	20,1*	11,4	32,7*	41,4**	—	24,6*	38,3*	—
TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	27,8**	64,1***	6,4	18,9*	27,9*	—	15,1*	20,9**	—
IL-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/mL	30,9**	55,4***	3,9	19,8**	33,5***	—	11,2*	19,5**	—
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	23,5**	30,9**	5,5	19,4*	26,8**	—	13,1*	21,4**	—
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	20,4*	71,5***	6,9	14,1*	63,5***	—	13,5*	61,6***	—
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	41,4**	81,5***	12,8	30,6*	59,8**	—	24,9*	41,7**	—
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	28,3**	59,8***	4,5	20,7**	45,4***	—	13,3*	32,1**	—
IL-18, пг/мл IL-18, pg/mL	358,9*	891,6***	158,9	303,8*	501,6**	—	211,5*	415,6**	—
S100B, пг/мл S100B pg/mL	20,5**	183,8***	0,9	13,9**	39,9***	—	10,5**	23,8**	—

Примечание. См. пункты 1 и 2 примечания к таблице 1.

Note. See points 1 and 2 of the note to Table 1.

Для выявления взаимосвязи между активностью аутофагии в динамике острого периода ИИ и показателями воспаления в сыворотке крови в качестве исследуемого параметра аутофагии был выбран белок LC3 (microtubule-associated protein light chain 3), который участвует в образовании аутофагосом. Согласно данным литературы, белок LC3 является самым надежным биомаркером аутофагии, так как его содержание в исследуемом биологическом материале положительно коррелирует с количеством активных аутофагосом — важнейших компонентов процесса аутофагии. Таким образом, этот показатель отражает активность процесса аутофагии [2].

В 1-й день исследования выявлены сильные прямые корреляционные взаимосвязи между сывороточной концентрацией белка LC3 и исследуемых провоспалительных цитокинов, более выраженные во II группе (табл. 3). Установленные взаимосвязи между LC3 и цитокинами IL-1 β и IL-18 мы анализировали в нашей предыдущей

публикации [1], поэтому на этом вопросе мы останавливаться не будем.

Обращает на себя внимания сильная корреляционная связь между LC3 и TNF α ($r = 0,73$; $p < 0,05$). Как известно, TNF α является плейотропным цитокином, играющим важную роль во многих патологических клеточных процессах, включая роль индуктора активационной аутофагии [5, 12]. Полученные результаты позволяют предположить, что на ранних этапах острого периода ИИ TNF α и аутофагия взаимодействуют по принципу обратной связи, дополнительно активируя друг друга: чем выше концентрация TNF α , тем интенсивнее процесс аутофагии, которая в свою очередь стимулирует дополнительную продукцию TNF α и т. д.

Не менее важное значение имеет выявленная прямая корреляционная зависимость между LC3 и IL-8 (табл. 3). Вызывая экспрессию молекул межклеточной адгезии, IL-8 стимулирует прилипание нейтрофилов к эндотелиальным клеткам и субэн-

ТАБЛИЦА 3. УСТАНОВЛЕННЫЕ КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ КЛЮЧЕВОГО БИОМАРКЕРА АУТОФАГИИ LC3 (нг/л) И УРОВНЕМ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ В ДИНАМИКЕ ОСТРОГО ПЕРИОДА ИИ У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 3. CORRELATIONS BETWEEN THE CONCENTRATION OF THE KEY AUTOPHAGY BIOMARKER LC3 (ng/L) AND THE LEVEL OF INDICATORS OF NEUROINFLAMMATION IN THE DYNAMICS OF THE ACUTE PERIOD OF IS IN PATIENTS WITH DIFFERENT SEVERITY OF THE DISEASE

Показатель Index	Коэффициент Спирмена (r) Spearman's coefficient (r) $p < 0,05$					
	Группы обследуемых пациентов Groups of examined patients					
	I	II	I	II	I	II
	1-й день 1 st day		7-й день 7 th day		14-й день 14 th day	
TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	$r = 0,68$	$r = 0,73$	$r = 0,56$	$r = 0,59$	$r = 0,31$	$r = 0,36$
IL-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/mL	$r = 0,79$	$r = 0,83$	$r = 0,63$	$r = 0,69$	$r = -0,39$	$r = -0,45$
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	$r = -0,21$	$r = -0,42$	$r = -0,15$	$r = -0,31$	$r = -0,11$	$r = -0,18$
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	$r = 0,61$	$r = 0,75$	$r = 0,53$	$r = 0,68$	$r = 0,35$	$r = 0,55$
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	$r = 0,54$	$r = 0,59$	$r = 0,21$	$r = 0,29$	$r = 0,18$	$r = 0,23$
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	$r = -0,44$	$r = -0,63$	$r = -0,33$	$r = -0,55$	$r = -0,22$	$r = -0,32$
IL-18, пг/мл IL-18, pg/mL	$r = 0,73$	$r = 0,79$	$r = 0,61$	$r = 0,65$	$r = -0,29$	$r = -0,47$

Примечание. См. пункт 1 примечания к таблице 1.

Note. See point 1 of the note to Table 1.

дотелиальным матричным белкам. Привлеченные IL-8 лейкоциты выделяют матриксные металло-протеиназы-2 и -9, которые расщепляют плотные контакты между эндотелиальными клетками сосудов головного мозга [11, 13]. Это приводит к повреждению ГЭБ, вследствие чего повышается проницаемость сосудов, что может способствовать развитию вазогенного отека [10, 11].

Установленные отрицательные корреляционные связи между LC3 и противовоспалительными цитокинами IL-4 и IL-10 (табл. 3) подтверждают результаты экспериментальных исследований, свидетельствующие о том, что эти интерлейкины не только оказывают важнейшее нейропротективное действие (снижают активацию микроглии, уменьшают объем инфаркта мозга у мышей, способствуют восстановлению двигательных и когнитивных функций), но и участвуют в подавлении активационной аутофагии [10]. Согласно данным литературы, Th2-цитокины IL-4, IL-13 и IL-10 ингибируют патологическую активационную аутофагию [10, 13], что рассматривается в качестве одной из потенциальных терапевтических стратегий в лечении острого ИИ [3, 10, 11].

Заключение

Таким образом, максимальное повышение исследуемых биомаркеров нейровоспаления TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 наблюдалось на 1-е, а ключевых показателей аутофагии LC3, Beclin-1, p62, Cyto-ID – на 7-е сутки острого ИИ. Значимые корреляционные связи между активностью аутофагии и основными показателями воспаления отмечалась на 1-е и 7-е сутки заболевания, существенно ослабевая в дальнейшем. Полученные данные свидетельствуют об участии активационной аутофагии в регуляции постишемического нейровоспаления и ее вовлечении в ишемическое поражение головного мозга на ранних стадиях острого периода ИИ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и выражают благодарность коллективу кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» г. Санкт-Петербург за сотрудничество и предоставление базы для обследования пациентов.

Список литературы / References

1. Луговая А.В., Калинина Н.М., Иванов А.М., Никитин Ю.В., Сухина И.А., Митрейкин В.Ф., Семенова Е.В. Выявление взаимосвязи между биомаркерами аутофагии, апоптоза и воспаления в остром периоде атеротромботического ишемического инсульта // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 4. С. 939-946. [Lugovaya A.V., Kalinina N.M., Ivanov A.M., Nikitin Yu. V., Sukhina I.A., Mitreikin V.Ph., Semenova E.V. Identification of the relationship between biomarkers of autophagy, apoptosis and inflammation in the acute period of atherothrombotic ischemic stroke. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 939-946. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IOT-2832.
2. Chen R., Jiang M., Li B., Zhong W., Wang Z., Yuan W., Yan J. The role of autophagy in pulmonary hypertension: a double-edge sword. *Apoptosis*, 2018, Vol. 23, no. 9, pp. 459-469.
3. de Almeida Barros A.G., E Silva L.R., Pessoa A., Falcão A.E., Magno L.A.V., Rosa D.V.F., Silva M.A.R., de Miranda D.M., Nicolato R. Use of biomarkers for predicting a malignant course in acute ischemic stroke: an observational case-control study. *Sci. Rep.*, 2023, Vol. 13, no. 1, 16097. doi: 10.1038/s41598-023-43408-z.
4. Hu K., Gao Y., Chu S., Chen N. Review of the effects and Mechanisms of microglial autophagy in ischemic stroke. *Int. Immunopharmacol.*, 2022, Vol. 108, 108761. doi: 10.1016/j.intimp.2022.108761.
5. Jiang C.T., Wu W.F., Deng Y.H., Ge J.W. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (Review). *Mol. Med. Rep.*, 2020, Vol. 21, no. 5, pp. 2006-2018.
6. Lasek-Bal A., Jedrzejowska-Szypulka H., Student S., Warsz-Wianecka A., Zareba K., Puz P., Bal W., Pawletko K., Lewin-Kowalik J. The importance of selected markers of inflammation and blood-brain barrier damage for short-term ischemic stroke prognosis. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2019, Vol. 70, no. 2, pp. 209-217.
7. Li H., Qiu S., Li X., Li M., Peng Y. Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients. *J. Transl. Med.*, 2015. Vol. 13, 359. doi: 10.1186/s12967-015-0726-3.
8. Li R., Fan W., Li D., Liu X. Correlation of common inflammatory cytokines with cognition impairment, anxiety, and depression in acute ischemic stroke patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2022, Vol. 55, e11517. doi: 10.1590/1414-431X2021e11517.
9. Lu X., Zhang J., Ding Y., Wu J., Chen G. Novel therapeutic strategies for ischemic stroke: recent insights into autophagy. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2022, Vol. 2022, 3450207. doi: 10.1155/2022/3450207.
10. Mo Y., Sun Y.Y., Liu K.Y. Autophagy and inflammation in ischemic stroke. *Neural Regen. Res.*, 2020, Vol. 15, no. 8, pp. 1388-1396.

11. Tsygan N.V., Trashkov A.P., Litvinenko I.V., Yakovleva V.A., Ryabtsev A.V., Vasiliev A.G., Churilov L.P. Autoimmunity in acute ischemic stroke and the role of blood-brain barrier: the dark side or the light one? *Front. Med.*, 2019, Vol. 13, no. 4, pp. 420-426.
12. Qin X., Akter F., Qin L., Cheng J., Guo M., Yao S., Jian Z., Liu R., Wu S. Adaptive immunity regulation and cerebral ischemia. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 689. doi: 10.3389/fimmu.2020.00689.
13. Zhu H., Hu S., Li Y., Sun Y., Xiong X., Hu X., Chen J., Qiu S. Interleukins and Ischemic Stroke. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 828447. doi: 10.3389/fimmu.2022.828447.

Авторы:

Луговая А.В. — к.м.н., врач — аллерголог-иммунолог, врач клинической лабораторной диагностики, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник, Научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» Северо-Западного отделения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Калинина Н.М. — д.м.н., профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; врач — аллерголог-иммунолог, главный научный сотрудник ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Иванов А.М. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Никитин Ю.В. — врач — аллерголог-иммунолог центра клинической лабораторной диагностики, преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Lugovaya A.V., PhD (Medicine), Clinical Allergist-Immunologist, Clinical Laboratory Diagnostician, Assistant of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course in Molecular Medicine, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University; Senior Research Associate, Research Center, St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, North-Western Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Kalinina N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University; Leading Research Associate, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ivanov A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Nikitin Yu.V., Clinical Allergologist-Immunologist, Center of Clinical Laboratory Diagnostics; Lecturer, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Сухина И.А. — к.б.н., преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Митрейкин В.Ф. — д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Забиров С.Ш. — к.м.н., руководитель центра медицинской реабилитации и заведующий отделением медицинской реабилитации взрослых с нарушением функции ЦНС, врач-невролог, член Союза реабилитологов России, СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святителя Луки», Санкт-Петербург, Россия

Кирилкин Г.Э. — клинический ординатор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Sukhina I.A., PhD (Biology), Lecturer, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Mitreikin V.Ph., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathological Physiology, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Zabirov S.Sh., PhD (Medicine), Head, Center for Medical Rehabilitation and Head, Department of Medical Rehabilitation of Adults with CNS Disabilities, Neurologist, Member of the Union of Rehabilitologists of Russia, City Clinical Hospital of St. Luke, St. Petersburg, Russian Federation

Kirilkin G.E., Clinical Resident of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course of Molecular Medicine, First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 10.04.2024
Принята к печати 12.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 10.04.2024
Accepted 12.04.2024

ИДЕНТИФИКАЦИЯ HLA-ГАПЛОТИПОВ В КАЧЕСТВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОВ С РЕФРАКТЕРНЫМ НЕФРОТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Кудряшов С.И., Карзакова Л.М.

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

Резюме. Одной из актуальных проблем медицины является выяснение патогенетических механизмов гломерулонефритов (ГН) с рефрактерным нефротическим синдромом (НС). В 30% случаев рефрактерный НС имеет генетическую природу. Роль генов системы гистосовместимости человека (HLA) в развитии рефрактерного НС изучена не достаточно. Целью настоящего исследования явилось изучение ассоциации двухлокусных гаплотипов аллелей генов HLA класса II с ГН, проявляющимися рефрактерным НС. В рамках данной работы было проведено типирование генов HLA класса II у 136 больных ГН с НС методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), включавшее идентификацию 13 аллелей локуса DRB1, 8 – DQA1, и 12 – DQB1. Когорта обследованных была разделена на две группы – группу больных с рефрактерным НС и группу больных с редкими рецидивами, с отсутствием рефрактерности к проводимой терапии. В исследование отбирали лиц чувашской национальности. В исследуемых группах пациентов определяли величины неравновесного сцепления аллелей (D) для выявления характерных двухлокусных гаплотипов и их частоту по формулам Piazza A. и соавт. Для оценки ассоциации рефрактерного НС с HLA-гаплотипами рассчитывали величины относительных рисков (ОР) по формуле Woolf B. и Haldane J. Статистическую значимость ассоциации оценивали по двустороннему точному методу Фишера для четырехпольных таблиц (P_F). Наибольшее значение ОР было установлено у гаплотипа HLA- DRB1*11(05)-DQA1*0301. Его величина составила 42,1 ($P_F = 0,005$). Другой статистически значимой была величина ОР у гаплотипа HLA-DRB1*15(02)-DQB1*0602-8, равнявшаяся 0,2 ($P_F = 0,004$). Значение данного показателя меньше 1, что свидетельствует о его отрицательной связи с рефрактерным НС. В результате проведенного исследования в HLA-генотипе лиц чувашской популяции обнаружен гаплотип DRB1*11(05)-DQA1*0301, связанный с повышенным риском развития рефрактерного НС, и протективный гаплотип DRB1*15(02)-DQB1*0602-8, снижающий риск возникновения рефрактерности НС к иммуносупрессивной терапии.

Ключевые слова: HLA-гаплотипы, гломерулонефриты, нефротический синдром, рефрактерность к терапии, гены гистосовместимости человека, рецидивы нефротического синдрома

Адрес для переписки:

Карзакова Луиза Михайловна
ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет
имени И.Н. Ульянова»
428015, Россия, Чувашская Республика, г. Чебоксары,
Московский пр., 15.
Тел.: 8 (903) 358-82-89.
E-mail: luizak58@mail.ru

Address for correspondence:

Louise M. Karzakova.
I. Ulyanov Chuvash State University
15 Moscovsky Ave
Cheboksary, Chuvash Republic
428015 Russian Federation
Phone: +7 (903) 358-82-89.
E-mail: luizak58@mail.ru

Образец цитирования:

С.И. Кудряшов, Л.М. Карзакова «Идентификация
HLA-гаплотипов в качестве генетических маркеров
гломерулонефритов с рефрактерным нефротическим
синдромом» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 4. С. 853-860. doi: 10.15789/1563-0625-ИОН-16846

© Кудряшов С.И., Карзакова Л.М., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.I. Kudryashov, L.M. Karzakova "Identification of HLA
haplotypes as genetic markers of glomerulonephritis with
refractory nephrotic syndrome", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4,
pp. 853-860.
doi: 10.15789/1563-0625-ИОН-16846

© Kudryashov S.I., Karzakova L.M., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-ИОН-16846

IDENTIFICATION OF HLA HAPLOTYPES AS GENETIC MARKERS OF GLOMERULONEPHRITIS WITH REFRACTORY NEPHROTIC SYNDROME

Kudryashov S.I., Karzakova L.M.

I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

Abstract. One of the urgent problems of medicine is to clarify the pathogenetic mechanisms of glomerulonephritis (GN) with refractory nephrotic syndrome (NS). In 30% of cases, refractory NS has a genetic nature. The role of human histocompatibility system (HLA) genes in the development of refractory NS has not been sufficiently studied. The purpose of this study was to study the association of two-locus haplotypes of HLA class II gene alleles with GN manifested by refractory NS. The typing of HLA class II genes in 136 patients with NS was performed by polymerase chain reaction (PCR), which included the identification of 13 alleles of the DRB1, 8 – DQA1, and 12 – DQB1 loci. The cohort of the examined patients was divided into two groups: a group of patients with refractory NS and a group of patients with rare relapses, with a lack of refractoriness to the therapy. Persons of Chuvash nationality were selected for the study. In the studied groups of patients, the values of the nonequilibrium coupling of alleles (D) were determined to identify characteristic two-locus haplotypes and their frequency according to the formulas of Piazza A. and coauthors. To assess the association of refractory NS with HLA haplotypes, relative risk values (RR) were calculated using the formula Woolf B. and Haldane J. The statistical significance of the association was assessed using the two-sided Fisher exact method for four-field tables (P_F). The highest value of RR was found in the haplotype HLA-DRB1*11(05)-DQA1*0301. Its value was 42.1 ($P_F = 0.005$). Another statistically significant value was the RR value of the haplotype HLA-DRB1*15(02)-DQB1*0602-8, equal to 0.2 ($P_F = 0.004$). As a result of the study, the haplotype DRB1*11(05)-DQA1*0301, associated with an increased risk of refractory NS, and the protective haplotype DRB1*15(02)-DQB1*0602-8, reducing the risk of refractory NS were found in the HLA genotype of individuals in the Chuvash population.

Keywords: HLA haplotypes, glomerulonephritis, nephrotic syndrome, refractory to therapy, human histocompatibility genes, recurrence of nephrotic syndrome

Введение

Одной из актуальных проблем медицины является выяснение патогенетических механизмов гломерулонефритов (ГН) с нефротическим синдромом (НС), которыми заболевают преимущественно лица молодого трудоспособного возраста. Актуальность данной проблемы акцентируется в связи с развитием у 10-15% пациентов с НС резистентности к инициальной терапии глюкокортикостероидами (ГКС). Такие случаи НС относят к стероидрезистентным. Больше чем у половины больных ГН с стероидчувствительным НС развиваются рецидивы заболевания. При повторном назначении стероидов может развиваться стреоидзависимость. Как стероидрезистентный НС, так и его стероидзависимый вариант способны вызвать развитие рефрактерного НС, отличающегося «часто рецидивирующим» или персистирующим те-

чением. Механизмы развития рефрактерного НС гетерогенны. В 30% случаев рефрактерного НС обнаруживаются генетические мутации. На сегодняшний день идентифицировано 70 генов, ассоциированных со стероидрезистентным НС [4]. Наиболее значимыми мутациями при НС являются те, которые связаны с однонуклеотидными заменами генов трансмембранного рецептора фосфолипазы A2 M-типа (PLA2R), экспрессирующегося на подоцитах, и подоцитарного гена аполипопротеина L1 (APOL1) [14]. Причины развития остальных 70% «идиопатических» случаев рефрактерного НС все еще не ясны. В тех случаях, когда не выявляется связь с генами структурных и регуляторных белков подоцитов, причина формирования рефрактерности НС может быть связана с другими системами генов. Известно о наличии выраженной связи развития аутоим-

мунной патологии, к разряду которой относятся ГН с НС (мембранозная нефропатия — МНП, нефропатия с минимальными изменениями — НПМИ, фокально-сегментарный гломерулосклероз — ФСГС) с генами иммунного ответа — HLA класса II. Так описаны HLA-ассоциации при системной красной волчанке, ревматоидном артрите, сахарном диабете типа 1 [6, 16]. Установлены ассоциации однонуклеотидных мутаций гена HLA-DQA1 — полиморфизма rs2187668 с развитием МНП — наиболее распространенного гистоморфологического варианта первичного НС у взрослых [11], полиморфизмов rs1129740 и rs1071630 — со стероидчувствительной НПМИ у детей [5]. Связь rs2187668 со стероидчувствительным НС подтвердилась в различных этнических популяциях [3]. Однако данные мутированные аллели редко встречались у пациентов с рефрактерным НС [2]. Литературные данные по изучению влияния классических аллелей HLA-генов на заболеваемость и рефрактерность ГН с НС весьма скудные и полученные разными исследователями результаты не совпадают [1, 9, 13]. Так, по данным Sekula P. и соавт. [9], аллель DQA1*0501 связан с повышенным риском развития таких морфологических вариантов ГН с НС, как МНП и ФСГС. Результаты ранее проведенного нами исследования свидетельствовали о том, что HLA-DQA1*0501 является аллелем, определяющим устойчивость к развитию рефрактерного НС в чувашской популяции [1]. Более значимо при изучении HLA-ассоциаций заболеваний исследование частоты гаплотипов — неравновесно сцепленных аллелей разных локусов в хромосоме.

Целью настоящего исследования явилось изучение ассоциации двухлокусных гаплотипов аллелей HLA-генов класса II с ГН, проявляющимся рефрактерным НС.

Материалы и методы

В рамках данной работы было проведено типирование генов HLA класса II у больных ГН с НС методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), включавшее идентификацию 13 аллелей локуса DRB1, 8 — DQA1, и 12 — DQB1 (подробный список идентифицируемых аллелей приведен в ранее опубликованной статье [1], в разделе «Материалы и методы»). ДНК выделяли из венозной крови с помощью набора реагентов «Проба — Репид — Генетика» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) в соответствии с прилагаемой набору инструкцией, для проведения ПЦР использовали наборы

реагентов «HLA-ДНК-ТЕХ» и детектирующий амплификатор «ДТ прайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Программирование этапов ПЦР и детекция результатов ПЦР осуществлялись на основе программного обеспечения RealTime_PCR, приложенного к детектирующему амплификатору.

ГН диагностировали, основываясь на данных клинических, лабораторных, лучевых и гистоморфологических исследований. В исследование было отобрано 136 пациентов, среди которых у 42,7% была установлена МНП, у 32,2% — ФСГС, у 23% — НПМИ, у 2,3% — другие гистоморфологические формы ГН. В момент постановки диагноза средний показатель возраста больных ГН составлял $42,8 \pm 6,9$ года. В группе больных мужчины составляли 68,5%. У 37,2% больных НС имел часто рецидивирующее течение, а у 12,1% НС имел персистирующее течение. НС идентифицировали на основании обнаружения гиперпротеинурии выше значения 3,5 г в сутки, гипоальбуминемии менее 28 г/л, гиперхолестеринемии более 6,6 ммоль/л и кардинального клинического признака — массивных отеков. Рефрактерность НС к лечению устанавливали по анамнестическим данным в соответствии со следующими критериями: 1) НС с частыми рецидивами: рецидив ≥ 2 раз за 6 месяцев или ≥ 4 раза за 12 месяцев; 2) стероидозависимость НС: рецидив произошел в течение 2 недель после стероидной терапии; 3) отсутствие эффекта от применения одного курса иммуносупрессивной терапии при лечении МНП; 4) непереносимость стероидов; 5) стероидрезистентность НС: НПМИ или ФСГС не реагировали на лечение ГКС в течение 12 недель. Когорта обследованных была разделена на две группы — группу больных с рефрактерным НС и группу больных с отсутствием рефрактерности к проводимой терапии. В исследование отбирали лиц чувашской национальности в связи с тем, что для каждой этнической популяции характерны специфические черты HLA-профиля. В исследуемых группах определяли величины неравновесного сцепления аллелей (D) для выявления характерных двухлокусных гаплотипов и их частоту по формулам Piazza A. и соавт. [7]. Для оценки ассоциации рефрактерного НС с HLA-гаплотипами рассчитывали величины относительных рисков (ОР) по формуле Woolf B. и Haldane J. [12]. Статистическую значимость ассоциации оценивали по двустороннему точному методу Фишера для четырехпольных таблиц (P_F).

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного исследования выявили ряд различий по частоте представленности гаплотипов в изучаемых группах пациентов с ГН (табл. 1). В обеих группах пациентов встречались по 8 общих вариантов гаплотипов, содержащих по одному аллелю из каждого из двух локусов DRB1 и DQB1 – это DRB1*01-DQA1*0101, DRB1*16(02)-DQA1*0102, DRB1*03-DQA1*0501, DRB1*04-DQA1*0301, DRB1*12(05)-DQA1*0501, DRB1*13(06)-DQA1*0103, DRB1*07-DQA1*0201 и DRB1*08-DQA1*0401.

Наиболее часто выявлялся и в первой группе больных, и во второй гаплотип DRB1*01-DQA1*0101. Кроме того, у больных ГН с рефрактерным НС было обнаружено 4 дополнительных гаплотипа – DRB1*15(02)-DQA1*0401, DRB1*03-DQA1*0201, DRB1*11(05)-DQA1*0301 и DRB1*14(06)-DQA1*0101, не встречавшиеся в группе сравнения. В последней выявлялся гаплотип

тип DRB1*11(05)-DQA1*0501, который не обнаруживался у больных с рефрактерным НС.

В исследуемых группах пациентов было обнаружено 9 совпадающих вариантов гаплотипов, содержащих по аллелю из следующей пары локусов – DRB1 и DQB1 (табл. 2). Два гаплотипа (DRB1*04-DQB1*0301 и DRB1*07-DQB1*02) выявлялись лишь в группе больных с рефрактерным НС, в то время как другой гаплотип DRB1*12(05)-DQB1*0301 обнаруживался лишь в сравниваемой группе больных.

Изучение сочетаний аллелей локусов DQA1 и DQB1 выявило 6 общих для исследуемых групп пациентов гаплотипов (DQA1*0101-DQB1*0501, DQA1*0102-DQB1*0602-8, DQA1*0103-DQB1*0602-8, DQA1*0201-DQB1*02, DQA1*0301-DQB1*0302 и DQA1*0301-DQB1*0303) и 7 – различающихся, среди которых 4 гаплотипа – DQA1*0102-DQB1*0502/0504, DQA1*0103-DQB1*0305, DQA1*0201-DQB1*0303 и DQA1*0301-DQB1*0301 обнаруживались

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ АССОЦИАЦИЙ АЛЛЕЛЕЙ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ НЕРАВНОВЕСНЫМ СЦЕПЛЕНИЕМ ЛОКУСОВ HLA-DRB1 И -DQA1 У БОЛЬНЫХ ГН С НС

TABLE 1. INDICATORS OF ASSOCIATIONS OF ALLELES WITH POSITIVE NONEQUILIBRIUM COUPLING OF HLA-DRB1 AND -DQA1 LOCI IN PATIENTS WITH NS

HLA-гаплотип HLA-haplotype	Больные ГН с НС / Patients with GN with NS			
	Отсутствие рефрактерности к лечению Lack of refractoriness to treatment n = 78		Рефрактерный НС Refractory NS n = 58	
	D	H	D	H
DRB1*01-DQA1*0101	0,1517***	0,1951 (19,5%)	0,1576***	0,2382 (23,8%)
DRB1*15(02)-DQA1*0102	0,0318*	0,0462	0,0711***	0,096 (9,6%)
DRB1*15(02)-DQA1*0401		–	0,0158*	0,0176 (1,76%)
DRB1*16(02)-DQA1*0102	0,0281***	0,0326 (3,3%)	0,0563***	0,0771 (7,7%)
DRB1*03-DQA1*0201		–	0,0241*	0,0374 (3,7%)
DRB1*03-DQA1*0501	0,101***	0,1362 (13,6%)	0,0609***	0,0716 (7,2%)
DRB1*04-DQA1*0301	0,0837***	0,1043 (10,4%)	0,1238***	0,1452 (14,5%)
DRB1*11(05)-DQA1*0301		–	0,0441***	0,0522 (5,2%)
DRB1*11(05)-DQA1*0501	0,0691***	0,0936	–	–
DRB1*12(05)-DQA1*0501	0,0337**	0,0477 (4,8%)	0,0148*	0,0174 (1,7%)
DRB1*13(06)-DQA1*0103	0,052***	0,0605 (6,1%)	0,0319***	0,0349 (3,5%)
DRB1*14(06)-DQA1*0101		–	0,0261*	0,0366 (3,7%)
DRB1*07-DQA1*0201	0,0853***	0,0932 (9,3%)	0,0953***	0,1187 (11,9%)
DRB1*08-DQA1*0401	0,0122**	0,0124 (1,2%)	0,0171***	0,0174 (1,7%)

Примечание. D – коэффициент неравновесного сцепления аллелей; H – частота гаплотипов, в долях (%); звездочками отмечены уровни статистически значимой неравновесной сцепленности аллелей (D) с рефрактерным НС по двустороннему точному критерию Фишера для четырехпольных таблиц (* – $p_F < 0,05$; ** – $p_F < 0,01$; *** – $p_F < 0,001$).

Note. D, the coefficient of nonequilibrium coupling of alleles; H, the frequency of haplotypes, in fractions (%); asterisks indicate the levels of statistically significant nonequilibrium coupling of alleles (D) with refractory NS according to the two-sided Fisher exact criterion for four-field tables (*, $p_F < 0.05$; **, $p_F < 0.01$; ***, $p_F < 0.001$).

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ АССОЦИАЦИЙ АЛЛЕЛЕЙ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ НЕРАВНОВЕСНЫМ СЦЕПЛЕНИЕМ ЛОКУСОВ HLA-DRB1 И -DQB1 У БОЛЬНЫХ ГН С НС

TABLE 2. INDICATORS OF ASSOCIATIONS OF ALLELES WITH POSITIVE NONEQUILIBRIUM COUPLING OF HLA-DRB1 AND -DQB1 LOCI IN PATIENTS WITH NS

HLA-гаплотип HLA-haplotype	Больные ГН с НС / Patients with GN with NS			
	Отсутствие рефрактерности к лечению Lack of refractoriness to treatment n = 78		Рефрактерный НС Refractory NS n = 58	
	D	H	D	H
DRB1*01-DQB1*0501	0,1387***	0,1783 (17,8%)	0,1671***	0,2347 (23,5%)
DRB1*15(02)-DQB1*0602-8	0,0919***	0,1109 (11,1%)	0,0563***	0,0759 (7,6%)
DRB1*16(02)-DQB1*0502/0504	0,0311***	0,0325 (3,2%)	0,0664***	0,0753 (7,5%)
DRB1*03-DQB1*02	0,1146***	0,1367 (13,7%)	0,0637***	0,0732 (7,3%)
DRB1*04-DQB1*0301		–	0,0467*	0,0657 (6,6%)
DRB1*04-DQB1*0302	0,0333***	0,0392 (3,9%)	0,0452***	0,0524 (5,2%)
DRB1*11(05)-DQB1*0301	0,0784***	0,0943 (9,4%)	0,0463***	0,0535 (5,3%)
DRB1*12(05)-DQB1*0301	0,0382***	0,0473 (4,7%)	–	
DRB1*13(06)-DQB1*0602-8	0,049***	0,0679 (6,8%)	0,0563***	0,0727 (7,3%)
DRB1*07-DQB1*02		–	0,0548***	0,0715 (7,1%)
DRB1*08-DQB1*0401/0402	0,0122**	0,0124 (1,2%)	0,0171***	0,0174 (1,7%)
DRB1*09-DQB1*0303	0,0596***	0,0666 (6,7%)	0,0161*	0,0173 (1,7%)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ АССОЦИАЦИЙ АЛЛЕЛЕЙ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ НЕРАВНОВЕСНЫМ СЦЕПЛЕНИЕМ ЛОКУСОВ HLA-DQA1 И – DQB1 У БОЛЬНЫХ ГН С НС

TABLE 3. INDICATORS OF ASSOCIATIONS OF ALLELES WITH POSITIVE NONEQUILIBRIUM COUPLING OF HLA-DQA1 AND – DQB1 LOCI IN PATIENTS WITH NS

HLA-гаплотип HLA-haplotype	Больные ГН с НС / Patients with GN with NS			
	Отсутствие рефрактерности к лечению Lack of refractoriness to treatment n = 78		Рефрактерный НС Refractory NS n = 58	
	D	H	D	H
DQA1*0101-DQB1*0501	0,1517***	0,1951	0,1576***	0,2382
DQA1*0102-DQB1*0502/0504		–	0,0563***	0,0811
DQA1*0102-DQB1*0602-8	0,0619***	0,0882	0,0952***	0,1408
DQA1*0103-DQB1*0305		–	0,0168*	0,0171
DQA1*0103-DQB1*0602-8	0,062***	0,0775	0,0299**	0,0331
DQA1*0201-DQB1*02	0,0308*	0,0462	0,0374***	0,064
DQA1*0201-DQB1*0303		–	0,0441***	0,0574
DQA1*0301-DQB1*0301		–	0,0645***	0,0859
DQA1*0301-DQB1*0302	0,0393***	0,0484	0,0441***	0,0522
DQA1*0301-DQB1*0303	0,056***	0,0756	0,0384*	0,0491
DQA1*0301-DQB1*0305	0,0279**	0,0336		–
DQA1*0501-DQB1*02	0,1056***	0,1531		–
DQA1*0501-DQB1*0301	0,0965***	0,1458		–

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

в группе пациентов с рефрактерным НС, но не в сравняемой группе, а 3 гаплотипа (DQA1*0301-DQB1*0305, DQA1*0501-DQB1*02, DQA1*0501-DQB1*0301) — лишь в группе пациентов с НС, не рефрактерным к лечению (табл. 3).

С целью изучения связи рефрактерного НС с обнаруженными гаплотипами были определены величины ОР. Наибольшее значение ОР было характерно для гаплотипа DRB1*11(05)-DQA1*0301. При этом его величина была значительно больше 1 и составляла 42,1 ($p_F = 0,005$). Следовательно, наличие в генотипе пациента гаплотипа DRB1*11(05)-DQA1*0301 повышает риск развития рефрактерного НС в 42,1 раза. Другим статистически значимым было значение ОР у гаплотипа DRB1*15(02)-DQB1*0602-8, равнявшееся 0,2 ($p_F = 0,004$). Дробное значение данного показателя свидетельствует об отрицательной связи рассматриваемого гаплотипа с рефрактерным НС. Реципрокное значение ОР составило 5, указывая на то, что наличие в генотипе пациента сочетания аллелей DRB1*15(02)-DQB1*0602-8 уменьшает риск возникновения рефрактерности к лечению в 5 раз. ОР остальных гаплотипов были статистически не значимыми.

Из литературы известно об ассоциации развития МНП с гаплотипом DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 [9]. Данный гаплотип увеличивает риск развития и других аутоиммунных заболеваний [10]. Однако результаты исследования, проведенные в японской популяции, свидетельствуют об ассоциации МНП с другим гаплотипом — DRB1*15:01—HLA-DQB1*06:02 [13]. При обследовании детей афроамериканского происхождения и детей из Южной Азии была установлена связь развития стероидчувствительного НС с гаплотипом DQA1*0201-DQB1*0201-DRB1*0701 [2]. В индийской популяции аллелем предрасположенности к развитию стероидчувствительного НС у детей оказался гаплотип DRB1*07-DQB1*02 [8]. Приведенные данные доказывают, что ГН с НС являются HLA-ассоциированными заболеваниями, HLA-маркеры которых имеют этнические различия. Механизмы участия HLA в развитии ГН с НС, как и любой другой аутоиммунной патологии, до конца не расшифрованы. Полагают, что молекулы, кодируемые генами HLA класса II, как известно, контролирующие процессинг и/или презентацию антигенов в адаптивном иммунном ответе, в условиях присутствия дополнительных

факторов (например, мутация структурных или регуляторных белков подоцитов) или определенных триггеров окружающей среды, могут обуславливать синтез специфических аутоантител, вызывающих заболевание [11]. В приведенных выше исследованиях авторы отмечали, что HLA-гаплотипы, ассоциированные с риском развития МНП, не влияли на чувствительность/рефрактерность НС к проводимой терапии ГКС, функциональное состояние почек и выживаемость пациентов в течение периода наблюдения [13].

Результаты настоящего исследования позволили установить, что два HLA-гаплотипа ассоциированы с развитием ГН с рефрактерным НС, один из которых (DRB1*11(05)-DQA1*0301) повышает риск развития рефрактерного НС, а другой (DRB1*15(02)-DQB1*0602-8) — снижает. В связи с полученными результатами заслуживают внимания данные Magistroni R. и соавт. о том, что аллель DQB1*06:02 снижает риск развития сахарного диабета типа 1, принадлежащего к ряду аутоиммунных заболеваний [6]. Протективные свойства обнаружены и у аллеля DRB1*15(02) при системной красной волчанке [16]. Однако результаты ранее проведенного нами исследования не указывали на связь данных аллелей с рефрактерным НС [1], в то время как результаты настоящего исследования свидетельствуют о снижении риска развития рефрактерного НС при сочетанной представленности в HLA-генотипе пациента аллелей DRB1*15(02) и DQB1*0602-8 в составе одного гаплотипа. Предполагают, что протективные гаплотипы предотвращают развитие аутоиммунной патологии или за счет блокирования HLA-специфичностей, обуславливающих развитие аутоиммунной патологии, или путем индукции Т-регуляторных клеток (Treg), способных блокировать эффекторные Т-клетки [15].

Заключение

В результате проведенного исследования обнаружены в HLA-генотипе лиц чувашской популяции гаплотип DRB1*11(05)-DQA1*0301, повышающий в 42,1 раза риск развития рефрактерного НС, и протективный гаплотип DRB1*15(02)-DQB1*0602-8, снижающий риск возникновения рефрактерности НС к иммуносупрессивной терапии в 5 раз.

Список литературы / References

1. Кудряшов С.И., Стенина М.А., Карзакова Л.М., Соколова Е.В., Кузина О.В. HLA-Ассоциации гломерулонефритов с рефрактерным нефротическим синдромом // Современные проблемы науки и образования, 2023. № 6. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=33113>. [Kudryashov S.I., Stenina M.A., Karzakova L.M., Sokolova E.V., Kuzina O.V. HLA-associations of glomerulonephritises with refractory nephrotic syndrome. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2023, no. 6. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=33113>. (In Russ.)]
2. Adeyemo A., Esezobor C., Solarin A., Abeyagunawardena A., Kari J.A., El Desoky S., Greenbaum L.A., Kamel M., Kallash M., Silva C., Young A., Hunley T.E., de Jesus-Gonzalez N., Srivastava T., Gbadegesin R. HLA-DQA1 and APOL1 as risk loci for childhood-onset steroid-sensitive and steroid-resistant nephrotic syndrome. *Am. J. Kidney Dis.*, 2018, Vol. 71, no. 3, pp. 399-406.
3. Bao L., Li J., Hu S., Wu X. Association between the HLA-DQA1 rs2187668 polymorphism and risk of idiopathic membranous nephropathy: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2018, Vol. 97, no. 44, e13031. doi: 10.1097/MD.00000000000013031.
4. Bierzynska A., McCarthy H. J., Soderquest K., Sen E.S., Colby E., Ding W.Y., Nabhan M.M., Kerecuk L., Hegde S., Hughes D., Marks S., Feather S., Jones C., Webb N.J., Ognjanovic M., Christian M., Gilbert R.D., Sinha M.D., Lord G.M., Simpson M., Koziell A.B., Welsh G.I., Saleem M.A. Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management. *Kidney Int.*, Vol. 91, no. 4, pp. 937-947.
5. Gbadegesin R.A., Adeyemo A., Webb N.J., Greenbaum L.A., Abeyagunawardena A., Thalagahagoda S., Kale A., Gipson D., Srivastava T., Lin J.J., Chand D., Hunley T.E., Brophy P.D., Bagga A., Sinha A., Rheault M.N., Ghali J., Nicholls K., Abraham E., Janjua H.S., Omolaja A., Barletta G.M., Cai Y., Milford D.D., O'Brien C., Awan A., Belostotsky V., Smoyer W.E., Homstad A., Hall G., Wu G., Nagaraj S., Wigfall D., Foreman J., Winn M.P. Mid-West pediatric nephrology consortium. HLA-DQA1 and PLCG2 are candidate risk loci for childhood-onset steroid-sensitive nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2015, Vol. 26, no. 7, pp. 1701-1710.
6. Magistroni R., D'Agati V.D., Appel G.B., Kiryluk K. New developments in the genetics, pathogenesis, and therapy of IgA nephropathy. *Kidney Int.*, 2015, Vol. 88, no. 5, pp. 974-989.
7. Piazza A., Mattiuz P.L., Richiardi P. A computer program library for a tissue typing laboratory. *Tissue Antigens*, 1972, Vol. 2, no. 2, pp. 156-162.
8. Ramanathan A.S., Senguttuvan P., Chinniah R., Vijayan M., Thirunavukkarasu M., Raju K., Mani D., Ravi P.M., Rajendran P., Krishnan J.I., Karuppiiah B. Association of HLA-DR/DQ alleles and haplotypes with nephrotic syndrome. *Nephrology (Carlton)*, 2016, Vol. 21, no. 9, pp. 745-752.
9. Sekula P., Li Y., Stanescu H.C., Wuttke M., Ekici A.B., Bockenhauer D., Walz G., Powis S.H., Kielstein J.T., Brenchley P.; GCKD Investigators; Eckardt K.U., Kronenberg F., Kleta R., Köttgen A. Genetic risk variants for membranous nephropathy: extension of and association with other chronic kidney disease aetiologies. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2017, Vol. 32, no. 2, pp. 325-332.
10. Singh G., Singh U., Singh S.K., Singh S. Immunogenetic study of diabetes mellitus in relation to HLA DQ and DR. *Indian J. Endocrinol. Metab.*, 2020, Vol. 24, no. 4, pp. 325-332.
11. Stanescu H.C., Arcos-Burgos M., Medlar A., Bockenhauer D., Kottgen A., Dragomirescu L., Voinescu C., Patel N., Pearce K., Hubank M., Stephens H.A., Laundry V., Padmanabhan S., Zawadzka A., Hofstra J.M., Coenen M.J., den Heijer M., Kiemeny L.A., Bacq-Daian D., Stengel B., Powis S.H., Brenchley P., Feehally J., Rees A.J., Debiec H., Wetzels J.F., Ronco P., Mathieson P.W., Kleta R. Risk HLA-DQA1 and PLA(2)R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *N. Engl. J. Med.*, 2011, Vol. 364, no. 7, pp. 616-626.
12. Svejgaard A., Jersild C., Nielsen L.S., Bodmer W.F. HL-A antigens and disease. Statistical and genetical considerations. *Tissue Antigens*, 1974, Vol. 4, no. 2, pp. 95-105.
13. Thiri M., Honda K., Kashiwase K., Mabuchi A., Suzuki H., Watanabe K., Nakayama M., Watanabe T., Doi K., Tokunaga K., Noiri E. High-density association mapping and interaction analysis of PLA2R1 and HLA regions with idiopathic membranous nephropathy in Japanese. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 9, no. 6, 38189. doi: 10.1038/srep38189.
14. Wang H.Y., Cui Z., Xie L.J., Zhang L.J., Pei Z.Y., Chen F.J., Qu Z., Huang J., Zhang Y.M., Wang X., Wang F., Meng L.Q., Cheng X.Y., Liu G., Zhou X.J., Zhang H., Debiec H., Ronco P., Zhao M.H. HLA class II alleles differing by a single amino acid associate with clinical phenotype and outcome in patients with primary membranous nephropathy. *Kidney Int.*, 2018, Vol. 94, no. 5, pp. 974-982.

15. Wen X., Yang J., James E., Chow I.T., Reijonen H., Kwok W.W. Increased islet antigen-specific regulatory and effector CD4+ T cells in healthy individuals with the type 1 diabetes-protective haplotype. *Sci. Immunol.*, 2020, Vol. 5, eaax8767.doi: 10.1126/sciimmunol.aax8767.

16. Zhang J., Ai R., Chow F. The polymorphism of HLA-DR and TNF B loci in northern Chinese Han nationality and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Chin. Med. Sci. J.*, 1997, Vol. 12, no. 2, pp. 107-110.

Авторы:

Кудряшов С.И. — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

Карзакова Л.М. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

Authors:

Kudryashov S.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases with the Course of Clinical Immunology, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

Karzakova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Internal Diseases with the Course of Clinical Immunology, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

Поступила 01.04.2024
Отправлена на доработку 03.04.2024
Принята к печати 12.04.2024

Received 01.04.2024
Revision received 03.04.2024
Accepted 12.04.2024

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN α -2b И IFN α -2b В СОЧЕТАНИИ С γ -D-ГЛУТАМИЛ-L-ТРИПТОФАНом ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНУСИТЕ С СОПУТСТВУЮЩЕЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Безрукова Е.В.¹, Варюшина Е.А.², Афлитонов М.А.³,
Артюшкин С.А.¹, Симбирцев А.С.⁴

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»,
Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального
медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Известные методы лечения хронического полипозного риносинусита не оказывают существенного влияния на прогрессивный характер течения заболевания. В последнее время проводится разработка и внедрение антицитокиновой терапии. Однако высокая стоимость препаратов и сложность их производства делает необходимостью поиск других средств, обладающих схожими механизмами действия. Такими иммуномодулирующими препаратами могут быть рекомбинантный IFN α -2b и дипептид γ -D-глутамил-L-триптофан. Цель исследования — изучение механизма действия и оценка эффективности локального применения IFN α -2b и γ -D-глутамил-L-триптофана при полипозном риносинусите с сопутствующей бронхиальной астмой. Пациентам первой группы (31 человек) в течение пяти дней в полипозную ткань вводили IFN α -2b в дозе 1 млн ЕД. Пациентам второй группы (31 человек) в течение пяти дней в полипозную ткань вводили IFN α -2b в дозе 1 млн ЕД и γ -D-глутамил-L-триптофаном в дозе 0,1 мг. Пациенты наблюдались в течение года. До лечения, через 1, 6 и 12 месяцев выполняли цитологическое исследование слизистой оболочки носа с определением среднего показателя деструкции и индекса цитолиза эпителиоцитов, среднего цитохимического коэффициента

Адрес для переписки:

Безрукова Евгения Валерьевна
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный
медицинский университет имени И.И. Мечникова»
195067, Россия, Санкт-Петербург,
Пискаревский пр., 47.
Тел.: 8 (921) 759-07-88.
E-mail: ban_@mail.ru

Address for correspondence:

Evgeniya V. Bezrukova
I. Mechnikov North-Western State Medical University
47 Piskarevsky Ave
St. Petersburg
195067 Russian Federation
Phone: +7 (921) 759-07-88.
E-mail: ban_@mail.ru

Образец цитирования:

Е.В. Безрукова, Е.А. Варюшина, М.А. Афлитонов,
С.А. Артюшкин, А.С. Симбирцев «Клиническая
эффективность и механизм действия рекомбинантного
IFN α -2b и IFN α -2b в сочетании с γ -D-глутамил-
L-триптофаном при хроническом полипозном
риносинусите с сопутствующей бронхиальной астмой»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 4.
С. 861-872. doi: 10.15789/1563-0625-CEA-16692

© Безрукова Е.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.V. Bezrukova, E.A. Varyushina, M.A. Aflitonov,
S.A. Artyushkin, A.S. Simbirtsev "Clinical efficacy and
mechanism-of-action of recombinant IFN α -2b, and IFN α -2b
in combination with γ -D-glutamyl-L-tryptophan, in chronic
polypous rhinosinusitis with comorbid bronchial asthma",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 4, pp. 861-872.
doi: 10.15789/1563-0625-CEA-16692

© Bezrukova E.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-CEA-16692

ента, оценку состояния тиол-дисульфидной системы слизистой оболочки носа, анализировали клинические симптомы (размер полипозной ткани, затруднение носового дыхания, отечность слизистой оболочки носа), также до лечения и через 1 месяц после проведения иммуотропного лечения была выполнена биопсия полипозной ткани с анализом морфологических изменений. Локальное введение в полипозную ткань IFN α -2b и сочетания IFN α -2b с дипептидом γ -D-глутамил-L-триптофаном вызывает снижение активности T2 воспаления, что подтверждается морфологическими изменениями слизистой оболочки полипозной ткани: уменьшение межклеточного отека, уплотнение ткани, снижение числа лимфоцитов, эозинофилов, плазмоцитов, инфильтрирующих собственную пластинку слизистой оболочки полипозной ткани. Через месяц после проведенной терапии размер полипозной ткани уменьшился, причем при применении рекомбинантного IFN α -2b в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном размер полипов уменьшился примерно на 70%, а применение только рекомбинантного IFN α -2b на 40%. Через 6 месяцев наблюдалось увеличение полипозной ткани на 10-20% по сравнению со значениями, которые были через 1 месяц. Через год рост полипов остался на уровне значений, полученных через 6 месяцев. Применение как IFN α -2b, так и сочетания IFN α -2b с дипептидом γ -D-глутамил-L-триптофаном является патогенетически обоснованным лечением полипозного риносинусита, что позволяет его использовать в качестве консервативной терапии данного заболевания.

Ключевые слова: рекомбинантный IFN α -2b, γ -D-глутамил-L-триптофан, хронический полипозный риносинусит, бронхиальная астма, средний цитохимический коэффициент, тиолдисульфидный коэффициент, средний показатель деструкции, индекс цитолиза клеток

CLINICAL EFFICACY AND MECHANISM-OF-ACTION OF RECOMBINANT IFN α -2b, AND IFN α -2b IN COMBINATION WITH γ -D-GLUTAMYL-L-TRYPTOPHAN, IN CHRONIC POLYPOUS RHINOSINUSITIS WITH COMORBID BRONCHIAL ASTHMA

Bezrukova E.V.^a, Varyushina E.A.^b, Aflitonov M.A.^c, Artyushkin S.A.^a, Simbirtsev A.S.^d

^a I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

^c Leningrad Regional Clinical Hospital, St. Petersburg, Russian Federation

^d State Research Institute of High Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Known methods of treating chronic polypous rhinosinusitis do not have a significant effect on the progressive nature of the disease. Recently, anticytokine therapy has been developed and introduced. However, the high cost of drugs and the complexity of their production make it necessary to search for other drugs with similar mechanisms of action. Such immunotropic drugs can be recombinant IFN α -2b and the γ -D-glutamyl-L-tryptophan. The aim of the study is to study the mechanism of action and evaluate the effectiveness of local application of IFN α -2b and γ -D-glutamyl-L-tryptophan in chronic polypous rhinosinusitis with concomitant bronchial asthma. Patients of the first group (31 people) were injected with IFN α -2b at a dose of 1 million units into the polypous tissue for five days. Patients of the second group (31 people) were injected with IFN α -2b at a dose of 1 million units and γ -D-glutamyl-L-tryptophan at a dose of 0.1 mg into the polypous tissue for five days. Patients were observed for a year. Before treatment and 1 month after treatment, a biopsy of polypous tissue was performed with analysis of morphological changes. Local administration of IFN α -2b and its combination with the γ -D-glutamyl-L-tryptophan into polypous tissue causes a decrease in the activity of T2 inflammation: decreased intercellular edema, tissue compaction, decreased the number of lymphocytes, eosinophils,

plasma cells infiltrating the mucous membrane of polypous tissue. An analysis of the study results based on an assessment of the size of polyps showed that a month after therapy, the size of the polyps decreased, and when using IFN α -2b with γ -D-glutamyl-L-tryptophan, the size of the polyps decreased by approximately 70%, and the use only recombinant IFN α -2b by 40%. After 6 months, there was an increase in polyp tissue by 10-20% compared to the values after 1 month. After a year, the growth of polyps remained at the level of the values obtained after 6 months. The use of both IFN α -2b, and its combination with the γ -D-glutamyl-L-tryptophan, is a pathogenetically substantiated method of treating chronic polyposis rhinosinusitis, which allows its use as a conservative therapy for this disease.

Keywords: recombinant IFN α -2b, γ -D-glutamyl-L-tryptophan, chronic polypous rhinosinusitis, bronchial asthma, average cytochemical coefficient, thiol disulfide coefficient, average destruction index, cell cytolysis index

Список использованных сокращений

ИЦК — индекс цитолиза клеток; СПД — средний показатель деструкции; СЦК — средний цитохимический показатель катионных белков; ТДК — тиолдисульфидный коэффициент; ХПРС — хронический полипозный риносинусит; ХПРС + БА — хронический полипозный риносинусит с бронхиальной астмой; IL — интерлейкин; TARC — тимус-ассоциированный регуляторный хемокин; ILC2 — лимфоидные клетки врожденного иммунитета второго типа; IFN — интерферон; TGF- β — трансформирующий фактор роста.

Введение

Хронический полипозный риносинусит (ХПРС) определяется как хронический риносинусит с эндоскопически подтвержденными назальными полипами. Полипы представляют собой отечные воспалительные разрастания эпителия слизистой оболочки околоносовых пазух, которые проникают в полость носа через соустья пазух, тем самым затрудняя носовое дыхание пациента. По различным оценкам, распространенность ХПРС в мире составляет 2-4%. В России, по данным эпидемиологических исследований, количество таких пациентов может составлять около 1 млн 500 тыс. человек [3, 4, 7].

Согласно современным представлениям, ХПРС считается системным заболеванием, возникающим вследствие сложных взаимодействий между факторами со стороны организма пациента (функциональные и структурные нарушения эпителиальных белков, недостаточность защитных протеаз, антимикробных белков, нарушение переноса ионов, воды, гормональные изменения) и факторами окружающей среды (микробы, вирусы, грибы, поллютанты). Вышеописанные факторы приводят к активации иммунного ответа и развитию хронической воспалительной реакции [1].

Воспалительный процесс при ХПРС часто ассоциирован с Т2-иммунным ответом, протекающим по эозинофильному типу (Т2-ХПРС) [1, 8, 11, 13]. Как правило, пациенты с Т2-ХПРС страдают бронхиальной астмой (БА), аллергическим ринитом, аллергическим дерматитом или аспирином-индуцированными респираторными заболеваниями. У пациентов с Т2-ХПРС в тканях полипов нередко обнаруживаются повышенные, по сравнению со здоровой популяцией, уровни цитокинов и хемокинов, представляющих медиаторы Т2-воспаления — интерлейкин-4 (IL-4), IL-5, IL-13, эотаксин-3 и тимус-ассоциированный регуляторный хемокин (TARC). Кроме того, у них также регистрируется увеличение количества клеток, характерных для Т2-воспаления, — лимфоидных клеток врожденного иммунитета второго типа (ILC2), эозинофилов, тучных клеток и M2-макрофагов [8, 12].

Стандартная терапия ХПРС основана на местном или системном использовании кортикостероидов, антибиотиков, эндоскопической хирургии пазух [5]. Однако применение этих методов лечения не оказывает существенного влияния на прогрессивный характер течения ХПРС.

В последнее время разработка и внедрение консервативного лечения Т2-ХПРС проводится в области антицитокиновой терапии [2, 11]. Однако высокая стоимость и сложность производства делает необходимостью поиск других средств, обладающих схожими механизмами действия. Одним из способов снижения выраженности длительного локального воспалительного процесса является применение различных классов иммуномодулирующих препаратов [10, 15]. Такими препаратами могут стать цитокины, в частности IFN и дипептид γ -D-глутамил-L-триптофан. Вместе с тем, механизм их действия у больных ХПРС недостаточно изучен.

Основанием применения рекомбинантного IFN α -2b для терапии ХПРС является не толь-

ко его известная антипролиферативная активность, но и выраженное иммуномодулирующее действие. Известно, что интерферон- α (IFN α) переключает T2 путь иммунного ответа на T1 за счет ингибирования фактора транскрипции GATA-3 [10]. Sousa J.C. и соавт. обнаружили, что воздействие IFN α на культуры клеток эозинофильных полипов значительно снижает концентрацию IL-4 в тканях [15]. В другом исследовании было показано, что IFN α ингибирует экспрессию генов IL-5, IL-13 [13]. Кроме того, под влиянием IFN α значительно увеличивается уровень цитокинов Th1-профиля: IL-10, IFN γ и IL-6 [15]. Как было продемонстрировано ранее, γ -D-глутамил-L-триптофана обладает стимулирующей активностью по отношению к реакциям клеточного и гуморального иммунитета, процессам регенерации клеток и улучшения клеточного метаболизма, нормализации количества Т-хелперов, Т-супрессоров и их соотношений [6]. Данные свойства γ -D-глутамил-L-триптофана послужили основанием для его применения в терапии ХПРС. Однако клиническая эффективность данных препаратов при хроническом полипозном процессе ранее не изучалась.

В связи с этим **целью нашего исследования** является изучение механизма действия и оценка эффективности локального применения рекомбинантного IFN α -2b и γ -D-глутамил-L-триптофана при ХПРС в сочетании с бронхиальной астмой.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 62 пациента в возрасте от 18 и старше с диагнозом ХПРС в сочетании с бронхиальной астмой (ХПРС+БА). Со всеми пациентами было подписано письменное информированное согласие на участие в исследовании. Пациенты были разделены на две группы. Первой группе (31 человек) в течение пяти дней в полипозную ткань вводили IFN α -2b в дозе 1 млн ЕД. Пациентам второй группы (31 человек) в течение пяти дней в полипозную ткань вводили IFN α -2b в дозе 1 млн ЕД и γ -D-глутамил-L-триптофан в дозе 0,1 мг. Пациенты наблюдались в течение года. До лечения, через 1, 6 и 12 месяцев выполняли цитологическое исследование слизистой оболочки носа и проводили оценку состояния тиол-дисульфидной системы слизистой оболочки носа. До лечения и через 1 месяц после проведения иммуностропного лечения была выполнена биопсия полипозной ткани. Биопсийный материал фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина с последующим заключением в парафиновые блоки. Па-

рафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, азур-эозином II и пикрофуксином по Ван Гизону. Микроскопию срезов проводили под микроскопом (Leika M320) при увеличении $\times 125$, $\times 250$, $\times 400$. В срезах оценивали качественный и количественный состав воспалительного инфильтрата в пяти полях зрения с анализом значений медиан и квартилей (Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)).

Носовой секрет со слизистой оболочки нижней носовой раковины собирали цитологической щеточкой и наносили на предметные стекла. После фиксации метанолом мазки окрашивали по Романовскому–Гимза. Для определения биоцидного потенциала нейтрофильных гранулоцитов слизистой оболочки носа мазки высушивали, фиксировали спиртом и окрашивали спиртовым раствором прочного зеленого и азуром II. Микроскопию мазков проводили под световым микроскопом (Leika M320) с использованием масляной иммерсии при увеличении $\times 1000$ (окуляр 10 $\times$ объектив 100). Степень деструкции эпителиальных клеток оценивали согласно классификации Л.А. Матвеевой (1986). В исследовании использовали 2 параметра, характеризующего структурные нарушения реснитчатых клеток: средний показатель деструкции (СПД) и индекса цитолиза клеток (ИЦК). Содержание катионных белков в гранулоцитах определяли полуколичественным способом по формуле: $СЦК = (3a + 2b + 1c + 0r) / n$ (4), где: СЦК – средний цитохимический показатель катионных белков: а – гранулы занимают всю цитоплазму клетки, б – гранулы занимают $\frac{3}{4}$ части цитоплазмы, в – единичные гранулы, г – отсутствие гранул, n – количество подсчитанных клеток в препарате.

Антиоксидантный статус оценивали по содержанию сульфгидрильных (-SH-) и дисульфидных (-S-S-) групп в назальных секретах с помощью амперометрического титрования нитратом серебра по I. Kolthoff и W. Harris, модифицированного В.В. Соколовским (1996). Определение выполняли на анализаторе тиоловых антиоксидантов («АТА-1»). Количественной характеристикой соотношения -SH/-SS- является тиолдисульфидный коэффициент – ТДК. Для определения референтных значений изучаемых показателей СПД, ИЦК, СЦК, ТДК были получены мазки и назальные секреты от практически здоровых людей (38 человек).

При клиническом обследовании выраженность отека носовых раковин оценивали в баллах: 0 баллов – отсутствие отека нижних и средних носовых раковин, 1 балл – закрытие 1/3 просвета общего носового хода, 2 балла – закрытие половины просвета общего носового хода и 3 бал-

ла — полное закрытие просвета общего носового хода [7, 8]. Объем полипозной ткани выражали в баллах: 0 баллов — отсутствие полипов, 1 балл — полипы в среднем носовом ходе, 2 балла — полипы выходят за пределы среднего носового хода, 3 балла — полипы выходят за пределы среднего носового хода, но не блокируют общий носовой ход, 4 балла — полипы полностью закрывают носовой ход (баллы с одной и другой половины носа суммировались) [8]. Для оценки симптома затруднение носового дыхания использовали визуальную аналоговую шкалу (ВАШ), предложенную Европейским обществом ринологов в согласительном документе EPOS 2020.

Анализ результатов проводили с помощью методов описательной статистики, однофакторного рангового дисперсионного анализа по Краскелу—Уоллису (для независимых групп) и по Фридману (для зависимых переменных).

Результаты и обсуждение

На основе цитологического метода исследования были получены следующие результаты. До лечения СПД и ИЦК однородно ($p = 0,54$ и $p = 0,08$) статистически значимо снижен в обеих группах по сравнению со значениями практически здоровых людей ($p < 0,001$). На фоне местного применения рекомбинантного IFN α -2b и его сочетания с γ -D-глутамил-L-триптофаном через 1 месяц наблюдалось снижение показателей деструкции эпителиальных клеток слизистой оболочки носа (рис. 1А). При этом СПД достиг уровня практически здоровых лиц ($p = 0,40$ и $p = 0,21$). ИЦК значимо снизился в обеих группах и достиг уровня здоровых лиц в случае применения сочетания рекомбинантного IFN α -2b с γ -D-глутамил-L-триптофаном $p = 0,34$ (рис. 1Б).

При изучении влияния препаратов на состояние нейтрофильных гранулоцитов слизистой оболочки носа, продемонстрировано (рис. 1Г), что до лечения наблюдали однородное снижение СЦК нейтрофилов ($p = 0,90$). Через месяц после проведенной терапии было получено значимое увеличение СЦК ($p < 0,001$) в обеих группах, причем применение рекомбинантного IFN α -2b в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном способствовало достижению уровня значений практически здоровых лиц. Через 6 месяцев СЦК снизился примерно на 14% и через год значения вернулись к исходному уровню.

До лечения у пациентов обеих групп выявлено однородное ($p = 0,59$) статистически значимое снижение ТДК по сравнению со значениями практически здоровых лиц ($p < 0,001$). В результате применения иммунотропной терапии

выявлено значимое увеличение ТДК через месяц наблюдения в обеих группах, это означает уравнивание окислительных и восстановительных процессов и позволяет говорить об антиоксидантных свойствах изучаемых препаратов (рис. 1В). Однако стоит отметить, что ТДК не достиг уровня практически здоровых людей, что связано, вероятно, с небольшой продолжительностью применения данного лечения, что не позволило в полной мере вывести слизистую оболочку из состояния хронического оксидативного стресса. Так же как и другие показатели, ТДК через 6 месяцев и через год снизился, однако уровня до лечения не достиг.

Исследование морфологических изменений полипозной ткани после введения в нее иммунотропных средств показало следующие результаты. До лечения полипозная ткань характеризовалась дистрофическими изменениями покровного эпителия различной степени выраженности. Начальные дистрофические изменения проявлялись нечеткостью апикальной поверхности эпителиоцитов. В других участках слизистой оболочки наблюдали более глубокие изменения: отрыв апикальной поверхности реснитчатых клеток, их полное отторжение с сохранением только одного ряда базальных клеток с формированием «голых ядер», вплоть до полного отрыва клеток эпителия и оголения базальной мембраны. В собственном слое слизистой оболочки выявляли изменения, характерные для длительно текущего воспалительного процесса: увеличение объема слизистой оболочки с формированием полипообразных выростов, инфильтрация эозинофилами, плазмócитами и лимфоцитами, отек межклеточных пространств. Клеточная инфильтрация собственного слоя слизистой оболочки полипозной ткани носила очаговый характер, преимущественно в подэпителиальной и периваскулярных областях.

Результаты морфологического исследования полипозной ткани после введения сочетания IFN α -2b с γ -D-глутамил-L-триптофаном показали, что, по сравнению с морфологической картиной полипозной ткани пациентов до лечения, отмечается уменьшение межтканевого отека и уплотнение волокон собственной пластинки слизистой оболочки, уменьшение количества инфильтрирующих эозинофилов и плазмócитов, уплотнение хроматина в ядрах плазматических клеток, что свидетельствует о снижении активности воспаления и процессов ремоделирования слизистой оболочки.

В таблице 1 представлены изменения количества клеток, инфильтрирующих полипозную ткань: нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов, плазмócитов у больных ХПРС в зависимости от

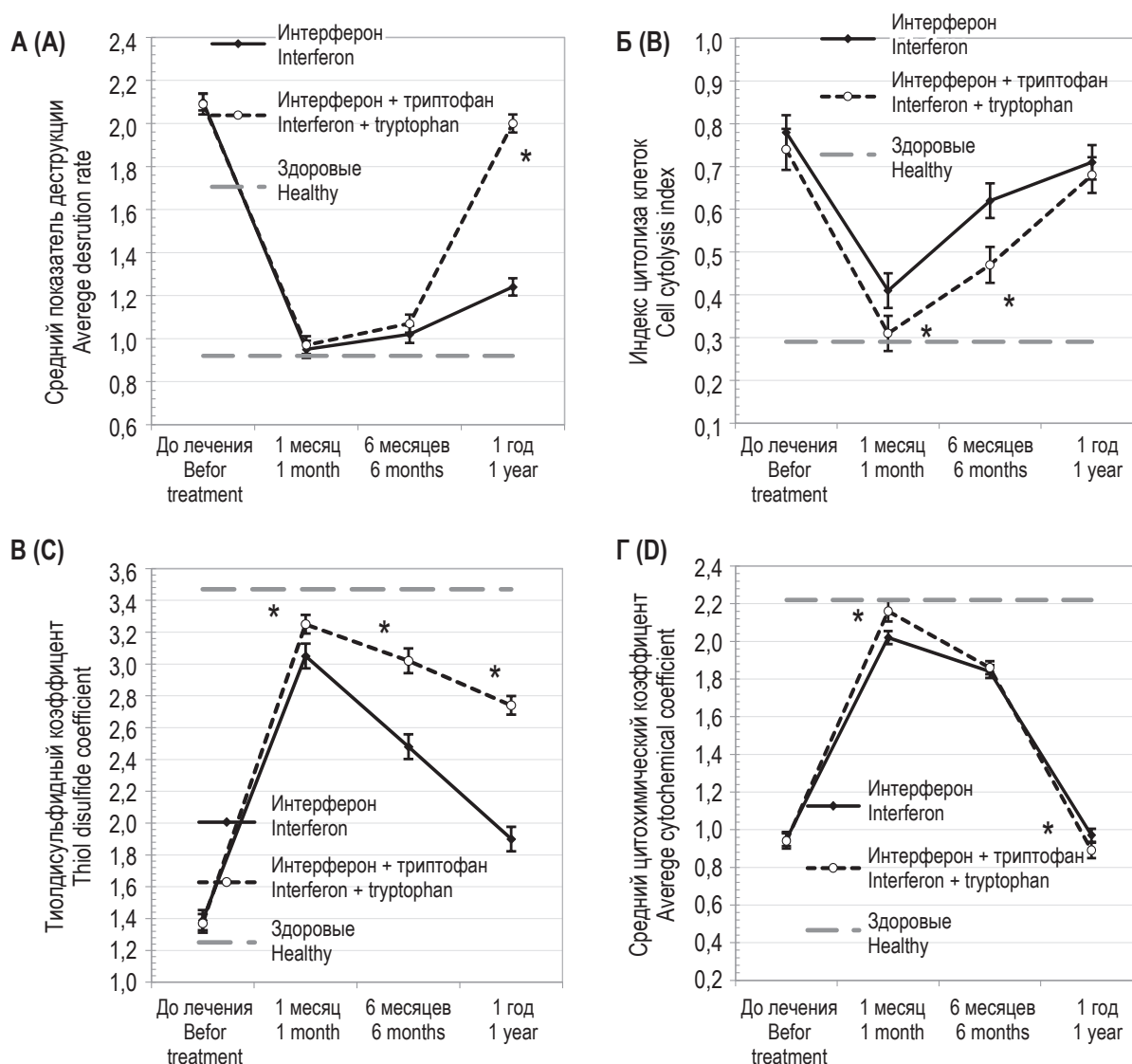


Рисунок 1. Динамика среднего показателя деструкции (А) и индекса цитолиза эпителиальных клеток (Б), тиолдисульфидного коэффициента (В), среднего цитохимического коэффициента (Г) у больных хроническим полипозным риносинуситом при различных способах и сроках лечения

Примечание. Среднее; отрезок: 95% доверительный интервал. * – $p < 0.001$ при сравнении с лечением интерфероном.

Figure 1. Dynamics of the average destruction rate (A) and the cytotoxicity index of epithelial cells (B), thiol-disulfide coefficient (C), average cytochemical coefficient (D) in patients with chronic polypous rhinosinusitis with various methods and terms of treatment

Note. Average; intercept: 95% confidence interval. *, $p < 0.001$ when compared with interferon treatment.

вида иммуностимулирующей терапии. До лечения в обеих группах выявлены изменения: преобладающим количеством клеток были лимфоциты – от 52 до 78 клеток, в практически равном количестве определялись плазматические и эозинофилы – от 9 до 27 клеток, самыми малочисленными были нейтрофилы – от 0 до 5 клеток в пяти полях зрения. Применение рекомбинантного IFN α -2b в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном способствовало снижению субэпителиальной и периваскулярной инфильтрации лимфоцитами в

2,9 раза, плазматическими клетками примерно в 2 раза, эозинофилами в 5 раз по сравнению с уровнем до лечения ($p < 0,01$). Применение рекомбинантного IFN α -2b способствовало значимому снижению количества эозинофилов как в периваскулярной, так и субэпителиальной области в 4 раза, снижение лимфоцитов отмечалось только в периваскулярной области ($p = 0,0021$), на инфильтрацию плазматическими клетками значимого влияния оказано не было. Этот эффект можно объяснить тем, что IFN α ингибирует

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА НЕЙТРОФИЛОВ, ЭОЗИНОФИЛОВ, ЛИМФОЦИТОВ, ПЛАЗМОЦИТОВ В ПОДСЛИЗИСТОМ СЛОЕ ПОЛИПОЗНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ ХПРС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДА ИММУНОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. QUANTITY CHANGE OF NEUTROPHILS, EOSINOPHILS, LYMPHOCYTES, PLASMOCYTES IN THE SUBMUCOSAL LAYER OF POLYPOSIS TISSUE IN PATIENTS WITH CHRONIC RHINOSINUSITIS WITH NASAL POLYPS (CRSWNP) DEPENDING ON THE TYPE OF IMMUNOTHERAPY, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Parameter	Лечение Treatment		p
	Интерферон Interferon	Интерферон + триптофан Interferon + tryptophan	
Инфильтрация субэпителиально лимфоциты Subepithelial lymphocyte infiltration			
До лечения Before treatment	64 (52-75)	70 (59-78)	0,30
После лечения After treatment	59 (50-73)	24 (20-29)	< 0,001
	0,0074	< 0,001	
Инфильтрация периваскулярно лимфоциты Perivascular lymphocyte infiltration			
До лечения Before treatment	73 (65-84)	75 (66-83)	0,60
После лечения After treatment	64 (51-73)	26 (22-29)	< 0,001
	0,0021	0,000001	
Инфильтрация субэпителиально эозинофилы Subepithelial eosinophil infiltration			
До лечения Before treatment	16 (9-18)	15 (10-19)	0,33
После лечения After treatment	4 (2-6)	3 (2-6)	0,45
	< 0,001	< 0,001	
Инфильтрация периваскулярно эозинофилы Perivascular eosinophils infiltration			
До лечения Before treatment	17 (7-26)	18 (8-27)	0,18
После лечения After treatment	3 (2-6)	4 (2-6)	0,68
	< 0,001	< 0,001	
Инфильтрация субэпителиально плазмоциты Subepithelial plasmocyte infiltration			
До лечения Before treatment	25 (19-32)	22 (13-30)	0,37
После лечения After treatment	25 (18-30)	11 (8-16)	< 0,001
	0,64	< 0,001	

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатель Parameter	Лечение Treatment		p
	Интерферон Interferon	Интерферон + триптофан Interferon + tryptophan	
Инфильтрация периваскулярно плазмоциты Perivascular plasmocyte infiltration			
До лечения Before treatment	16 (9-24)	16 (10-27)	0,71
После лечения After treatment	23 (18-33)	7 (5-9)	< 0,001
	0,049	< 0,001	
Инфильтрация субэпителиально нейтрофилы Subepithelial neutrophils infiltration			
До лечения Before treatment	3 (1-5)	1 (0-2)	< 0,001
После лечения After treatment	3 (1-5)	1 (0-2)	< 0,001
	0,53	0,65	
Инфильтрация периваскулярно нейтрофилы Perivascular neutrophils infiltration			
До лечения Before treatment	3 (2-5)	2 (0-3)	0,0060
После лечения After treatment	3 (1-5)	1 (0-3)	0,0021
	0,84	0,34	

локальную экспрессию генов IL-5 и IL-4, цитокинов, участвующих в миграции, пролиферации, активации и выживании эозинофилов, а дополнение γ -D-глутамил-L-триптофаном способствует усилению процессов переключения иммунного ответа на T1-иммунный ответ, что проявляется уменьшением количества плазматических клеток и лимфоцитов [10, 15].

Сочетание рекомбинантного IFN α -2b с γ -D-глутамил-L-триптофаном также вызывает повышение противовоспалительного эффекта за счет снижения активности провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12) и увеличения активности противовоспалительного цитокина – трансформирующего фактора роста (TGF- β), что приводит к уменьшению межклеточного отека и уплотнению тканей. Кроме того, γ -D-глутамил-L-триптофан способствует стимуляции дифференцировки и пролиферации предшественников Т-лимфоцитов, продукции IL-2 и IFN γ [6].

Результаты динамики клинических показателей у пациентов с ХПРС + БА в зависимости от терапии показывают, что до начала лечения

значимых различий в клинической симптоматике пациентов исследуемых групп не обнаружено (рис. 2А). Следовательно, группы пациентов достаточно однородны по степени тяжести заболевания, что позволяет корректно анализировать изменения клинических симптомов заболевания на фоне применения терапии.

Оценка эндоназальных полипов показала, что через месяц после проведенной терапии объем полипозной ткани уменьшился, причем при применении рекомбинантного IFN α -2b в сочетании с γ -D-глутамил-L-триптофаном размер полипов уменьшился примерно на 70%, а при использовании только рекомбинантного IFN α -2b на 40% ($p < 0,001$). Через 6 месяцев наблюдалось увеличение полипозной ткани на 10-20% по сравнению со значениями, которые были через 1 месяц. Через год рост полипов остался на уровне значений, полученных через 6 месяцев (рис. 2А).

Симптом затруднение носового дыхания через месяц после лечения снизился практически одинаково в обеих группах примерно на 80%. Через 6 месяцев и через год пациенты стали отме-

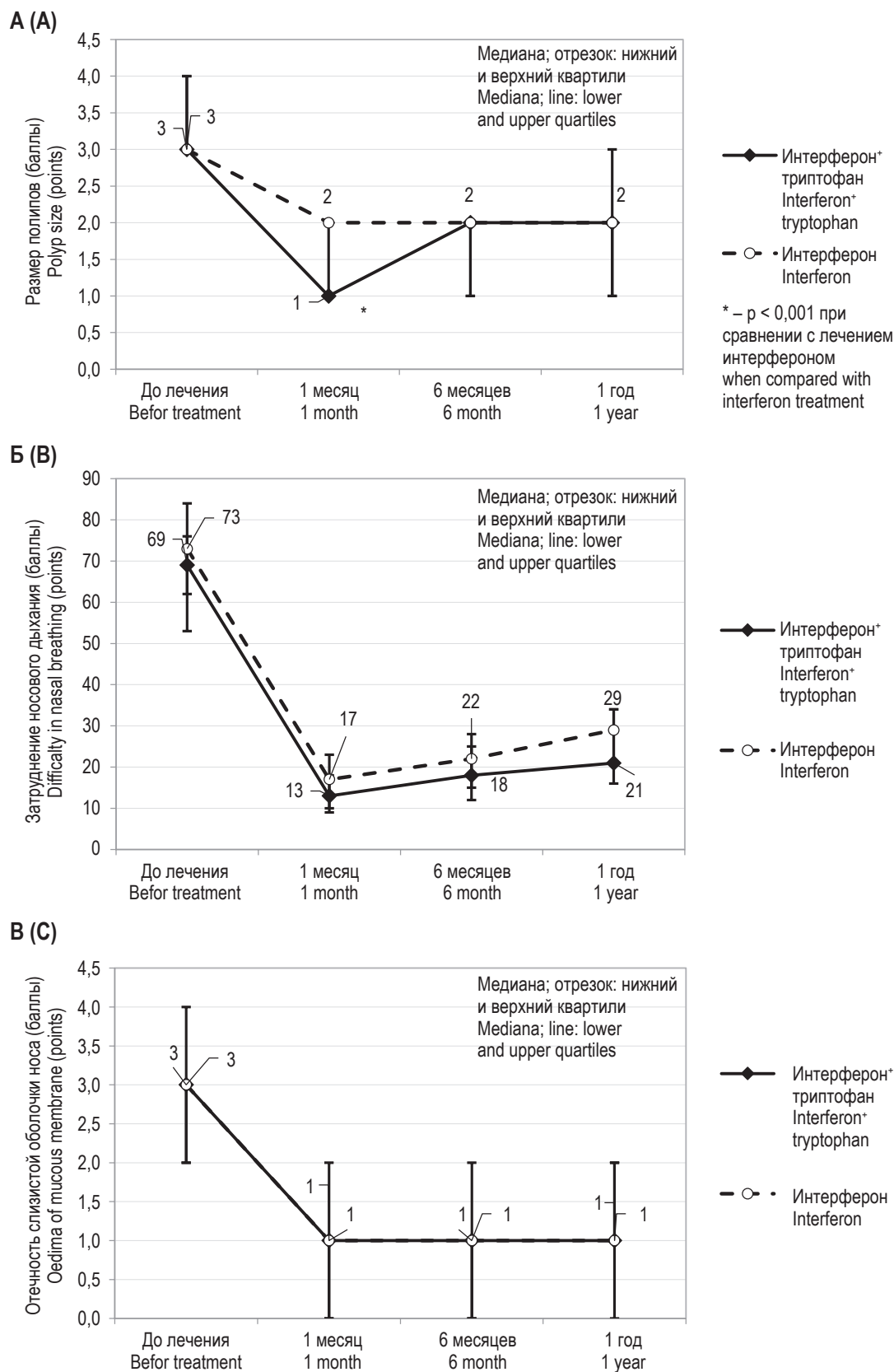


Рисунок 2. Динамика клинических симптомов (А, Б, В) Т2-хронического полипозного риносинусита в зависимости от применяемого лечения в виде Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Figure 2. Dynamics of clinical symptoms (A, B, C) of T2-chronic polyposis rhinosinusitis depending on the treatment used in the form Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

чать ухудшение носового дыхания примерно на 10% (рис. 2Б).

Симптом отечность слизистой оболочки носа через 1 месяц значительно уменьшился на 75% по сравнению со значениями до лечения и сохранялся на этом уровне в течение года (рис. 2В).

Интерфероны благодаря своему иммуномодулирующему, противовирусному и антипролиферативному действию широко используются для лечения различных хронических заболеваний, включая рассеянный склероз, вирус гепатита С и некоторые виды рака. Они также входят в терапевтический арсенал эозинофильных заболеваний, таких как идиопатический гиперэозинофильный синдром, являясь вариантом лечения в случаях, рефрактерных к кортикотерапии или вместе с ней для снижения дозы кортикостероидов [9].

Полученные нами результаты демонстрируют, что локальное введение в полипозную ткань IFN α -2b и сочетания IFN α -2b с дипептидом γ -D-глутамил-L-триптофаном вызывает снижение активности T2-воспаления. Это подтверждается морфологическими изменениями слизистой оболочки полипозной ткани: уменьшением межклеточного отека, уплотнением ткани, а также снижением числа лимфоцитов, эозинофилов, плазмочитов, инфильтрирующих собственную пластинку слизистой оболочки полипозной ткани. Надо отметить, что наиболее выраженные положительные изменения отмечали при введении сочетания IFN α -2b с дипептидом γ -D-глутамил-L-триптофаном, что говорит о том, что

γ -D-глутамил-L-триптофан усиливает действие рекомбинантного IFN α -2b.

Противовоспалительное действие иммунотропных средств проявляется и в том, что в течение месяца значительно уменьшается выраженность дистрофических процессов слизистой оболочки полости носа, что усиливает процессы восстановления ее барьерной функции, повышает антимикробную функцию нейтрофильных гранулоцитов слизистой оболочки носа и снижает активность оксидативного стресса. Однако через 6 месяцев и через год снова наблюдается рост показателей деструкции как СПД, так и ИЦК, снижение СЦК и ТДК, что свидетельствует о том, что иммунотропная терапия должна быть более продолжительной, и о необходимости повторения курсов данной терапии. Полученные результаты подтверждаются значительным уменьшением выраженности основных симптомов заболевания: размера эндоназальных полипов и отечности слизистой оболочки носа, улучшением носового дыхания.

Заключение

Таким образом, применение как IFN α -2b, так и сочетания IFN α -2b с γ -D-глутамил-L-триптофаном является патогенетически обоснованным способом лечения хронического полипозного риносинусита, что позволяет его использовать в качестве консервативной терапии данного заболевания. Наиболее выраженные эффекты отмечали при введении сочетания IFN α -2b с γ -D-глутамил-L-триптофаном.

Список литературы / References

1. Моисеева Ю.П., Пискунов Г.З. Развитие персонализированного подхода в лечении полипозного риносинусита // Вестник оториноларингологии, 2022. Т. 87, № 3. С. 40-45. [Moiseeva Yu.P., Piskunov G.Z. The development of a personalized approach in the treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2022, Vol. 87, no. 3, pp. 40-45. (In Russ.)]
2. Моисеева Ю.П., Пискунов Г.З. Биологическая терапия – новые возможности лечения T2-индуцированного полипозного риносинусита // Фармакология & Фармакотерапия, 2022. № S1. С. 44-47. [Moiseeva Yu.P., Piskunov G.Z. Biological therapy – new possibilities for the treatment of T2-induced chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Farmakologiya & Farmakoterapiya = Pharmacology & Pharmacotherapy*, 2022, no. 1 (Special Issue), pp. 44-47. (In Russ.)]
3. Пискунов Г.З. Клинические фенотипы полипозного риносинусита // Российская ринология, 2019. Т. 27, № 4. С. 224-231. [Piskunov G.Z. Clinical phenotypes of polyposis rhinosinusitis. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2019, Vol. 27, no. 4, pp. 224-231. (In Russ.)]
4. Рязанцев С.В., Будковская М.А., Артемьева Е.С., Хамгушкева Н.Н. Полипозный риносинусит: основные аспекты противорецидивной терапии и восстановления носового дыхания // Медицинский совет, 2019. № 20. С. 13-18. [Ryazantsev S.V., Budkovskaya M.A., Artemieva E.S., Khamgushkeeva N.N. Rhinosinusitis with nasal polyps: main aspects of anti-relapse therapy and recovery of nasal breathing. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2019, no. 20, pp. 13-18. (In Russ.)]
5. Савлевич Е.Л., Егоров В.И., Шачнев К.Н., Татаренко Н.Г. Анализ схем лечения полипозного риносинусита в Российской Федерации // Российская оториноларингология, 2019. Т. 18, № 1 (98). С. 124-135.

[Savlevich E.L., Egorov V.I., Shachnev K.N., Tatarenko N.G. The analysis of polypous rhinosinusitis treatment regimens in the Russian Federation. *Rossiiskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 124-134. (In Russ.)]

6. Шабалдина Е.В., Шабалдин А.В., Михайленко В.А., Колобов А.А., Рязанцев С.В., Симбирцев А.С. Особенности динамики цитокинов назального секрета при локальном воздействии иммуномодулятора гамма-D-глутамил-L-триптофана (Бестим) на слизистую оболочку детей раннего и дошкольного возраста с гипертрофией миндалин лимфоидного глоточного кольца // Российская оториноларингология, 2013. № 2 (63). С. 89-96. [Shabaldina E.V., Shabaldin A.V., Mikhaylenko V.A., Kolobov A.A., Ryazantsev S.V., Simbirtsev A.S. Features of changes in secret of nose at local influence of an immunomodulator of gamma-D-glutamyl-L-tryptophan (Bestim) on a mucous membrane of a nose of children of early and preschool age with a hypertrophy of almonds of a lymphoid pharyngeal ring. *Rossiiskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2013, no. 2 (63), pp. 89-96. (In Russ.)]

7. Bachert C., Bhattacharyya N., Desrosiers M., Khan A.H. Burden of disease in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Asthma Allergy*, 2021, no. 14, pp. 127-134.

8. Fokkens W.J., Viskens A.S., Backer V., Conti D., de Corso E., Gevaert P., Scadding G.K., Wagemann M., Bernal-Sprekelsen M., Chaker A., Heffler E., Han J.K., van Staeyen E., Hopkins C., Mullol J., Peters A., Reitsma S., Senior B.A., Hellings P.W. EPOS/EUFOREA update on indication and evaluation of Biologics in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps 2023. *Rhinology*, 2023, Vol. 61, no. 3, pp. 194-202.

9. Gotlib J. World health Organization-defined eosinophilic disorders: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am. J. Hematol.*, 2015, no. 90, pp. 1077-1089.

10. Huber J.P., Gonzales-van Horn S.R., Roybal K.T., Gill M.A., Farrar J.D. IFN- α suppresses GATA3 transcription from a distal exon and promotes H3K27 trimethylation of the CNS-1 enhancer in human Th2 cells. *J. Immunol.*, 2014, no. 192, pp. 5687-5694.

11. Laidlaw T.M., Menzies-Gow A., Caveney S., Han J.K., Martin N., Israel E., Lee J.K., Llanos J.P., Martin N., Megally A., Parikh B., Vong S., Welte T., Corren J. Tezepelumab efficacy in patients with severe, uncontrolled asthma with comorbid nasal polyps in NAVIGATOR. *J. Asthma Allergy*, 2023, no. 16, pp. 915-932.

12. Laidlaw T.M., Mullol J., Woessner K.M., Amin N., Mannent L.P. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2021, Vol. 9, no. 3, pp. 1133-1141.

13. Radabaugh J.P., Han J.K., Moebus R.G., Somers E., Lam K. Analysis of histopathological endotyping for chronic rhinosinusitis phenotypes based on comorbid asthma and allergic rhinitis. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2019, Vol. 33, no. 5, pp. 507-512.

14. Sousa J.C., Etchbehere R.M., Rodovalho Alves E.A., Stark L.M., Murta E.F.C., Michelin M.A. Interferon- α action in cytokine profile in eosinophilic nasal polyp cultures. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, 2021, Vol. 87, Iss. 3, pp. 260-268.

Авторы:

Безрукова Е.В. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Варюшина Е.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Bezrukova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Otorhinolaryngology Department, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Varyushina E.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Vector Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Афлитонов М.А. — к.м.н., заведующий отделением оториноларингологии ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница», Санкт-Петербург, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, научный руководитель ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Артюшкин С.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оториноларингологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Aflitonov M.A., PhD (Medicine), Head, Otorhinolaryngology Department, Leningrad Regional Clinical Hospital, St. Petersburg, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Director, State Research Institute of High Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Artyushkin S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Otorhinolaryngology Department, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 28.03.2024

Отправлена на доработку 31.03.2024

Принята к печати 01.04.2024

Received 28.03.2024

Revision received 31.03.2024

Accepted 01.04.2024

Абакумова Т.В.	795	Иванов А.М.	843	Пирмамедова С.С.	795
Абдрахимова А.Р.	717	Иванченко И.А.	795	Полосков В.В.	663
Аникаева М.С.	807	Илькович М.М.	755	Попкова Т.В.	765, 771
Антонеева И.И.	795	Кадагидзе З.Г.	819	Попова Н.А.	677
Аристова Т.А.	801	Калинина Н.М.	843	Пуртова С.К.	685
Артемяева О.В.	711	Карзакова Л.М.	853	Пухальская Т.В.	693, 827
Артюшкин С.А.	861	Каширина Е.И.	733	Рудик Д.В.	717
Афлитонов М.А.	861	Кирилкин Г.Э.	843	Сагакянц А.Б.	835
Афоничева К.В.	727	Кириллова И.Г.	765	Сангидорж Б.	741
Баранова О.П.	755	Коваленко А.Л.	663	Сапожников А.М.	657
Баторов Е.В.	801	Коваленко И.Л.	677	Сахно Л.В.	649
Безрукова Е.В.	861	Козлов И.Г.	777	Свищевская Е.В.	733
Бережанский П.В.	741	Колосова Е.Д.	827	Сергеев В.Г.	807
Богатырева А.И.	771	Коновалова М.В.	733	Сесь Т.П.	755, 787
Богданова Д.А.	693, 827	Коноплянникова Ю.Е.	777	Симбирцев А.С.	861
Богданов Е.Ю.	663	Корнеев К.В.	701, 813	Симонова А.В.	813
Богомолова Э.А.	813	Костенко В.В.	657	Смагин Д.А.	677
Бойко А.А.	657	Коцарева О.Д.	733	Смольникова М.В.	727
Борунова А.А.	819	Кудрявцев И.В.	755	Стасевич Е.М.	701, 813
Будкина Н.А.	827	Кудряшов С.И.	853	Степовая Е.А.	671
Варюшина Е.А.	861	Кузьминова Е.П.	717	Суетина И.А.	663
Владимирова Л.Ю.	835	Кузьмич Е.В.	717	Сухина И.А.	843
Высоких М.Ю.	685	Купраш Д.В.	701	Татаурщикова Н.С.	741
Галеева Е.В.	777	Лазарева Н.М.	755	Терещенко С.Ю.	727
Галямина А.Г.	677	Лазаренко Л.Л.	787	Тишина А.В.	835
Ганковская Л.В.	711	Луговая А.В.	843	Толстолуцкая Т.О.	807
Генинг С.О.	795	Лукьянова С.О.	711	Тотоян Арег А.	755
Генинг Т.П.	795	Макарова А.О.	733	Тувшинбаяр Б.	741
Герасимова Д.А.	771	Максимова А.А.	649	Уварова А.Н.	701, 813
Герасимова Е.В.	765, 771	Марченко И.В.	727	Ускова Т.Р.	741
Гильдеева Г.Н.	777	Матушевская Е.В.	733	Устюгова А.С.	701
Глебездина Н.С.	749	Мезенцева М.В.	663	Ушакова Г.Ю.	801
Горшкова Е.А.	685	Минеев В.Н.	707	Фаттахова Г.В.	733
Гречихина М.В.	657	Митрейкин В.Ф.	843	Федякина И.Т.	663
Давыдова Н.В.	777	Михайловская В.С.	693	Хамаганова Е.Г.	717
Дворянинова Е.М.	685	Молочникова О.В.	777	Цветнов А.В.	663
Демидов О.Н.	693, 827	Муркина Р.Г.	707	Черткова А.И.	819
Демин Д.Э.	813	Наровлянский А.Н.	663	Шалыгина М.В.	765
Денисова В.В.	801	Насаева Е.Д.	711	Шатилова А.А.	827
Долгова Д.Р.	795	Недоспасов С.А.	685	Швец О.В.	777
Ершов Ф.И.	663	Никитин Ю.В.	843	Шевела Е.Я.	649
Жеремян Э.А.	701, 813	Носарева О.Л.	671	Шелипова А.А.	787
Забиров С.Ш.	843	Нёма М.А.	707	Шиндяпин В.В.	827
Заботина Т.Н.	819	Овсяникова О.В.	657	Шоуа И.Б.	819
Зимин С.Б.	777	Окара П.С.	733	Эльгухари А.С.	755
Зиновьева Н.В.	777	Павлова И.Е.	717	Юракова Т.Р.	693
Златник Е.Ю.	835	Петрова Ю.В.	777		

активация моноцитов.....	765	макрофаг-подобные клетки.....	664	фиброз.....	756
аллели.....	718	макрофаги.....	650	фиколин.....	728
аллерген-специфическая		макрофаги костного мозга.....	685	флуоресцентная визуализация.....	657
иммунотерапия.....	742	миелоидные супрессорные		хемокины.....	836
аллергические заболевания.....	742	клетки.....	801	хронический полипозный	
аллергический ринит.....	742	микроокружение опухоли.....	694, 820	риносинусит.....	862
аллергия на куриные яйца.....	734	митохондрии.....	771	хронический социальный стресс..	678
антифиброгенная активность.....	650	множественная миелома.....	801	Циклоферон.....	664
апоптоз.....	672, 678, 828	моноциты.....	771	цитокины.....	678, 836
аргиназа-1.....	685	мультиплексный анализ.....	836	цитометрия.....	820
астма.....	728	мышы.....	678	экспрессия генов.....	678, 712
асцит.....	796	мышы линии NSG-SGM3.....	828	экспрессия генов TLR/RLR.....	664
аутоиммунитет.....	771	мышинная модель аллергии.....	734	энхансерная РНК.....	814
аутоиммунные заболевания.....	750	наивные Т-лимфоциты.....	778	эРНК.....	814
аутоиммунные осложнения.....	778	нейропептид S100B.....	844	2D-культуры.....	657
аутофагия.....	844	некодирующая РНК.....	814	3D-культуры.....	657
биомаркер.....	756	нефротический синдром.....	853	Akt1.....	678
биомаркеры аутофагии.....	844	окислительная модификация		В-лимфоциты.....	702
биомаркеры нейровоспаления.....	844	белков.....	672	В-хронический лимфолейкоз.....	808
болезнь Гужеро–Хейли–Хейли.....	788	острый ишемический инсульт.....	844	Beclin-1.....	844
бронхиальная астма.....	707, 742	острый миелоидный лейкоз.....	828	CD20 ⁺ Т-лимфоциты.....	750
бронхиальная астма.....	862	переключающиеся В-клетки		del22q11.2.....	778
бутионинсульфоксимин.....	672	памяти.....	778	G-белок.....	707
венетоклакс.....	828	плазмаферез.....	788	Gal d.....	734
внутривенные иммуноглобулины..	788	полимеразная цепная реакция		HLA-гаплотипы.....	853
воспаление.....	771	в реальном времени.....	664	HLA-типирование.....	718
воспалительное старение.....	712	полиморфизм.....	707, 712	HLA.....	718
генетическая		поляризация макрофагов.....	685	IFN γ	750
предрасположенность.....	788	постишемическое		Hsp70.....	657
генетический анализатор.....	718	нейровоспаление.....	844	IgE.....	734
генетический полиморфизм.....	728	провоспалительные		IL-1 β	765
гены.....	678, 718	цитокины.....	765, 844	IL-4.....	685, 828
гены гистосовместимости		р62.....	844	IL-8.....	796
человека.....	853	рак молочной железы.....	657, 820	IL-10.....	702
гипоталамус.....	678	рак поджелудочной железы.....	657	IL-17A.....	750, 756
гликозилирование.....	808	рак яичников.....	796	in vitro.....	694
глиобластома.....	814	рассеянный склероз.....	750	Jak2.....	678
гломерулонефриты.....	853	ревматоидный артрит.....	765	KRAS-мутация.....	836
голый землекоп.....	685	регуляция транскрипции.....	702	LC3.....	844
гранулема.....	756	редокс-статус клетки.....	672	LINC00910.....	814
гранулоцитарный		рекомбинантный IFN α -2b.....	862	NO-синтаза.....	685
колониестимулирующий фактор..	801	рефрактерность к терапии.....	853	p21cip1.....	694
дети.....	728	рецидивы нефротического		PD-1.....	801
ДНК.....	771	синдрома.....	853	RNA-seq.....	678
доброкачественная семейная		РНК-интерференция.....	814	SASP.....	694
пузырчатка.....	788	саркоидоз.....	756	SNP.....	702
долголетие.....	712	секвенирование нового		Stat3.....	678, 814
заболеваемость.....	742	поколения.....	718	Т-клетки.....	801
иммунная дисрегуляция.....	788	сенесцентные клетки.....	694	Т-регуляторные клетки.....	756
иммунная тромбоцитопения.....	778	сигнальный путь.....	796	Т-хелперы 17-го типа.....	756
иммуносупрессия.....	702	синдром Ди Джорджи.....	778	TAMs.....	694
иммунофенотип.....	820	синдром Леффрена.....	756	TAS2R38.....	707
индекс цитолиза клеток.....	862	синдром старческой астении.....	712	TAS2R.....	707
индукторы интерферона.....	664	система глутатиона.....	672	TGF- β	702
канцерогенез.....	678	система “quorum sensing”.....	707	Th1.....	750
карцинома простаты.....	657	системная склеродермия.....	771	Th1-поляризованные Th17.....	750
карцинома толстой кишки.....	657	средний показатель деструкции...	862	Th17.....	750
коллаген.....	650	средний цитохимический		TILs.....	820
колоректальный рак.....	836	коэффициент.....	862	TIM-3.....	801
кондиционные среды.....	650	степень тяжести.....	728	TLR2.....	712
конфокальная микроскопия.....	657	строма лимфоузлов.....	808	TNF α	765
ксенографтная модель.....	828	субклинический атеросклероз.....	765	WISP.....	796
лечение препаратами		субпопуляции лимфоцитов.....	820	Wnt/ β -катенин.....	796
моноклональных антител.....	836	тиолдисульфидный		α -гладкомышечный актин.....	650
лимфоузлы.....	808	коэффициент.....	862	γ -D-глутамил-L-триптофан.....	862
лимфоциты.....	778, 808	транзиторные В-клетки.....	778		
лимфоциты крови.....	672	трафик В-клеток.....	734		
локальное переключение		факторы риска.....	742		
В-клеток.....	734	фибробласты.....	650		



Рисунок 1. Веруцкозное поражение кожи

Figure 1. Veruccosis skin lesion



Рисунок 2. Папулосквамозное поражение кожи, период обострения

Figure 2. Papullosquamous skin lesions, stage of exacerbation



Рисунок 3. Эритематозное поражение кожи, стадия затухающего обострения

Figure 3. Erythematous skin lesion, stage of fading exacerbation



Рисунок 4. Хроническая стадия поражения кожи, субремиссия

Figure 4. Chronic stage of skin damage, subresistance



Рисунок 5. Поражения кожи в аксиллярной области, субремиссия

Figure 5. Skin lesions in the axillary region, subremission

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311

