

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

Том 26, № 5. С. 875-1132

2024

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



XV Всероссийская школа по клинической иммунологии

«ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

2 – 8 февраля 2025 года

Пушкинские Горы, Псковская область

Организаторы:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Российская Академия Наук

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга
Администрация Псковской области

ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России
Институт экспериментальной медицины
НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора
Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Российское научное общество иммунологов
Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов
Российское цитокиновое общество
Ассоциация специалистов и организаций
лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»
Санкт-Петербургское региональное отделение Всероссийской Общественной
Организации – Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов

В программе школы:

- Лекции ведущих российских иммунологов
- Лекции зарубежных специалистов
- Семинары по практическим вопросам иммунологии

Пакет слушателя включает:

- Посещение лекций и семинаров
- Проживание
- 3-разовое питание
- Трансфер Псков – Пушкинские Горы и обратно (аэропорт)

**Слушатели, зарегистрированные на сайте НМО www.sovetnmo.ru,
получат зачетные единицы**

Координатор проекта:
*Зам. председателя СПб РО РААКИ,
академик РАН, Тотолян Арег Артемович*
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

Заявки подавать до 1 декабря 2024 года.
Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна
Тел./факс: (812) 644-63-12, e-mail: shkola@spbraaci.ru
Адрес для корреспонденции:
197101, Санкт-Петербург, а/я 130, СПб РО РААКИ

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

сентябрь-октябрь

2024, том 26

№ 5

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

Исполняющий обязанности главного редактора

Тотоян 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@spbraaci.ru

Редактор перевода:
д.м.н. Чухловин А.Б.

Редактор электронной версии:
Ерофеева В.С.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:
197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

Электронная версия: www.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 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 32,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 059

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

Рогенбук 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**

September-October

2024, volume 26

No. 5

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

Acting 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. Chukhlovin, PhD, MD

Online version editorial manager:

Erofeeva V.S.

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

Address for correspondence:

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

Electronic version: www.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 32.25. 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 Immunodiagnosics 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

Шевелева О.Н., Ненашева Т.А., Лядова И.В.

РАННИЕ МАРКЕРЫ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА 883

Алексеева Н.А., Вавилова Ю.Д., Коваленко Е.И.

ПОВЫШЕННЫЙ ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ CD57⁺NKG2C⁺NK-КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ NKG2A 891

Осина Н.К., Волова Л.Т., Лебедев П.А., Шафиева И.А., Пугачев Е.И., Гончаренко С.А., Кузнецов С.И., Гусякова О.А., Светлова Г.Н.

КЛЕТОЧНАЯ ГЕМОТЕСТ-СИСТЕМА IN VITRO ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ИНФЛАММАСОМЫ NLRP3 897

Овсяникова О.В., Шустова О.А., Гречихина М.В., Сапожников А.М.

ПРОТОЧНО-ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К РАЗЛИЧНЫМ ЭПИТОПАМ МОЛЕКУЛЫ БТШ70 С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ И МЕМБРАНО-АССОЦИИРОВАННЫМИ ФОРМАМИ ЭТОГО ПРОТЕИНА 905

Останин А.А., Баторова Д.С., Сизикова С.А., Крукович А.Б.

ЭКСПРЕССИЯ ЧЕК-ПОИНТ-МОЛЕКУЛ ПОПУЛЯЦИЯМИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ 913

Чичерина Н.Р., Горшкова Е.А., Мячев Е.А., Яковлева А.С., Литвинова А.М., Намаканова О.А., Зварцев Р.В., Недоспасов С.А., Друцкая М.С.

МЫШИНАЯ МОДЕЛЬ СВЕРХЭКСПРЕССИИ IL-6 ЧЕЛОВЕКА ТКАНЕРЕЗИДЕНТНЫМИ МАКРОФАГАМИ В КОНТЕКСТЕ LPS-ИНДУЦИРОВАННОГО ВОСПАЛЕНИЯ 919

Матвеева К.С., Рыбцов С.А., Шевырев Д.В.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ И ТРАНСКРИПЦИОННЫХ СИГНАТУР CD8⁺NLA-DR⁺ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ: ПЕРСПЕКТИВЫ В ПОНИМАНИИ СТАРЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ 927

Нижегородова Д.Б., Морозова Н.А., Иванчик Г.И., Кулинич С.С., Колядич Ж.В., Зафранская М.М.

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ И ПРОДУКЦИЯ ИНТЕРФЕРОНОВ I И II ТИПОВ В ЛОКАЛЬНОМ МИКРООКРУЖЕНИИ СИНОНАЗАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ 933

Зубков А.В., Бутова Л.Г., Кузьмина Н.С., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф., Корноухова А.А., Сидоров А.В., Хрейм Уаель Б.В., Кузьменко В.В., Зубкова И.В., Фадеев В.В.

ИММУННЫЙ ОТВЕТ, ФОРМИРУЕМЫЙ ВВЕДЕНИЕМ ТРАНСГЕННЫМ МЫШАМ ДНК-ВЕКТОРА, СОДЕРЖАЩЕГО ФРАГМЕНТ КДНК ГЕНА РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА 941

Краваченко Э.В., Безрукова Е.В., Воробейчиков Е.В., Скворцов Н.В.

ОЦЕНКА ФАРМАКОКИНЕТИКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ ФОРМЫ IFN α И IFN γ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ..... 953

Бурмакина В.В., Вартанова Н.О., Хорева М.В., Городищенская С.В., Авагян А.С., Свитич О.А.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ И МИКРОБИОМА НА УРОВНЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ СТАРЕНИИ..... 961

Арташян О.С., Храмова Ю.С., Власова А.А., Тюменцева Н.В., Юшков Б.Г.

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ КАК ИНДИКАТОРЫ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ЧУЖЕРОДНЫХ ЧАСТИЦ 967

Курмышкина О.В., Куликовская Т.М., Волкова Т.О.

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУННОГО ОТВЕТА ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЖЕНЩИН С ФИБРОАДЕНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 975

Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Устюжанин А.В., Маханёк А.А., Кадочникова П.А., Абакарова Д.А.

ЭКСПРЕССИЯ CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺NLA-DR⁺, CD14⁺CD11b⁺ РЕЦЕПТОРОВ И УРОВЕНЬ IgA, У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ, С К. PNEUMONIAE 983

Ровда Ю.И., Ведерникова А.В., Шабалдин А.В., Филипенко М.Л., Синицкая А.А., Халивопуло И.К., Гришачева Е.О., Отставнов Г.А., Шкитин Я.В., Миняйлова Н.Н., Хоботкова Т.С., Дадонов В.В.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ТРЕС И КРЕС У ДЕТЕЙ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА (ЧЕД – ЧАСТО БОЛЕЮЩИЕ ДЕТИ, ОПЕРИРОВАННЫЕ ДЕТИ ПО ПОВОДУ ВРОЖДЕННОГО ПОРОКА СЕРДЦА С СОЧЕТАННОЙ ТИМЭКТОМИЕЙ, ДЕТИ – БЕЗ ТАКОВОЙ) И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ..... 993

Журавлева Н.С., Кутузова В.И., Алмерзаева М.Р., Минеева Н.Ю., Маслов О.Г.

ГИПОГАММАГЛОБУЛИНЕМИЯ У РЕБЕНКА С АТИПИЧНЫМ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ 1001

Быстрицкая Е.П., Мурашкин Н.Н., Наумова Е.А., Материкин А.И., Солнцева В.К.	
РОЛЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ В ДЕТСКОМ ВОЗРАСТЕ	1009
Радыгина Т.В., Курбатова О.В., Купцова Д.Г., Петричук С.В., Фисенко А.П., Мовсисян Г.Б., Абдуллаева Л.М., Потапов А.С., Мурашкин Н.Н., Парахина Д.В.	
МЕТАБОЛИЗМ ЛИМФОЦИТОВ И УРОВЕНЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ	1017
Ершова Е.С., Жесткова Е.М., Савинова Е.А., Костюк С.Э., Салимова Т.А., Вейко Н.Н.	
ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЙ СТИМУЛИРУЕТ TLR9-NF-κB СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА.....	1025
Чегодаев Е.С., Никифоров Н.Г., Попов М.А., Шумаков Д.В., Зыбин Д.И., Орехов А.Н.	
НАРУШЕНИЯ ТОЛЕРАНТНОСТИ МОНОЦИТОВ-МАКРОФАГОВ К ЛИПОПОЛИСАХАРИДУ У ПАЦИЕНТОВ С КОРОНАРНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ.....	1031
Белоусова А.В., Соколова К.В., Данилова И.Г., Черешнева М.В., Черешнев В.А.	
ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ БЕТА-КЛЕТОК ПРИ РАЗВИТИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА.....	1037
Шмарин В.В., Пухальская Д.А., Красовский С.А., Чудакова Ю.М., Мартынов А.В., Шмарина Г.В.	
ДИНАМИКА МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОБОСТРЕНИЯ БРОНХОЛЕГОЧНОГО ПРОЦЕССА У ПАЦИЕНТОВ С НОРМАЛЬНЫМ И НАРУШЕННЫМ УГЛЕВОДНЫМ ОБМЕНОМ	1045
Чумакова С.П., Денисенко О.А., Уразова О.И., Шипулин В.М., Андреев С.Л., Винс М.В., Гладковская М.В., Дёмин М.С., Дмитриева А.А., Гуломженов А.Г.	
РОЛЬ MСР-1 И SDF-1 В НАРУШЕНИИ МОБИЛИЗАЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА.....	1053
Пронин А.В., Чекнеев С.Б., Николаева Т.Н., Козлов В.В., Кожевникова Т.Н., Вострова Е.И., Григорьева Е.А., Сосновская О.Ю., Сарычева М.А., Востров Ф.В., Наровлянский А.Н., Санин А.В.	
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПОЛИПРЕНИЛФОСФАТА НАТРИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ	1061
Бочкова М.С., Ракутина М.Н., Усанина Д.И., Тимганова В.П., Заморина С.А.	
ВЛИЯНИЕ ПЕГИЛИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ФАГОЦИТАРНУЮ И ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА.....	1071
Пашкина Е.А., Быкова М.В., Беришвили М.Т., Чжан И.М., Козлов В.А.	
ВЛИЯНИЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ С ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ОКСАЛИПЛАТИНА <i>IN VITRO</i>	1079
Чудилова Г.А., Нестерова И.В., Тетерин Ю.В., Мелкоян К.И., Атажахова М.Г., Чапурина В.Н., Чичерев Е.А.	
НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ ВЛИЯНИЙ ЦИТОКИНОВ IL-8, IL-17A, TNFα, IFNγ НА АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩУЮ CD66b⁺CD116⁺CD33⁺HLA-DR⁺ СУБПОПУЛЯЦИЮ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ГЕМАТОГЕННЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ	1085
Блинова Е.А., Ангельская О.А., Козлов В.А.	
ВЛИЯНИЕ IL-7 И БЛОКАДЫ IL-7R НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ	1093
Аколов С.Б., Снежков Е.В., Коновалова М.В., Костромин М.А., Есипов Р.С., Свирицевская Е.В.	
МОДЕЛИ ОПУХОЛИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Pan02, НЕСУЩЕЙ МАРКЕР GFP, НА МЫШАХ	1099
Каганова М.М., Шиловский И.П., Тимотиевич Е.Д., Юмашев К.В., Гурский Д.А., Виноградова К.В., Попова М.В., Хаитов М.Р.	
СИНТЕТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК СПЕЦИФИЧЕСКИ ПОДАВЛЯЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ (IL-25 И TSLP) В ЭКСПЕРИМЕНТАХ <i>IN VITRO</i>.....	1107
Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Черных Е.Р.	
ЭКСПРЕССИЯ TIM-3 НА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ МОНОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....	1115
Эрдынеева Д.Б., Ставская Н.И., Постнов А.Ю.	
МОНОЦИТЫ И МАКРОФАГИ ПЕРЕДАЮТ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ СИГНАЛ ДРУГ ДРУГУ ПОСРЕДСТВОМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ... 1121	
Ширинский И.В., Филатова К.Ю., Ширинский В.С.	
ОСТЕОАРТРИТ, АССОЦИИРОВАННЫЙ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ: РОЛЬ ПОВЫШЕННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ КИШЕЧНИКА И ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ	1127
АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ.....	1131
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	1132

CONTENTS

Short communications

<i>Sheveleva O.N., Nenasheva T.A., Lyadova I.V.</i> EARLY MARKERS OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL HEMATOPOIETIC DEVELOPMENT	883
<i>Alekseeva N.A., Vavilova Yu.D., Kovalenko E.I.</i> INCREASED PROLIFERATIVE RESPONSE OF HIGHLY DIFFERENTIATED CD57⁺NKG2C⁺NK CELLS EXPRESSING NKG2A	891
<i>Ossina N.K., Volova L.T., Lebedev P.A., Shafieva I.A., Pugachev E.I., Goncharenko S.A., Kuznetsov S.I., Gussyakova O.A., Svetlova G.N.</i> CELL-BASED <i>IN VITRO</i> HEMOASSAY FOR EVALUATION OF NLRP3-INFLAMMASOME ACTIVITY	897
<i>Ovsyanikova O.V., Shustova O.A., Grechikhina M.V., Sapozhnikov A.M.</i> FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF THE INTERACTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO VARIOUS EPITOPES OF THE HSP70 MOLECULE WITH INTRACELLULAR AND MEMBRANE-ASSOCIATED FORMS OF THIS PROTEIN	905
<i>Ostanin A.A., Batorova D.S., Sizikova S.A., Krukovich A.B.</i> EXPRESSION OF CHECKPOINT MOLECULES BY REGULATORY T CELLS IN MULTIPLE MYELOMA	913
<i>Chicherina N.R., Gorshkova E.A., Myachev E.A., Yakovleva A.S., Litvinova A.M., Namakanova O.A., Zvartsev R.V., Nedospasov S.A., Druetskaya M.S.</i> A MOUSE MODEL OF OVEREXPRESSION OF HUMAN IL-6 BY TISSUE-RESIDENT MACROPHAGES IN THE CONTEXT OF LPS-INDUCED INFLAMMATION	919
<i>Matveeva K.S., Rybtsov S.A., Shevryev D.V.</i> INVESTIGATING AGE-RELATED DYNAMICS AND TRANSCRIPTIONAL SIGNATURES OF CD8⁺HLA-DR⁺ REGULATORY T LYMPHOCYTES: PERSPECTIVES IN UNDERSTANDING IMMUNE SYSTEM AGING	927
<i>Nizheharodava D.B., Marozava N.A., Ivanchyk G.I., Kulnich S.S., Kolyadich J.V., Zafranskaya M.M.</i> DENDRITIC CELLS AND TYPE I AND II INTERFERON PRODUCTION IN THE LOCAL MICROENVIRONMENT OF SINONASAL TUMORS	933
<i>Zubkov A.V., Butova L.G., Kuzmina N.S., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F., Kornoukhova A.A., Sidorov A.V., Khraim Wael B.V., Kuzmenko V.V., Zubkova I.V., Fadeev V.V.</i> THE IMMUNE RESPONSE FORMED BY THE INTRODUCTION OF A DNA VECTOR CONTAINING A cDNA FRAGMENT OF THE HUMAN THYROID-STIMULATING HORMONE RECEPTOR GENE INTO TRANSGENIC MICE	941
<i>Kravchenko E.V., Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Skvortsov N.V.</i> EVALUATION OF THE PHARMACOKINETICS OF AN EXPERIMENTAL COMBINED FORM OF IFNα AND IFNγ FOR INTRANASAL USE	953
<i>Burmakina V.V., Vartanova N.O., Khoreva M.V., Gorodishchenskaya S.V., Avagyan A.S., Svitich O.A.</i> FEATURES OF THE EXPRESSION OF GENES OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AND THE MICROBIOME AT THE LEVEL OF THE MUCOUS MEMBRANE OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT DURING AGING	961
<i>Artashyan O.S., Khramtsova Yu.S., Vlasova A.A., Tyumentseva N.V., Yushkov B.G.</i> MAST CELLS AS INDICATORS OF FOREIGN PARTICLE BIOCOMPATIBILITY	967
<i>Kurmyshkina O.V., Kulikovskaya T.M., Volkova T.O.</i> EXPRESSION OF IMMUNE CHECKPOINT MARKERS IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF WOMEN WITH FIBROADENOMA OF THE BREAST	975
<i>Chistyakova G.N., Remizova I.I., Ustyuzhanin A.V., Makhanyok A.A., Kadochnikova P.A., Abakarova D.A.</i> EXPRESSION OF CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, CD14⁺CD11b⁺ RECEPTORS AND sIgA LEVEL IN PREMATURE INFANTS WITH <i>K. PNEUMONIAE</i>	983
<i>Rovda Yu.I., Vedernikova A.V., Shabaldin A.V., Filipenko M.L., Sinit'skaya A.A., Khalivopulo I.K., Grishacheva E.O., Otstavnov G.A., Shkitin Ya.V., Minyailova N.N., Khabotkova T.S., Dadonov V.V.</i> COMPARATIVE ANALYSIS OF TREC AND KREC CONCENTRATION LEVELS IN CHILDREN AT MEDICAL AND BIOLOGICAL RISK (CHD – FREQUENTLY ILL CHILDREN, CHILDREN WHO HAVE BEEN OPERATED FOR CONGENITAL HEART DEFECT WITH COMBINED THYMECTOMY, CHILDREN – WITHOUT IT) AND THOSE CONDITIONALLY HEALTHY	993
<i>Zhuravleva N.S., Kutuzova V.I., Almerzaeva M.R., Mineeva N.Yu., Maslov O.G.</i> HYPOGAMMAGLOBULINEMIA IN A CHILD WITH ATYPICAL HEMOLYTIC-UREMIC SYNDROME	1001
<i>Bystritskaia E.P., Murashkin N.N., Naumova E.A., Materikin A.I., Solntseva V.K.</i> THE ROLE OF EPIGENETIC FACTORS IN CHILDHOOD ATOPIC DERMATITIS	1009

Radygina T.V., Kurbatova O.V., Kuptsova D.G., Petrichuk S.V., Fisenko A.P., Movsisyan G.B., Abdullaeva L.M., Potapov A.S., Murashkin N.N., Parakhina D.V.

LYMPHOCYTE METABOLISM AND THE LEVEL OF CIRCULATORY CYTOKINES IN CHILDREN WITH AUTOIMMUNE DISEASE..... 1017

Ershova E.S., Jestkova E.M., Savinova E.A., Kostyuk S.E., Salimova T.A., Veiko N.N.

EXTRACELLULAR DNA FROM THE BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA STIMULATES THE TLR9-NF- κ B SIGNALING PATHWAY IN CULTURED HUMAN LYMPHOCYTES 1025

Chegodayev E.S., Nikiforov N.G., Popov M.A., Shumakov D.V., Zybin D.I., Orekhov A.N.

IMPAIRED TOLERANCE OF MONOCYTE-MACROPHAGES TO LIPOPOLYSACCHARIDE IN PATIENTS WITH CORONARY ATHEROSCLEROSIS 1031

Belousova A.V., Sokolova K.V., Danilova I.G., Chereshneva M.V., Chereshnev V.A.

FEATURES OF BETA CELL DIFFERENTIATION DURING THE DEVELOPMENT OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS..... 1037

Shmarin V.V., Pukhalskaya D.A., Krasovsky S.A., Chudakova Yu.M., Martynov A.V., Shmarina G.V.

DYNAMICS OF INFLAMMATORY MARKERS IN PATIENTS WITH NORMAL AND IMPAIRED GLUCOSE METABOLISM DURING LUNG EXACERBATION TREATMENT 1045

Chumakova S.P., Denisenko O.A., Urazova O.I., Shipulin V.M., Andreev S.L., Vins M.V., Gladkovskaya M.V., Demin M.S., Dmitrieva A.A., Gulomzhenov A.G.

THE ROLE OF MCP-1 AND SDF-1 IN IMPAIRED MOBILIZATION OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS FROM THE BONE MARROW IN CORONARY HEART DISEASE 1053

Pronin A.V., Cheknev S.B., Nikolaeva T.N., Kozlov V.V., Kozhevnikova T.N., Vostrova E.I., Grigorieva E.A., Sosnovskaya O.Yu., Sarycheva M.A., Vostrov A.V., Narovlyansky A.N., Sanin A.V.

IMMUNOBIOLOGICAL EFFICACY OF A NEW SODIUM POLYPRENYL PHOSPHATE BASED MEDICINE FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF EXPERIMENTAL METABOLIC SYNDROME..... 1061

Bochkova M.S., Rakutina M.N., Usanina D.I., Timganova V.P., Zamorina S.A.

INFLUENCE OF PEGYLATED GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON THE RESPIRATORY BURST AND PHAGOCYTIC ACTIVITY OF HUMAN NEUTROPHILS 1071

Pashkina E.A., Bykova M.V., Berishvili M.T., Zhang Y.M., Kozlov V.A.

EFFECT OF A SUPRAMOLECULAR DELIVERY SYSTEM BASED ON HYALURONIC ACID WITH CYCLODEXTRIN ON THE ANTITUMOR PROPERTIES OF OXALIPLATIN *IN VITRO* 1079

Chudilova G.A., Nesterova I.V., Teterin Yu.V., Melkonyan K.I., Atazhakhova M.G., Chapurina V.N., Chicherev E.A.

AMBIGUITY OF THE INFLUENCE OF CYTOKINES IL-8, IL-17A, TNF α , AND IFN γ ON THE ANTIGEN PRESENTING CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ SUBPOPULATION OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN CHILDREN WITH ACUTE HEMATOGENIC OSTEOMYELITIS..... 1085

Blinova E.A., Angelskaya O.A., Kozlov V.A.

EFFECT OF IL-7 AND IL-7R BLOCKADE ON CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD T CELLS FROM PATIENTS WITH PSORIATIC ARTHRITIS 1093

Akopov S.B., Snezhkov E.V., Konovalova M.V., Kostromina M.A., Esipov R.S., Svirshchevskaya E.V.

Pan02 PANCREATIC TUMOR MODELS CARRYING THE GFP MARKER IN MICE 1099

Kaganova M.M., Shilovskiy I.P., Timotievich E.D., Yumashev K.V., Gurskii D.A., Vinogradova K.V., Popova M.V., Khaitov M.R.

SYNTHETIC SMALL INTERFERING RNAs SELECTIVELY SUPPRESS THE EXPRESSION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES (IL-25 AND TSLP) IN EXPERIMENTS *IN VITRO* 1107

Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Chernykh E.R.

TIM-3 EXPRESSION ON MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS 1115

Erdyneeva D.B., Stavskaya N.I., Postnov A.Yu.

MONOCYTES AND MACROPHAGES TRANSMIT INFLAMMATORY SIGNALS TO EACH OTHER VIA EXTRACELLULAR VESICLES 1121

Shirinsky I.V., Filatova E.Yu., Shirinsky V.S.

OSTEOARTHRITIS ASSOCIATED WITH METABOLIC SYNDROME: A ROLE OF INCREASED GUT PERMEABILITY AND CHRONIC INFLAMMATION..... 1127

AUTHOR INDEX..... 1131

SUBJECT INDEX 1132

РАННИЕ МАРКЕРЫ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Шевелева О.Н.¹, Ненашева Т.А.¹, Лядова И.В.^{1,2}

¹ ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский научно-исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Генерация иммунокомпетентных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток является ценной моделью для изучения механизмов регуляции гемопоэза и перспективным подходом к разработке новых методов иммунотерапии различных заболеваний, включая наследственные, онкологические и инфекционные. К настоящему времени показана возможность получения из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека различных клеток иммунной системы, в том числе макрофагов, нейтрофилов, естественных киллеров и Т-лимфоцитов. Однако предложенные протоколы носят в основном экспериментальный характер и для дальнейшего применения требуют оптимизации, стандартизации и масштабирования. Решение этих задач, в свою очередь, требует наличия методов ранней оценки эффективности проводимой дифференцировки. В настоящей работе оценивали возможность использования проточной цитометрии для мониторинга эффективности ранних этапов гемопоэтической дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Гемопоэтическую и миелоидную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека проводили с использованием двух протоколов, предложенных ранее для генерации макрофагов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Используемые протоколы различались по условиям проведения ранних и поздних стадий дифференцировки. Ранние этапы дифференцировки различались по способу индукции образования мезодермальных клеток и гемогенного эндотелия: дифференцировка в условиях 2D с добавлением экзогенных факторов, стимулирующих мезодермальное направление дифференцировки («фактор-зависимый» протокол) или в условиях 3D без добавления экзогенных факторов («спонтанный» протокол). На более поздних стадиях протоколы различались по набору экзогенных факторов, используемых для индукции гемопоэтической и миелоидной спецификации (SCF, FGF2, IL-6, IL-3 и M-CSF или только IL-3 и M-CSF).

Адрес для переписки:

Лядова Ирина Владимировна
ФГБУН «Институт биологии развития имени
Н.К. Кольцова Российской академии наук»
119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, 26.
Тел.: 8 (499) 135-87-80.
E-mail: ivlyadova@mail.ru

Address for correspondence:

Irina V. Lyadova
Koltzov Institute of Developmental Biology,
Russian Academy of Sciences
26 Vavilov St
Moscow
119334 Russian Federation
Phone: +7 (499) 135-87-80.
E-mail: ivlyadova@mail.ru

Образец цитирования:

О.Н. Шевелева, Т.А. Ненашева, И.В. Лядова «Ранние маркеры гемопоэтической дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 883-890. doi: 10.15789/1563-0625-ЕМО-16759

© Шевелева О.Н. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.N. Sheveleva, T.A. Nenasheva, I.V. Lyadova “Early markers of induced pluripotent stem cell hematopoietic development”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 883-890. doi: 10.15789/1563-0625-ЕМО-16759

© Sheveleva O.N. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-ЕМО-16759

В процессе дифференцировки с использованием обоих протоколов проводили анализ экспрессии маркеров мезодермы, гемогенного эндотелия и гемопоэтических клеток (CD309, CD34, CD31, CD43 и CD45). На начальных стадиях дифференцировки основным фенотипическим изменением было появление экспрессии на клетках рецептора к фактору роста эндотелия сосудов CD309, экспрессии сиалофорина CD43, а также антигена CD34. При использовании фактор-зависимого 2D-протокола эти изменения фиксировались раньше и были более выраженными, чем при использовании протокола, основанного на спонтанной дифференцировке клеток в условиях 3D. Полученные результаты позволяют заключить, что определение экспрессии CD309 и/или CD43 может быть использовано для ранней предикции успешности дифференцировки и ПСК в гемопоэтическом направлении.

Ключевые слова: дифференцировка иммунных клеток *in vitro*, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, мезодерма, гемогенный эндотелий, проточная цитометрия, CD309, CD43

EARLY MARKERS OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL HEMATOPOIETIC DEVELOPMENT

Sheveleva O.N.^a, Nenasheva T.A.^a, Lyadova I.V.^{a, b}

^a Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The generation of immune cell populations from induced pluripotent stem cells (iPSCs) is a valuable model to study mechanisms that control hematopoietic development; it also is a promising approach to develop immunotherapeutic strategies to treat various diseases, including hereditary, oncological and infectious ones. To date, it has been demonstrated that iPSCs can differentiate into different immune cells, including macrophages, neutrophils, natural killer cells and T cells. However, the protocols suggested so far are experimental, and they require optimization, standardization and scaling. Solution to these tasks requires methods allowing to predict the efficacy of ongoing differentiation at early differentiation stages. Here, we evaluated whether iPSC hematopoietic/myeloid differentiation can be monitored by means of flow cytometry. Human iPSCs were differentiated into hematopoietic/myeloid cells using two protocols previously suggested for the generation of macrophages from iPSCs. The protocols differed by methods used to induce early and late stages of cell differentiation. At early differentiation stages, the protocols differed by approaches used to induce the generation of mesoderm and hemogenic endothelium, i.e., 2D differentiation in the presence of exogenous factors known to promote mesoderm and hemogenic endothelium development (“factor-dependent” protocol) or 3D differentiation in the absence of exogenous cytokines and growth factors (“spontaneous” protocol). At late differentiation stages, the protocols differed by factors added to the cultures to promote hematopoietic/myeloid specification (i.e., SCF, FGF2, IL-6, IL-3 and M-CSF or only IL-3 and M-CSF). At different stages of differentiation, the expressions of antigens known to be expressed by mesoderm, hemogenic endothelium and hematopoietic cells (i.e., CD309, CD34, CD31, CD43 and CD45) were evaluated. At early differentiation stages, the main phenotypic changes observed in cell cultures were an upregulation of the expression of CD309 (a receptor for vascular endothelial growth factor), the appearance of the expression of sialophorin CD43 and the expression of CD34 antigen. In cells cultured in 2D factor-dependent conditions, these changes appeared earlier and were more pronounced as compared with cells cultured in 3D “spontaneous” conditions. The results suggest that CD309 and/or CD43 are valuable markers for an early prediction of the effectiveness of iPSC differentiation into hematopoietic/myeloid progeny.

Keywords: immune cell differentiation *in vitro*, induced pluripotent stem cells, mesoderm, hemogenic endothelium, flow cytometry, CD309, CD43

Работа поддержана Минобрнауки России № ГЗ 0088-2024-0013.

Введение

Иммунная система играет ключевую роль в поддержании гомеостаза организма, распознавании и элиминации чужеродных антигенов. Нарушение нормального функционирования различных популяций иммунных клеток лежит в основе многих заболеваний, в том числе наследственных, онкологических, инфекционных. Перспективным подходом к коррекции иммунологических нарушений является клеточная иммунотерапия [3, 13]. При этом терапия, основанная на использовании аутологичных или аллогенных клеток (активированных, поляризованных или генетически модифицированных в желаемом направлении), ограничена доступностью, количеством и качеством клеток, которые могут быть получены от доноров и, кроме того, является дорогой и трудоемкой. В связи с этим в последнее время все большее внимание привлекают методы получения иммунных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК). К настоящему времени опубликованы экспериментальные протоколы получения из иПСК естественных киллеров, Т-лимфоцитов, дендритных клеток и макрофагов [2, 6, 7, 9, 12]. Используемые методы основаны на стимуляции дифференцировки иПСК в мезодермальном направлении, индукции образования из мезодермы клеток гемогенного эндотелия с последующей его дифференцировкой в гемопоэтическом направлении и специализации в определенный тип иммунных клеток за счет культивирования в присутствии факторов, ответственных за образование различных линий гемопоэтических и иммунных клеток. При этом имеющиеся методы носят, в основном, экспериментальный характер; их дальнейшее применение требует оптимизации, стандартизации, масштабирования, повышения эффективности «выхода» иммунных клеточных популяций и воспроизводимости результатов. Решение этих задач в значительной степени зависит от наличия методов ранней оценки эффективности проводимой дифференцировки. В настоящей работе оценивали возможность использования проточной цитометрии для мониторинга ранних этапов гемопоэтической дифференцировки иПСК и ранней предикции эффективности проводимой дифференцировки.

Материалы и методы

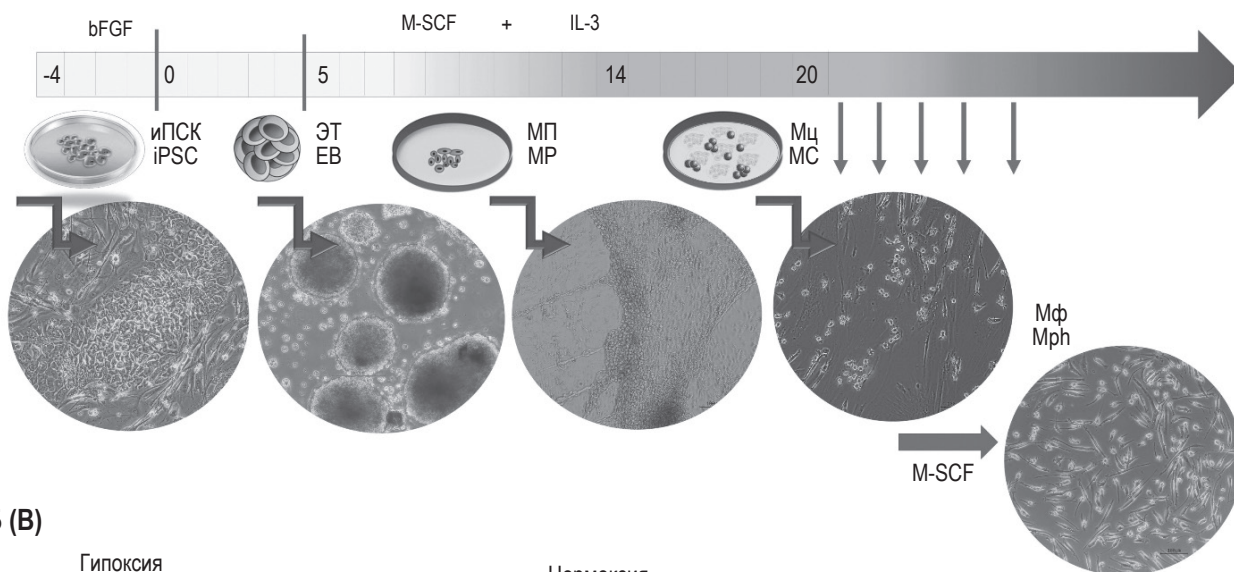
В работе использовали линии иПСК IMA и K7-4Lf, полученные, соответственно, из фибро-

бластов и мононуклеаров крови человека и любезно предоставленные нам для исследований Е.В. Григорьевой (Институт цитологии и Генетики СО РАН [8]). Линии иПСК пассировали, как это было описано ранее [4]. Для анализа траекторий гемопоэтической дифференцировки и поиска маркеров-предикторов эффективности дифференцировки использовали отработанную ранее в лаборатории модель дифференцировки иПСК в миелоидном (моноцитарно-макрофагальном) направлении [4, 10].

Гемопоэтическую дифференцировку иПСК проводили с использованием двух подходов (рис. 1). Первый подход (фактор-зависимая индукция, рис. 1А) заключался в культивировании иПСК на матригеле (Corning, Somerville, США) в условиях 2D. При использовании этого подхода индукцию всех стадий дифференцировки, включая начальную стадию образования мезодермы, обеспечивали, добавляя в культуру экзогенные факторы, стимулирующие последовательное образование мезодермы, гемогенного эндотелия, гемопоэтических предшественников и миелоидных клеток. При этом использовали протокол, предложенный ранее Takata и соавт. [11] в нашей модификации [4]. Кратко, клетки культивировали в среде StemPro™-34 с добавлением: в дни с -6 до 0 – BMP4, VEGFA, FGF2 (Biolegend, San Diego, CA, США) и CHIR99021 (Sigma, Burlington, США); в дни с 0 по +6 – VEGFA, FGF2, SCF, DKK, IL-6 и IL-3 (BioLegend, США); в дни с +6 по +10 – FGF2, SCF, IL-6 и IL-3. С 10-го дня клетки переводили в среду RPMI-1640 и культивировали в ней в присутствии интерлейкина-3 (IL-3, 25 нг/мл) и макрофагального колоний-стимулирующего фактора (M-CSF, 50-100 нг/мл; BioLegend (США); подробное описание протокола в статье [4]). За день 0 условно принимали день начала индукции гемопоэтической дифференцировки.

Второй подход (спонтанная индукция, рис. 1Б) основан на спонтанном (самопроизвольном) образовании из иПСК клеток мезодермального типа. При использовании этого подхода культуры иПСК снимали с пластика с использованием коллагеназы (collagenase IV, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, США), полученные при этом агрегаты иПСК культивировали в течение 4 дней в низкоадгезионных условиях в среде DMEM-F12, дополненной 15% заменителя сыворотки (KnockOut™ Serum Replacement), 2 мкМ глутамакса, 1%-ным раствором пеницилина/стрептомицина (все – Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, США), 1%-ным раствором незаменимых аминокислот (STEMCELL, Vancouver, BC, Канада)

А (А)



Б (Б)

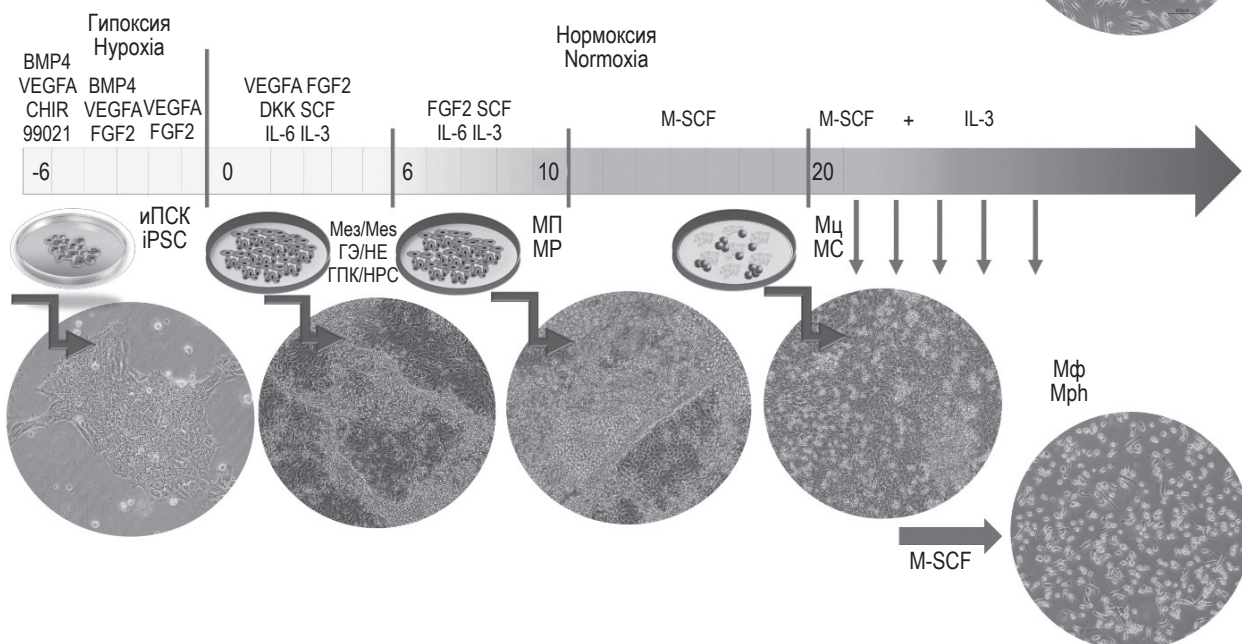


Рисунок 1. Схема дифференцировки iPSC в миелоидном направлении с использованием «фактор-зависимого» (А) и «спонтанного» (Б) протоколов

Примечание. iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, Мез – мезодерма, ГЭ – гемогенный эндотелий, ГПК – гемопоэтические прогениторные клетки, МП – миелоидные предшественники, Мц – моноцитоподобные клетки, Мф – макрофаги, ЭТ – эмбрионидные тельца.

Figure 1. The scheme of iPSC-derived myeloid cell differentiation using “factor-dependent” (A) and “spontaneous” (B) protocols
Note. iPSC, induced pluripotent stem cells; Mes, mesoderm; HE, hemogenic endothelium; HPC, hematopoietic progenitor cells; MP, myeloid progenitors; MC, monocyte-like cells; Mph, macrophages, EB, embryoid bodies.

и 0.055 мМ β-меркаптоэтанола (Sigma, St. Louis, MO, США). Известно, что низкоадгезионные условия способствуют агрегации клеток и образованию эмбрионидных тел (ЭТ) – 3D-структур, способных к самопроизвольной дифференци-

ровке в клетки всех трех зародышевых листков, включая мезодерму [6, 14]. На 4-й день культивирования полученные ЭТ собирали, перевели в адгезионные условия и культивировали в среде RPMI-1640, содержащей IL-3 (25 нг/мл) и

M-CSF (50-100 нг/мл; среда была дополнена 10% FCS (Thermo Fisher Scientific, США), 2 мкМ глутамакса, 1%-ным раствором пеницилина/стрептомицина, 1%-ным раствором незаменимых аминокислот и 0,055 мМ β-меркаптоэтанола).

Для анализа траекторий клеточной дифференцировки в разные сроки после начала культивирования адгезивные (дифференцирующиеся) клетки собирали и анализировали экспрессию на них маркеров мезодермы, гемогенного эндотелия и ранних гемопоэтических клеток. Список использованных антител включал антитела: анти-CD309-BV421, анти-CD34-APC, анти-CD31-BV510, анти-CD43-PE и CD45-FITC (BioLegend, США). Эффективность проведенной дифференцировки оценивали, определяя появление в культурах на 3-4 неделях культивирования плавающих клеток, имеющих макрофагоподобную морфологию и экспрессирующих фенотип CD14⁺ (антитела анти-CD14-PerCP.CyTM5.5, BioLegend, США).

Анализ экспрессии поверхностных маркеров проводили на проточном цитометре Cytotflex-S (Beckman Coulter, Brea, CA, США); результаты анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (TreeStar BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, США).

Результаты и обсуждение

иПСК линий K7 и iMA наращивали и индуцировали их гемопоэтическую дифференцировку с использованием «фактор-зависимого» и «спонтанного» протоколов (рис. 1). В разные сроки после начала дифференцировки адгезивные клетки собирали, обрабатывали антителами и анализировали экспрессию CD309 (KDR, рецептор к фактору роста эндотелия сосудов, VEGF); CD34 (молекула межклеточной адгезии, участвующая в ранних стадиях гемопоэза); CD31 (молекула адгезии эндотелиальных клеток, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM 1); CD43 (сиалофорин, экспрессированный на поверхности различных иммунных клеток, экспрессия характерна для гемопоэтически-коммитированных клеток-предшественников) и CD45 (тирозиновая протеинфосфатаза С рецепторного типа, общий лейкоцитарный маркер). Поскольку стимуляция гемопоэтической спецификации в фактор-зависимом и спонтанном протоколе начинается в разные дни после начала дифференцировки (на 6-й и 4-й дни соответственно), за день 0 принимали день внесения в культуры факторов, стимулирующих гемопоэтическую спецификацию. Соответственно, дни начала дифференцировки

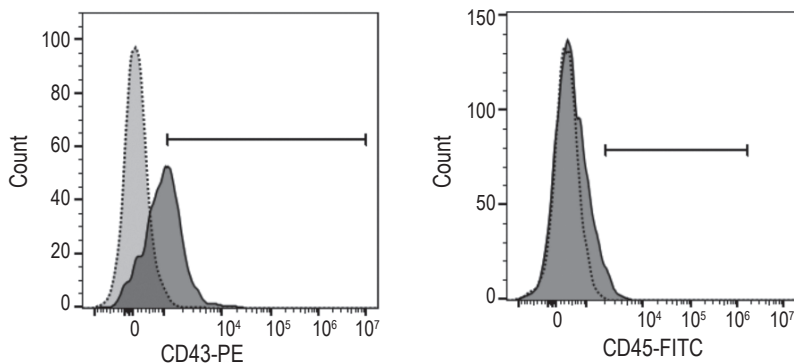
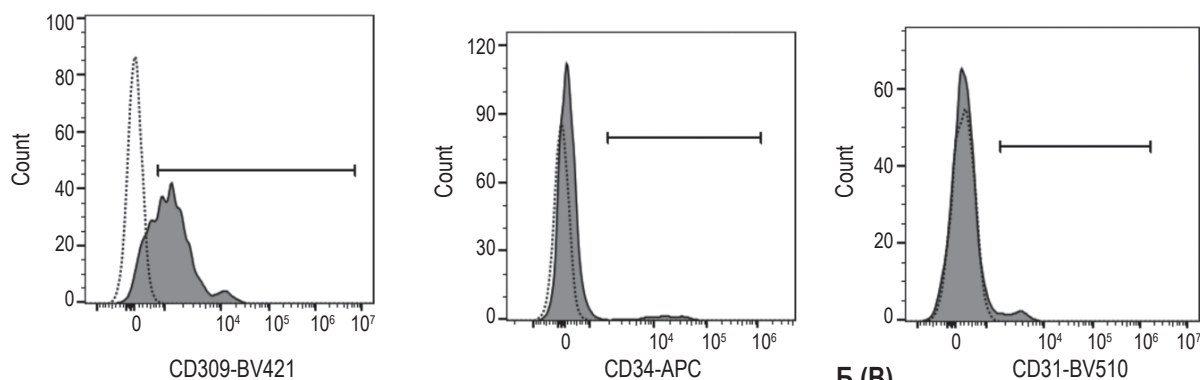
обозначали как день -6 (фактор-зависимый протокол) и день -4 (протокол спонтанной дифференцировки (рис. 1).

При дифференцировке иПСК с использованием фактор-зависимого протокола первые фенотипические изменения были отмечены уже в день 0. Основные изменения заключались в появлении на клетках экспрессии CD309, CD34 и CD43 (рис. 2А). Экспрессия CD309 характерна для клеток мезодермы (фенотип CD309⁺CD34⁻CD31⁻) и гемогенного эндотелия (фенотип CD309⁺CD34⁺CD31⁺) [1, 5]. Основная часть клеток CD309⁺, детектируемых на ранних стадиях дифференцировки, имели фенотип CD34⁻; при дальнейшей дифференцировке увеличивалась доля клеток CD309⁺, экспрессирующих CD34 (рис 2Б, 3). Другим ранним маркером дифференцировки был антиген CD43. При использовании фактор-зависимого протокола дифференцировки появление клеток CD43⁺ отмечалось уже в день 0. Экспрессия CD45, общего лейкоцитарного маркера, регистрировалась менее чем на 1-2% дифференцирующихся клеток на всех стадиях дифференцировки, включая поздние. Однако на поздних стадиях дифференцировки CD45⁺ клетки появлялись среди «плавающей», не адгезионной популяции, в которой клетки CD45⁺ составляли более 80-90% (рис. 2В).

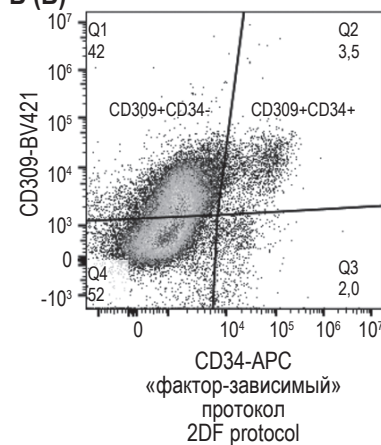
При дифференцировке иПСК с использованием «спонтанного» протокола в целом отмечались сходные изменения фенотипа, однако они наступали позже, а доля образующихся клеток-предшественников (CD309⁺, CD34⁺, CD43⁺) была ниже, чем при использовании «фактор-зависимого» протокола (рис. 3). Полученные результаты согласуются с результатами, полученными нами ранее: сравнительный динамический анализ транскриптома дифференцирующихся клеток показал, что при использовании фактор-зависимого протокола характерные для дифференцировки изменения в экспрессии генов, ассоциированных с гемопоэтической и миелоидной спецификацией, наступают раньше и более синхронно, чем при применении спонтанного протокола [4].

Анализ образования в культурах моноцитоподобных CD14⁺ клеток показал, что они появлялись как при использовании фактор-зависимого, так и при использовании спонтанного протоколов дифференцировки (рис. 2Г). Однако некоторые из дифференцировок с использованием спонтанного протокола не привели к генерации моноцитоподобных клеток и макрофагов, в то время как все дифференцировки

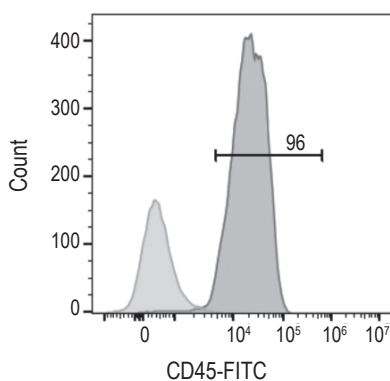
A (A)



Б (B)



В (C)



Г (D)

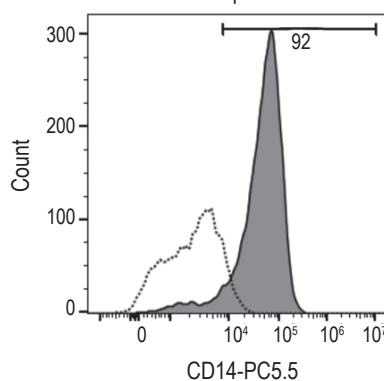
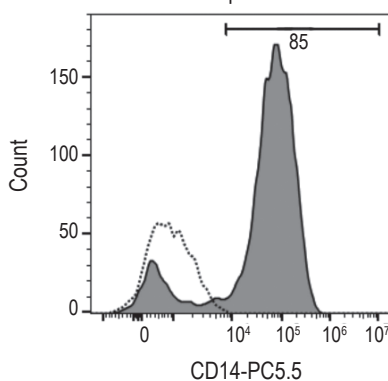


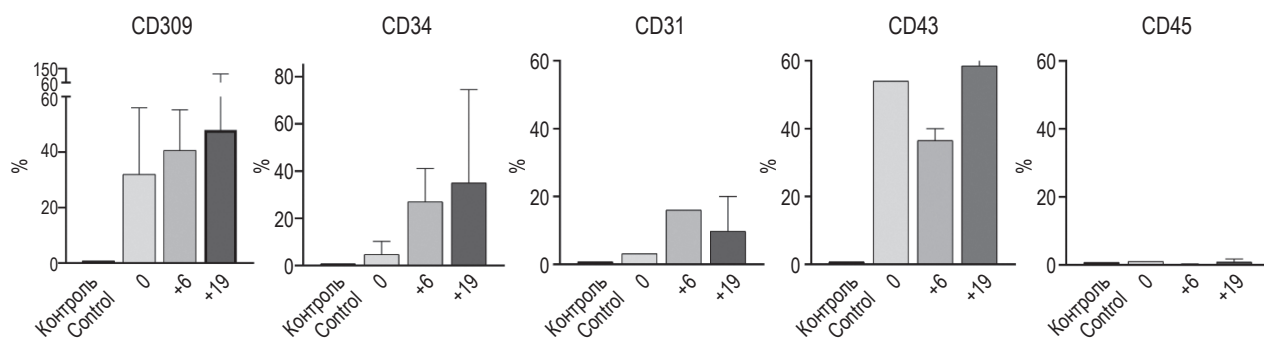
Рисунок 2. Дифференцировка иПСК в гемопоэтические/миелоидные клетки сопровождается появлением экспрессии антигенов CD309 и CD43

Примечание. иПСК линий iMA и K7-4LF дифференцировали в моноцитоподобные клетки с использованием протоколов фактор-зависимой и спонтанной дифференцировки. Экспрессию антигенов CD309, CD34, CD31, CD43 и CD45 оценивали в дни дифференцировки 0, +6, +10/11 и +19. А – пример цитометрического анализа дифференцирующихся клеток на ранних стадиях дифференцировки (иПСК линии iMA, день дифференцировки 0, фактор-зависимый протокол). Б – характер ко-экспрессии антигенов CD309 и CD34 в процессе гемопоэтической индукции (репрезентативные данные; иПСК линии K7-4Lf, день +6, фактор-зависимый протокол). В, Г – экспрессия CD45(В) и CD14 (Г) на плавающих клетках, образующихся в культурах на поздних стадиях дифференцировки (репрезентативные данные; иПСК линии iMA, день +19, фактор-зависимый протокол)

Figure 2. iPSC differentiation into hematopoietic/myeloid direction is accompanied by an increase in the expression of CD309 and CD43 antigens

Note. iPSC lines iMA and K7-4Lf were differentiated into monocyte-like cells using “factor-dependent” and “spontaneous” protocols. The expression of CD309, CD34, CD31, CD43 and CD45 was evaluated at differentiation days 0, +6, +10/11 and +19. A, representative results showing cell phenotype at early differentiation stage (iPSC line iMA, differentiation day 0, factor-dependent protocol). B, the pattern of CD309 and CD34 co-expression (representative results; iPSC line K7-4Lf, factor-dependent protocol, differentiation day +6). C, D, the expression of CD45 (C) and CD14 (D) by floating cells accumulating in the cultures at late differentiation stages (representative results obtained at day +19; iPSC line iMA, factor-dependent protocol).

A (A)



Б (B)

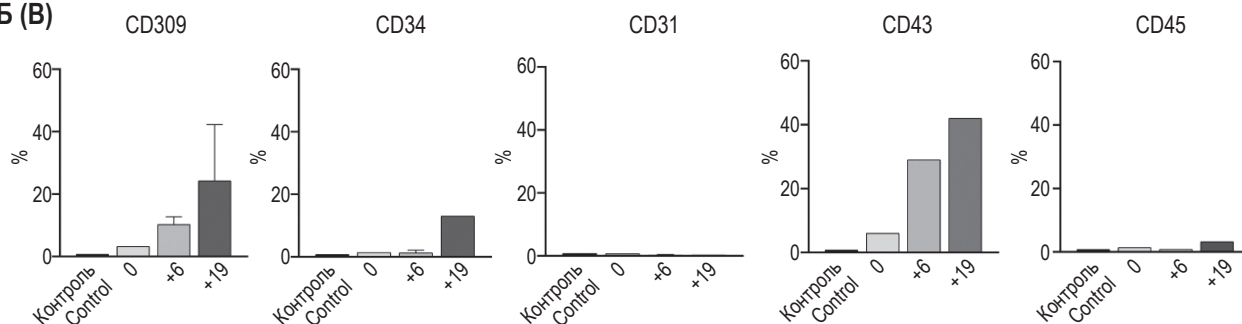


Рисунок 3. Дифференцировка с использованием фактор-зависимого протокола сопровождается ранним и выраженным изменением фенотипа дифференцирующихся клеток

Примечание. Приведен процент клеток, экспрессирующих указанные антигены на разных стадиях дифференцировки, при использовании фактор-зависимого (А) и «спонтанного» (Б) протоколов. Суммированные данные, полученные в 2-3 независимых дифференцировочных экспериментах. Ось X – дни дифференцировки; контроль – не меченый или изотип-контроль.

Figure 3. Factor-dependent protocol induces early and pronounced changes in the phenotype of differentiating cells

Note. Percentages of cells expressing the indicated antigens are shown. A, factor-dependent protocol; B, “spontaneous” protocol. Summarized data obtained in 2-3 independent differentiation experiments. X-axis, day of differentiation; control, unlabeled or isotype control.

по фактор-зависимому протоколу были успешными. В дифференцировках по «спонтанному» протоколу, которые в дальнейшем оказались не эффективными, на ранних стадиях дифференцировки нам не удалось зафиксировать появление клеток, экспрессирующих перечисленные выше маркеры.

Заключение

Полученные результаты указывают на CD309 и CD43 как на наиболее ранние и выраженные маркеры гемопоэтической дифференцировки и свидетельствуют о возможности их использования для ранней предикции эффективности гемопоэтической дифференцировки и ПСК.

Список литературы / References

- Garcia-Alegria E., Menegatti S., Fadlullah M.Z.H., Menendez P., Lacaud G., Kouskoff V. Early human hemogenic endothelium generates primitive and definitive hematopoiesis *in vitro*. *Stem Cell Rep.*, 2018, Vol. 11, no. 5, pp. 1061-1074.
- Goldenson B.H., Hor P., Kaufman D.S. iPSC-derived natural killer cell therapies – expansion and targeting. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 841107. doi: 10.3389/fimmu.2022.841107.
- Hu Y., Li Y., Yao Z., Huang F., Cai H., Liu H., Zhang X., Zhang J. Immunotherapy: review of the existing evidence and challenges in breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2023, Vol. 15, no. 3, 563. doi: 10.3390/cancers15030563.
- Klepikova A., Nenasheva T., Sheveleva O., Protasova E., Antonov D., Gainullina A., Chikina E., Sakovnich O., Gerasimova T., Nikitina I., Shevalie D., Lyadova I. iPSC-derived macrophages: the differentiation protocol

affects cell immune characteristics and differentiation trajectories. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 24, 16087. doi: 10.3390/ijms232416087.

5. Lange L., Morgan M., Schambach A. The hemogenic endothelium: a critical source for the generation of PSC-derived hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2021, Vol. 78, no. 9, pp. 4143-4160.

6. Lyadova I., Gerasimova T., Nenasheva T. Macrophages derived from human induced pluripotent stem cells: The diversity of protocols, future prospects, and outstanding questions. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 640703. doi: 10.3389/fcell.2021.640703.

7. Lyadova I., Vasiliev A. Macrophages derived from pluripotent stem cells: Prospective applications and research gaps. *Cell Biosci.*, 2022, Vol. 12, 96. doi: 10.1186/s13578-022-00824-4.

8. Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Pavlova S.V., Malankhanova T.B., Valetdinova K.R., Vyatkin Y.V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Zakian S.M., Medvedev S.P. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population. *Stem Cell Res.*, 2020, Vol. 48, 101952. doi: 10.1016/j.scr.2020.101952.

9. Miyachi M., Ito Y., Nakahara F., Hino T., Nakamura F., Iwasaki Y., Kawagoshi T., Koya J., Yoshimi A., Arai S., Kagoya Y., Kurokawa M. Efficient production of human neutrophils from iPSCs that prevent murine lethal infection with immune cell recruitment. *Blood*, 2021, Vol. 138, no. 24, p. 2555-2569.

10. Sheveleva O., Protasova E., Nenasheva T., Butorina N., Melnikova V., Gerasimova T., Sakovnich O., Kurinov A., Grigor'eva E., Medvedev S., Lyadova I. A model of iPSC-derived macrophages with TNFAIP3 overexpression reveals the peculiarities of TNFAIP3 protein expression and function in human macrophages. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 16, 12868. doi: 10.3390/ijms241612868.

11. Takata K., Kozaki T., Lee C., Thion M.S., Otsuka M., Lim S., Utami K.H., Fidan K., Park D.S., Malleret B., Chakarov S., See P., Low D., Low G., Garcia-Miralles M., Zeng R., Zhang J., Goh C., Gul A., Hubert S., Lee B., Chen J., Low I., Shadan N-B., Lum J., Wei T-S., Mok E., Kawanishi S., Kitamura Y., Larbi A., Poidinger M., Renia L., Ng L-G., Wolf Y., Jung S., Önder T., Newell I., Huber T., Ashihara E., Garel S., Pouladi M., Ginhoux F. Induced-pluripotent-stem-cell-derived primitive macrophages provide a platform for modeling tissue-resident macrophage differentiation and function. *Immunity*, 2017, Vol. 47, pp. 183-198.

12. Trump L.R., Nayak R.C., Singh A.K., Emberesh S., Wellendorf A.M., Lutzko C.M., Cancelas J.A. Neutrophils derived from genetically modified human induced pluripotent stem cells circulate and phagocytose bacteria *in vivo*. *Stem Cells Transl. Med.*, 2019, Vol. 8, no. 6, pp. 557-567.

13. Wallis R.S., O'Garra A., Sher A., Wack A. Host-directed immunotherapy of viral and bacterial infections: past, present and future. *Nat. Rev. Immunol.*, 2023, Vol. 23, no. 2, pp. 121-133.

14. van Wilgenburg B., Browne C., Vowles J., Cowley S.A. Efficient, long term production of monocyte-derived macrophages from human pluripotent stem cells under partly-defined and fully-defined conditions. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, e71098. doi: 10.1371/journal.pone.0071098.

Авторы:

Шевелева О.Н. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук», Москва, Россия

Ненасьева Т.А. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук», Москва, Россия

Лядова И.В. — д.м.н., заведующая лабораторией ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук»; заведующая кафедрой клеточной биомедицины и клеточных технологий ПИШ ФГАУ ВО «Российский научно-исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Sheveleva O.N., PhD (Biology), Senior Research Associate, Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Nenasheva T.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Lyadova I.V., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory, Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences; Head of the Department for Cell Biomedicine and Cell Technologies, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 30.03.2024

Отправлена на доработку 08.04.2024

Принята к печати 10.04.2024

Received 30.03.2024

Revision received 08.04.2024

Accepted 10.04.2024

ПОВЫШЕННЫЙ ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ CD57⁺NKG2C⁺НК-КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ NKG2A

Алексеева Н.А., Вавилова Ю.Д., Коваленко Е.И.

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

Резюме. При инфекции цитомегаловируса (HCMV) в периферической крови увеличивается содержание так называемых адаптивных НК-клеток с фенотипом CD57⁺NKG2C⁺, способных при повторной встрече с антигеном проявлять специализированную функциональную активность, направленную на контроль инфекции. Кроме того, адаптивные НК-клетки характеризуются противоопухолевым цитотоксическим действием и высокой продолжительностью жизни. В связи с этим, HCMV-специфичные адаптивные НК-клетки представляют интерес в качестве терапевтического агента. Специфичность адаптивных НК-клеток к HCMV определяется в первую очередь распознаванием вирусных пептидов, представленных неклассической молекулой гистосовместимости первого класса HLA-E, активирующим рецептором NKG2C. Однако, будучи высоко дифференцированными, адаптивные CD57⁺NKG2C⁺ клетки, как правило, хуже пролиферируют в ответ на растворимые стимулы по сравнению с менее дифференцированными НК-клетками, вследствие чего затруднено их накопление *in vitro*. Помимо активирующего рецептора NKG2C, адаптивные НК-клетки экспрессируют рецепторы семейства KIR, но большей частью не экспрессируют ингибирующий рецептор NKG2A, также способный распознавать молекулу HLA-E, презентующую пептид HCMV. Несмотря на то, что в целом в субпопуляции НК-клеток с фенотипом CD57⁺NKG2C⁺ HCMV-серопозитивных доноров уровень экспрессии NKG2A сильно снижен, у ряда индивидов в этой фракции наблюдалась значительная доля NKG2A-позитивных клеток. На примере индивида с высокой долей NKG2A⁺ в популяции НК-клеток CD57⁺NKG2C⁺ и высоким титром антител к HCMV мы показали, что при стимуляции IL-2 в сочетании с фидерными клетками K562-mb1121 НК-клетки субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ проявляют повышенную пролиферативную активность в сравнении с CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁻, а также обладают более высоким уровнем экспрессии адаптерной молекулы FcεRIγ, принимающей участие в сигнальной трансдукции активирующих рецепторов NKp30, NKp46 и CD16. Таким образом, NKG2A-позитивные CD57⁺NKG2C⁺ клетки могут быть потенциальными предшественниками адаптивных НК-клеток и обеспечивать их накопление при инфекции HCMV. При этом оба рецептора, и ингибирующий NKG2A, и активирующий NKG2C, участвуют в регуляции

Адрес для переписки:

Коваленко Елена Ивановна
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.
E-mail: lenkovalen@mail.ru

Address for correspondence:

Elena I. Kovalenko
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences
16/10 Miklukho-Maklay St
Moscow
117997 Russian Federation
E-mail: lenkovalen@mail.ru

Образец цитирования:

Н.А. Алексеева, Ю.Д. Вавилова, Е.И. Коваленко
«Повышенный пролиферативный ответ
высокодифференцированных CD57⁺NKG2C⁺НК-
клеток, экспрессирующих NKG2A» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 891-896.
doi: 10.15789/1563-0625-IPR-16778

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

For citation:

N.A. Alekseeva, Yu.D. Vavilova, E.I. Kovalenko
“Increased proliferative response of highly differentiated
CD57⁺NKG2C⁺NK cells expressing NKG2A”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 5, pp. 891-896.
doi: 10.15789/1563-0625-IPR-16778

© Alekseeva N.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IPR-16778

НК-клеточного ответа на инфекцию HCMV. Полученные в этой работе данные позволяют углубить знания в области дифференцировки HCMV⁻ специфичных НК-клеток, а также расширить ряд подходов к накоплению высокоцитотоксичных адаптивноподобных НК-клеточных эффекторов *in vitro*.

Ключевые слова: НК-клетки, рецептор NKG2A, CD57⁺NKG2C⁺НК-клетки, пролиферативный ответ, адаптивные НК-клетки, ЦМВ

INCREASED PROLIFERATIVE RESPONSE OF HIGHLY DIFFERENTIATED CD57⁺NKG2C⁺NK CELLS EXPRESSING NKG2A

Alekseeva N.A., Vavilova Yu.D., Kovalenko E.I.

Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. During infection with cytomegalovirus (HCMV), the content of so-called adaptive NK cells with the CD57⁺NKG2C⁺ phenotype increases in the peripheral blood, capable of exhibiting specialized functional activity aimed at controlling the infection upon repeated encounter with the antigen. In addition, adaptive NK cells are characterized by antitumor cytotoxic effects and long lifespan. In this regard, HCMV⁻ specific adaptive NK cells are of interest as a therapeutic agent. The specificity of adaptive NK cells to HCMV is determined primarily by the recognition of viral peptides presented by the non-classical class I histocompatibility molecule HLA-E, by means of the activating receptor NKG2C. However, being highly differentiated, adaptive CD57⁺NKG2C⁺ cells tend to proliferate less well in response to soluble stimuli compared to less differentiated NK cells, making their accumulation *in vitro* difficult. In addition to the activating receptor NKG2C, adaptive NK cells express receptors of the KIR family, but mostly do not express the inhibitory receptor NKG2A, which is also capable of recognizing the HLA-E molecule presenting the HCMV peptide. Despite the fact that, in general, in CD57⁺NKG2C⁺NK cells from HCMV⁻ seropositive donors, NKG2A expression is greatly reduced, in a number of individuals a significant proportion of NKG2A-positive cells was observed in this fraction. Using the example of an individual with a high proportion of NKG2A⁺ in the population of CD57⁺NKG2C⁺NK cells and a high titer of antibodies to HCMV, we showed that when stimulated with IL-2 in combination with K562-mbII21 feeder cells, NK cells of the CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ subpopulation exhibit increased proliferative activity in comparison with CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁻, and also have a higher level of expression of the adapter molecule FcεRIγ, taking part in signal transduction of activating receptors NKp30, NKp46 and CD16. Thus, NKG2A-positive CD57⁺NKG2C⁺ cells may be potential precursors of adaptive NK cells and mediate their accumulation during HCMV infection. The data obtained in this work allows us to deepen knowledge in the field of differentiation of HCMV⁻ specific NK cells, as well as expand the range of approaches to the accumulation of highly cytotoxic adaptive-like NK cell effectors *in vitro*.

Keywords: NK cells, NKG2A receptor, CD57⁺NKG2C⁺NK cells, proliferative response, adaptive NK cells, HCMV

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00503).

Введение

Традиционно НК-клетки считаются клетками врожденного иммунитета, для которых характерны неспецифические антиген-независимые иммунные реакции. Активация НК-клеток регулируется балансом сигналов, исходящих от активирующих и ингибирующих рецепторов, в присутствии определенных цитокинов. Ингибирующие рецепторы НК-клеток семейства KIR и

рецептор NKG2A, распознают «свои» молекулы главного комплекса совместимости HLA класса I (HLA-I), обеспечивая сохранность собственных нормальных клеток [8]. Лигандом NKG2A является молекула HLA-E, способная презентировать лидерную пептидную последовательность молекул HLA-A, -B и -C. Измененные клетки, которые избегают T-клеточного иммунного надзора за счет снижения уровня экспрессии HLA-I, также перестают экспрессировать HLA-E и становятся уязвимыми перед лицензированными НК-клетками NKG2A⁺. Однако некоторые раковые клетки, в частности клетки множественной миеломы спо-

способны продуцировать пептиды, имитирующие лидерную последовательность молекул HLA-I, и предотвращать цитотоксическую реакцию НК-клеток [5]. Ряд вирусных геномов также содержит закодированные в них последовательности пептидов, обладающих сродством к антиген-презентирующей борозде HLA-E. Одним из таких вирусов является цитомегаловирус (HCMV), белки которого кодируют ряд пептидов, которые могут презентироваться в составе HLA-E и способствовать подавлению цитотоксической реакции посредством NKG2A [9]. В то же время НК-клетки играют важную роль в противовирусной иммунной защите, в том числе от HCMV. Более половины населения мира инфицировано HCMV (до 100% в отдельных странах) [1]. У большинства людей HCMV персистирует в течение всей жизни, однако эта инфекция обладает потенциалом реактивации, особенно у людей с ослабленным иммунитетом (при СПИДе, после иммуносупрессивной и противоопухолевой терапии, в результате реакции реципиента на трансплантат. Контакт с вирусом стимулирует формирование особой субпопуляции НК-клеток, которая реагирует на HCMV. Это НК-клетки с фенотипом $NKG2C^+$, обладающие свойствами иммунологической памяти [2]. Адаптивные НК-клетки памяти обладают высокой степенью дифференцировки и экспрессируют углеводный антиген CD57, рецепторы KIR, но большей частью негативны по NKG2A [3]. Они отличаются увеличенной продолжительностью жизни и потенциальностью продуцировать IFN γ , а также повышенным уровнем антитело-зависимой цитотоксичности, благодаря чему могут стать перспективной основой для создания противораковых эффекторов. Однако из-за высокой степени дифференцировки адаптивные НК-клетки обладают низким уровнем экспрессии рецепторов к растворимым стимулам, что затрудняет их накопление *in vitro*. Ранее нами было показано, что НК-клетки субпопуляции $CD57^+NKG2C^+CD56^{dim}$, сохраняя функциональные свойства адаптивных клеток, обладают повышенным пролиферативным потенциалом и, по-видимому, являются предшественниками адаптивных клеток $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$. Одной из таких активно пролиферирующих популяций-предшественников может быть и субпопуляция $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$. Экспрессия NKG2A характерна для менее дифференцированных клеток, которые способны отвечать активной пролиферацией на растворимые стимулы благодаря высокой плотности экспрессии цитокиновых рецепторов и более высокой аффинности связывания этими рецепторами своих лигандов-цитокинов. В данной работе мы показали связь между экспрессией NKG2A на поверхности

высокодифференцированных НК-клеток с фенотипом адаптивных $CD57^+NKG2C^+$ и серологическим HCMV-положительным статусом индивидов. На примере индивида с высокой долей $NKG2A^+$ в популяции $CD57^+NKG2C^+$ и высоким титром антител к HCMV мы показали, что при стимуляции IL-2 в сочетании с фидерными клетками K562-mbIL21 НК-клетки субпопуляции $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ проявляют повышенную пролиферативную активность в сравнении с $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$, а также обладают более высоким уровнем экспрессии адаптерной молекулы Fc ϵ RI γ .

Материалы и методы

НК-клетки для последующих экспериментов получали методом негативной магнитной сепарации из периферических мононуклеаров (PBMC) крови здоровых добровольцев, давших информированное согласие на участие в исследовании. PBMC выделяли посредством центрифугирования клеток крови в градиенте плотности. Серологический HCMV-статус доноров определяли посредством иммуноферментного анализа с использованием набора для детекции IgG антител к HCMV (АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия). Фенотип полученных НК-клеток *ex vivo* исследовали методом проточной цитометрии, окраску проводили моноклональными антителами CD57-VioBlue, NKG2C-FITC, NKG2A-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия), CD56-PE-Cy7 (Sony Biotechnology, США). Анализ клеток проводили на проточном цитометре MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec), оснащенный тремя лазерами: 405 нм, 488 нм и 635 нм. Дальнейшую обработку данных проводили в программе FlowJo X (TreeStar Williamson Way, Ashland, OR, USA). Часть полученных клеток окрашивали моноклональными антителами CD56-BV421 (eBioscience, США), NKG2C-FITC, NKG2A-PEVio770 (Miltenyi Biotec) и CD57-PE (Sony Biotechnology) и сортировали с помощью клеточного сортировщика (FACS Vantage DiVa, BD, США) на субпопуляции $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$ и $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ в лунки 96-луночного планшета по 100 клеток. Далее клетки культивировали в течение 17 дней в среде, состоящей из 20% x-vivo (Lonza, Швейцария) и 80% DMEM (Панэко, Россия) с добавлением 10% FBS (HyClone), 2 mM пирувата натрия, 2 mM глутамин и 1% антибиотика-антимикотика (Sigma-Aldrich) при стимуляции IL-2 (100 ед./мл) и предварительно облученными (100 Гр) фидерными клетками K562-mbIL21 (37 °C, 5% CO $_2$). Пролиферативную активность оценивали, рассчитывая коэффициент экспансии по следующей формуле: $K(t) = N(t)/N(0)$, где K – коэффициент

экспансии в момент времени t , $N(t)$ – число клеток в культуре в момент времени t , $N(0)$ – число клеток в культуре в начальный момент времени. Статистический анализ данных проводили в программе GraphPad Prism 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Т-тест Стьюдента применялся при анализе нормально распределенных данных, в противном случае применялся U-критерий Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднее \pm стандартное распределение (SD) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$).

Результаты и обсуждение

Рецепторы NKG2C и NKG2A способны распознавать молекулу HLA-E на поверхности зараженных клеток, экспрессия которой индуци-

руется HCMV. Таким образом, NKG2A и NKG2C играют важную роль в регуляции инфекции HCMV. Мы оценили взаимосвязь между серологическим статусом индивидов (наличие HCMV-специфичных IgG) и уровнем экспрессии этих рецепторов в общей популяции НК-клеток, а также оценили долю клеток NKG2A⁺ в субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺, соответствующей по фенотипу адаптивным НК-клеткам. В исследовании приняли участие 36 индивидов, 12 из которых были серонегативны, а 24 – серопозитивны по IgG к HCMV (HCMV⁻ и HCMV⁺ соответственно) (рис. 1А). Распределение титров IgG-антител к HCMV в плазме крови серопозитивных доноров представлено на рисунке 1В в популяции НК-клеток HCMV⁺ индивидов на-

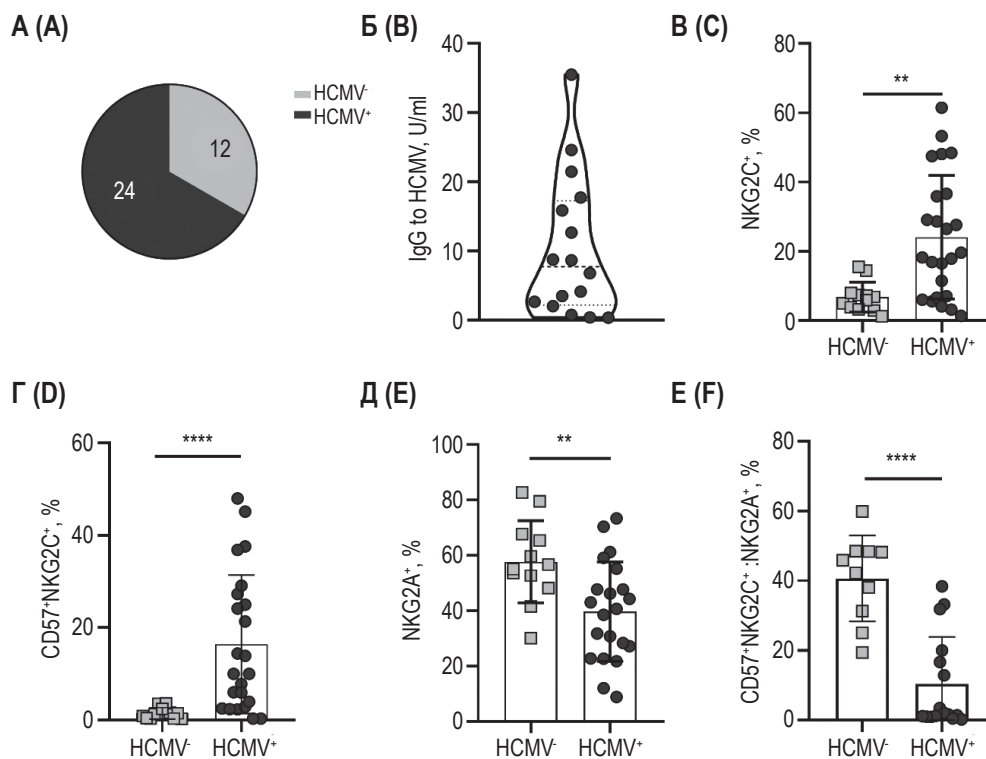


Рисунок 1. Анализ HCMV инфицированности доноров, принявших участие в исследовании и анализ фенотипа НК-клеток этих доноров

Примечание. А – распределение доноров, принявших участие в исследовании, по HCMV статусу; В – титр антител к HCMV в плазме HCMV серопозитивных индивидов, принявших участие в исследовании; С – доля клеток NKG2C⁺ в популяции НК-клеток HCMV серопозитивных (HCMV⁺) и серонегативных (HCMV⁻) индивидов; D – доля клеток CD57⁺NKG2C⁺ в популяции НК-клеток HCMV⁺ и HCMV⁻ индивидов; E – доля клеток NKG2A⁺ в популяции НК-клеток HCMV⁺ и HCMV⁻ индивидов; F – доля клеток NKG2A⁺CD57⁺NKG2C⁺ в популяции НК-клеток HCMV⁺ и HCMV⁻ индивидов. Данные представлены в виде среднее \pm SD, статистический анализ нормально распределенных данных проводился посредством t-теста Стьюдента, ненормально распределенных данных – U-тест Манна–Уитни, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$.

Figure 1. Analysis of HCMV infection among the donors who took part in the study and analysis of these donors' NK cell phenotype of these donors

Note. A, distribution of donors who took part in the study according to their HCMV status; B, titers of HCMV specific antibodies in the plasma of HCMV seropositive individuals who took part in the study; C, proportion of NKG2C⁺ cells in the NK cell population of HCMV seropositive (HCMV⁺) and seronegative (HCMV⁻) individuals; D, proportion of CD57⁺NKG2C⁺ cells in the population of NK cells of HCMV⁺ and HCMV⁻ individuals; E, proportion of NKG2A⁺ cells in the population of NK cells of HCMV⁺ and HCMV⁻ individuals; F, proportion of NKG2A⁺ cells in CD57⁺NKG2C⁺ subset of NK cells from HCMV⁺ and HCMV⁻ individuals. Data are presented as mean \pm SD, statistical analysis of normally distributed data was carried out using Student's t-test, non-normally distributed data – Mann–Whitney U test, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$.

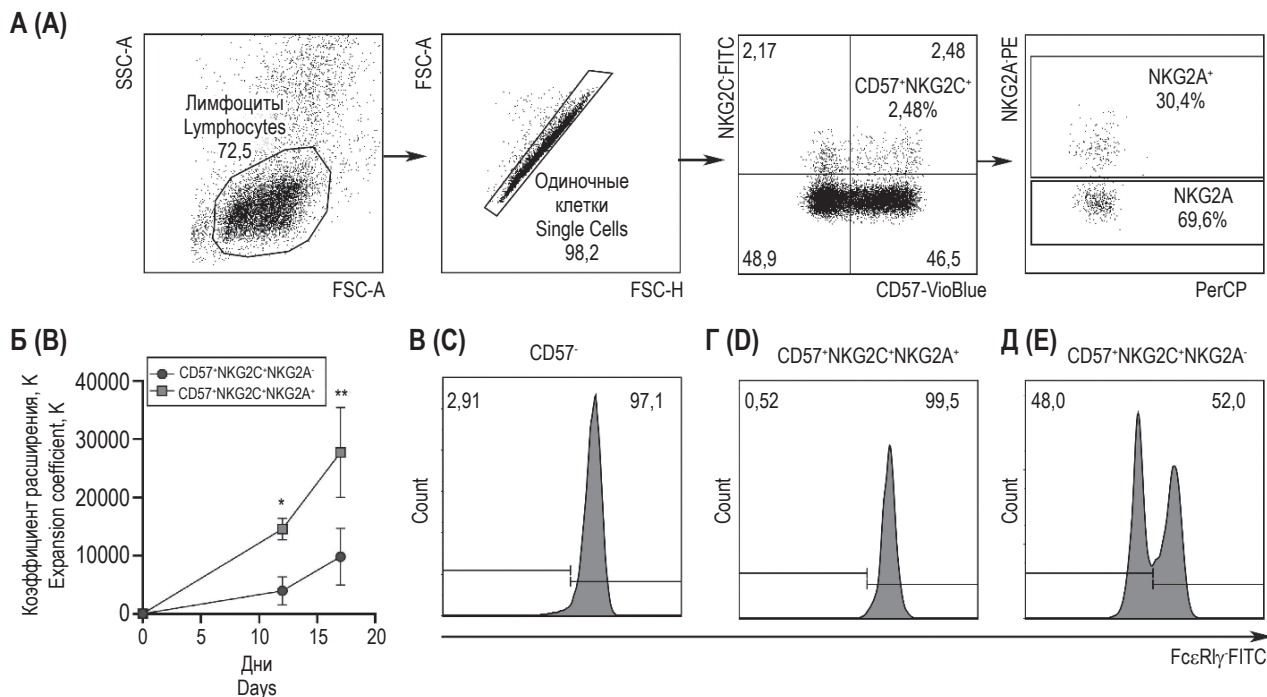


Рисунок 2. Сортировка и экспансия субпопуляций NK-клеток

Примечание. А – схема гейтирования при сортировке NK-клеток на субпопуляции $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$ и $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$; В – коэффициент экспансии культур $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$ и $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ NK-клеток, данные представлены в виде среднее \pm SD, статистический анализ проведен посредством непараметрического теста Манна–Уитни, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; С, D, E – уровень экспрессии цепи $Fc\epsilon RI\gamma$ в клетках субпопуляций NK-клеток $CD57^-$ (C), $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ (D) и $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$ (E) *ex vivo*.

Figure 2. Sorting and expansion of NK cell subsets

Note. A, gating scheme for sorting NK cells into $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$ and $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ subsets; B, expansion coefficient of $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$ and $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ NK cell cultures, data are presented as mean \pm SD, statistical analysis was carried out using the non-parametric Mann-Whitney test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; C, D, E, expression level of the $Fc\epsilon RI\gamma$ chain in $CD57^-$ (C), $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ (D) and $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$ (E) NK cell subsets *ex vivo*.

блюдалось более высокое содержание $NKG2C^+$ и $CD57^+NKG2C^+$ NK-клеток, что свидетельствует о циркуляции в крови этих людей HCMV-специфичных эффекторов (рис. 1C, D). Кроме того, для HCMV-серопозитивных индивидов была характерна более низкая доля $NKG2A^+$ клеток как в общей популяции NK-клеток, так и в субпопуляции $CD57^+NKG2C^+$ (рис. 1E, F). Таким образом, при инфекции HCMV в периферической крови происходило накопление $NKG2A^-$ NK-клеток, однако у некоторых HCMV+ индивидов (6 из 24) доля $NKG2A^+$ клеток в субпопуляции $CD57^+NKG2C^+$ была сравнима с таковой у HCMV- индивидов (рис. 1F).

Поскольку для $NKG2A^-$ экспрессирующих NK-клеток характерна более интенсивная пролиферация в ответ на стимуляцию, по сравнению с более зрелыми NK-клетками, нами было проведено сравнение экспансии субпопуляций $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ и $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$. NK-клетки для данного эксперимента были выделены из крови индивида, обладающего высокой долей

клеток $NKG2A^+$ в популяции $CD57^+NKG2C^+$ (30,4%, рис. 1F), а также высоким титром антител к HCMV (17,75 U/ml, рис. 1B). Клеточные культуры были выращены из 100 NK-клеток с фенотипом $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$ или $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$, предварительно отсортированных в лунки 96-луночного планшета, при стимуляции IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21 (рис. 2A). В культурах NK-клеток $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ наблюдался более высокий уровень экспансии в сравнении с культурами $NKG2A^-$ $CD57^+NKG2C^+$ клеток (рис. 2B). Таким образом, даже во фракции высокодифференцированных NK-клеток экспрессия $NKG2A^-$ маркировала NK-клетки с более высоким пролиферативным потенциалом. Также было оценено внутриклеточное содержание адаптерной цепи $Fc\epsilon RI\gamma$ в NK-клетках $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$ и $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ *ex vivo*. Эта молекула необходима для проведения сигнала ряда активирующих рецепторов NK-клеток, в частности, рецепторов натуральной цитотоксичности $NKp30$ и $NKp46$. Различий между NK-клеточными

субпопуляциями CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ и CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ по уровню экспрессии FcεRIγ выявлено не было (рис. 2С, D). В то же время часть клеток субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁻ имела низкий уровень экспрессии FcεRIγ (рис. 2Е). Высокий уровень FcεRIγ характерен для зрелых клеток [4], но в популяции адаптивных НК-клеток уровень экспрессии этой адаптерной цепи снижен [6]. Недавно было показано, что при пролиферации НК-клеток повышается активность комплекса mTOR (mammalian target of rapamycin), который, в свою очередь, способствует повышению уровня экспрессии FcεRIγ [7]. Следовательно, высокий

уровень экспрессии молекулы FcεRIγ в субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ указывает на интенсивную метаболическую активность этих клеток, ассоциированную с их высоким пролиферативным потенциалом. Активно пролиферирующие CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ НК-клетки представляют особый интерес в контексте изучения путей дифференцировки НК-клеток в адаптивное состояние. Благодаря своей повышенной пролиферативной активности эти клетки могут стать основой для получения высокодифференцированных эффекторов для иммунотерапии с использованием НК-клеток.

Список литературы / References

1. Cox M., Kartikasari A.E.R., Gorry P.R., Flanagan K.L., Plebanski M. Potential Impact of Human Cytomegalovirus Infection on Immunity to Ovarian Tumours and Cancer Progression. *Biomedicines*, 2021, Vol. 9, no. 4, 351. doi: 10.3390/biomedicines9040351.
2. Gumá M., Budt M., Sáez A., Brckalo T., Hengel H., Angulo A., López-Botet M. Expansion of CD94/NKG2C⁺ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood*, 2006, Vol. 107, no. 9, pp. 3624-3631.
3. Kovalenko E.I., Streltsova M.A., Kanevskiy L.M., Erokhina S.A., Telford W.G. Identification of Human Memory-Like NK Cells. *Curr. Protoc. Cytom.*, 2017, Vol. 79, pp. 9.50.1-9.50.11.
4. Lopez-Vergès S., Milush J.M., Pandey S., York V.A., Arakawa-Hoyt J., Pircher H., Norris P.J., Nixon D.F., Lanier L.L. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16⁺ NK-cell subset. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 19, pp. 3865-3874.
5. Sarkar S., van Gelder M., Noort W., Xu Y., Rouschop K.M., Groen R., Schouten H.C., Tilanus M.G., Germaad W.T., Martens A.C., Bos G.M., Wieten L. Optimal selection of natural killer cells to kill myeloma: the role of HLA-E and NKG2A. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2015, Vol. 64, no. 8, pp. 951-963.
6. Schlums H., Cichocki F., Tesi B., Theorell J., Beziat V., Holmes T.D., Han H., Chiang S.C., Foley B., Mattsson K., Larsson S., Schaffer M., Malmberg K.J., Ljunggren H.G., Miller J.S., Bryceson Y.T. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*, 2015, Vol. 42, no. 3, pp. 443-456.
7. Shemesh A., Su Y., Calabrese D.R., Chen D., Arakawa-Hoyt J., Roybal K.T., Heath J.R., Greenland J.R., Lanier L.L. Diminished cell proliferation promotes natural killer cell adaptive-like phenotype by limiting FcεRIγ expression. *J. Exp. Med.*, 2022, Vol. 219, no. 11, e20220551. doi: 10.1084/jem.20220551.
8. Sivori S., Vacca P., Del Zotto G., Munari E., Mingari M.C., Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell. Mol. Immunol.*, 2019, Vol. 16, no. 5, pp. 430-441.
9. Wang E.C., McSharry B., Retiere C., Tomasec P., Williams S., Borysiewicz L.K., Braud V.M., Wilkinson G.W. UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 2002, Vol. 99, no. 11, pp. 7570-7575.

Авторы:

Алексеева Н.А. — аспирант, младший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

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

Коваленко Е.И. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Alekseeva N.A., Postgraduate Student, Junior Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Vavilova Yu.D., PhD (Biology), Research Associate, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kovalenko E.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 01.04.2024

Отправлена на доработку 02.04.2024

Принята к печати 24.04.2024

Received 01.04.2024

Revision received 02.04.2024

Accepted 24.04.2024

КЛЕТОЧНАЯ ГЕМОТЕСТ-СИСТЕМА *IN VITRO* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ИНФЛАММАСОМЫ NLRP3

Осина Н.К.¹, Волова Л.Т.¹, Лебедев П.А.¹, Шафиева И.А.¹,
Пугачев Е.И.¹, Гончаренко С.А.², Кузнецов С.И.¹, Гусякова О.А.¹,
Светлова Г.Н.¹

¹ ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Самара, Россия

² ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет», г. Самара, Россия

Резюме. В настоящее время подагрический артрит рассматривается как аутовоспалительное заболевание смешанного типа, вызванное активацией инфламماسомы NLRP3 (рецептора NOD (нуклеотид-связывающий домен)-подобного белка 3). Два цитокина IL-1 β и IL-18 считаются важными биомаркерами активации инфламماسомы NLRP3. Однако концентрация IL-1 β в сыворотках доноров обычно крайне низка и находится на границе уровня детекции (1-3 пг/мл), а концентрации IL-18 циркулирующего цитокина в сыворотках индивидуальных доноров сильно варьируют, что затрудняет использование данных биомаркеров в диагностике аутовоспалительных заболеваний. Мы предположили, что клетки крови пациентов, которые были сенсibilизированы в условиях *in vivo* к присутствию специфичных факторов, характерных для аутовоспалительных заболеваний и, в частности, подагрического артрита, будут продуцировать повышенные количества инфламмасом-регулируемых цитокинов по сравнению с клетками крови здоровых доноров. Было проведено сравнение IL-18 цитокина у здоровых доноров и больных с подагрическим артритом с помощью 2 методов: а) традиционного анализа уровня сывороточного цитокина IL-18 в крови и б) с помощью клеточной Гемотест-системы *in vitro*, разработанной на базе научно-исследовательского института «Биотех» СамГМУ. Проведенное сравнение этих двух методов продемонстрировало преимущества использования клеточной Гемотест-системы *in vitro* для оценки IL-18 цитокинового статуса пациентов с подагрическим артритом. Сывороточные значения IL-18 сильно варьировали и не показывали существенной разницы между донорами и пациентами с подагрическим артритом. С помощью разработанной клеточной Гемотест-системы *in vitro* обнаружены значимые количественные различия в продукции воспалительного цитокина IL-18, вырабатываемого клетками крови потенциально здоровых доноров и пациентов с подагрическим артритом. Клетки крови индивидуальных пациентов, сенсibilизированные в условиях

Адрес для переписки:

Осина Наталья Константиновна
ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.
Тел.: 8 (927) 600-52-15.
E-mail: n.k.osina@samsmu.ru

Address for correspondence:

Natalya K. Ossina
Samara State Medical University
89 Chapayevskaya St
Samara
443099 Russian Federation
Phone: +7 (927) 600-52-15.
E-mail: n.k.osina@samsmu.ru

Образец цитирования:

Н.К. Осина, Л.Т. Волова, П.А. Лебедев, И.А. Шафиева, Е.И. Пугачев, С.А. Гончаренко, С.И. Кузнецов, О.А. Гусякова, Г.Н. Светлова «Клеточная гемотест-система *in vitro* для определения активности инфламماسомы NLRP3» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 897-904.
doi: 10.15789/1563-0625-CBI-16780

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

For citation:

N.K. Ossina, L.T. Volova, P.A. Lebedev, I.A. Shafieva, E.I. Pugachev, S.A. Goncharenko, S.I. Kuznetsov, O.A. Gusyakova, G.N. Svetlova "Cell-based *in vitro* hemoassay for evaluation of NLRP3-inflammasome activity", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 897-904.
doi: 10.15789/1563-0625-CBI-16780

© Ossina N.K. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CBI-16780

in vivo специфичными факторами, характерными для подагрического артрита, продуцируют *in vitro* в культуральную среду повышенные концентрации IL-18 по сравнению с клетками здоровых доноров. Таким образом, клеточная Гемотест-система *in vitro* может быть применена для более точной оценки цитокинового статуса пациентов.

Ключевые слова: клеточная тест-система, IL-18, инфламмосома NLRP3, подагрический артрит, сыворотка, мочевая кислота, цитокины

CELL-BASED *IN VITRO* HEMOASSAY FOR EVALUATION OF NLRP3-INFLAMMASOME ACTIVITY

Ossina N.K.^a, Volova L.T.^a, Lebedev P.A.^a, Shafieva I.A.^a, Pugachev E.I.^a, Goncharenko S.A.^b, Kuznetsov S.I.^a, Gusyakova O.A.^a, Svetlova G.N.^a

^a Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

^b Samara State Technical University, Samara, Russian Federation

Abstract. Currently, gouty arthritis is considered as a polygenic multifactorial autoinflammatory disease caused by activation of the NOD (nucleotide-binding domain) -like protein receptor 3 inflammasome NLRP3. The two cytokines IL-1 β and IL-18 are considered important biomarkers of NLRP3 inflammasome activation. However, usually the concentration of IL-1 β in donor sera is extremely low and found to be at the limit of detection level (1-3 pg/ml), while the concentration of circulating cytokine IL-18 in the sera of individual donors varies greatly. This results in difficulty using these biomarkers in the diagnosis of autoinflammatory diseases. We hypothesized that the patient's blood cells which were sensitized *in vivo* to the presence of specific factors characteristic of autoinflammatory diseases, in particular, gouty arthritis, would produce increased amounts of the inflammasome-regulated cytokines compared to blood cells obtained from healthy donors. A comparison of the IL-18 cytokine in healthy donors and patients with gouty arthritis was carried out using 2 methods: a) by traditional analysis of the level of serum circulated IL-18 and b) by using a cell-based Hemoassay *in vitro* developed at the research institute "Biotech" SamGMU. The comparative analysis demonstrated the advantages of using an *in vitro* cell-based Hemoassay to assess the IL-18 cytokine status of patients. Serum IL-18 values varied widely and showed no significant difference between donors and patients with gouty arthritis. Using the developed cell-based Hemoassay *in vitro*, significant quantitative differences in the production of the inflammatory cytokine IL-18 produced by blood cells of potentially healthy donors and patients with gouty arthritis were detected. Blood cells of individual patients, sensitized *in vivo* with specific factors characteristic of gouty arthritis, produce increased concentrations of IL-18 in the cell growth medium *in vitro* compared to cells from healthy donors. Thus, the *in vitro* cell-based Hemoassay can be used for a more accurate assessment of the cytokine status of patients.

Keywords: cell-based assay, IL-18, inflammasome NLRP3, gouty arthritis, serum, uric acid, cytokines

Сокращения

МК – мочевая кислота; ИФА – Иммуноферментный анализ; IL-18 – интерлейкин-18; NLRP3 – инфламмосома NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-подобного рецепторного белка 3; PRRs – Pattern Recognition Receptors; PAMPs – Pathogen associated molecular patterns; DAMPs – Damage associated molecular patterns.

Введение

В настоящее время подагра рассматривается как системное аутовоспалительное заболевание,

вызванное активацией инфламмосомы NLRP3 (NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-подобного рецепторного белка 3) [14, 15]. Первые инфламмосомы были описаны исследовательской группой под руководством Юрга Чоппа в 2002 году [16]. Инфламмосомы обеспечивают работу врожденного иммунитета и защищают организм от патогенов и повреждения тканей. Любой сбой в механизме активации инфламмосом ведет к развитию так называемых «инфламмосомных» заболеваний. С открытием инфламмосом системные воспалительные болезни условно делятся на аутовоспалительные и аутоиммунные.

При аутоиммунных заболеваниях иммунная система теряет толерантность к собственным белкам и с помощью аутореактивных лимфоцитов атакует собственные ткани организма. При аутовоспалении идет активация врожденного иммунитета без участия аутореактивных лимфоцитов, что приводит к развитию тканевого повреждения при отсутствии аутоиммунных нарушений. К так называемым чисто аутовоспалительным заболеваниям относятся множественные виды периодических лихорадок, которые обусловлены мутациями в доменах инфламмасом, приводящих к постоянной активации инфламмасом и, соответственно, рецидивов воспаления, не связанных с инфекцией.

Была установлена связь между подагрическим синдромом и инфламмасомами вида NLRP3, и было показано, что инфламмасома NLRP3 индуцирует серию каскадных реакций воспаления за счет участия клеток крови – макрофагов, моноцитов и нейтрофилов [4, 7, 8]. Активация инфламмасом осуществляется путем самосборки инфламмасомного многомолекулярного комплекса в цитоплазме клеток в ответ на клеточное повреждение и инфекции. Исследователи смогли точно установить роль инфламмасы NLRP3 в патогенезе подагрического артрита [14]. 2-сигнальная система активации инфламмасы NLRP3 продемонстрирована на рисунке 1. Комбинация 2 сигналов опосредует и индуцирует серию каскадных реакций подагрического воспаления при участии клеток крови. Природа данных сигналов слишком многообразна и поэтому до конца не установлена (патогены, нуклеиновые кислоты, клеточные метаболиты, токсины и т. д.). Условно сигналы разделены на PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) и DAMPs (Damage associated molecular patterns). Считается, что сигнал 1 сенсibiliзирует (priming) клетки через PRRs (Pattern Recognition Receptors) и только после сенсibiliзации клеток наличие сигнала 2, которым может быть, в частности, мочевая кислота, вызывает активацию инфламмасом [15, 16]. Активированные инфламмасы NLRP3 способствуют высвобождению зрелых форм IL-1 β и IL-18 в окружающую среду, что имеет решающее значение для инициирования острой воспалительной реакции при обострении подагрического артрита. Долгое время считалось, что мочевая кислота вызывает воспаление через активацию инфламмасом NLRP3 только вследствие формирования кристаллов, но впоследствии оказалось, что растворимая мочевая кислота, проникая в клетки через специальные транспортеры, может также активировать инфламмасы NLRP3 [4, 6].

Изучение механизмов подагрического воспаления указывает на прямую связь между по-

дагрой и продукцией инфламмасом-регулируемого воспалительного цитокина IL-1 β [13]. IL-1 β -ингибирующая терапия с использованием моноклональных антител канакиумаб успешно применяется в лечении подагрического артрита [10, 11]. Поскольку вторым хорошо изученным инфламмасом-регулируемым цитокином является провоспалительный цитокин IL-18, крайне важно оценить роль данного цитокина в развитии подагры. Однако имеющиеся литературные данные об участии данного цитокина в развитии подагрического артрита часто демонстрируют противоречивые результаты [9]. Концентрация IL-18 в сыворотке потенциально здоровых доноров сильно варьирует и может достигать 1000 пг/мл, а при определенных патологиях, включая иммуновоспалительные ревматические заболевания, может быть и значительно выше, достигая микрограмм на мл [5]. Нужно отметить, что сывороточные значения инфламмасом-регулируемых интерлейкинов IL-1 β и IL-18 кардинально отличаются: IL-1 β обычно находится на границе уровня детекции $3,6 \pm 1,01$ пг/мл, а средний уровень IL-18 у практически здоровых доноров варьирует в пределах $267,1 \pm 14,63$ [3]. Предельно низкая концентрация IL-1 β и сильно варьируемая концентрация IL-18 в сыворотке человека осложняет использование данных биомаркеров для оценки цитокинового статуса пациентов с инфламмасомными заболеваниями. В связи с этим для оценки влияния различных иммуномодулирующих факторов на цитокиновый статус пациентов была предложена клеточная тест-система *in vitro*, основанная на клетках крови индивидуальных доноров [1]. Была продемонстрирована корреляция между содержанием IL-18 и повышенных концентраций мочевины в культуральной среде, содержащей клетки крови пациентов с диагнозом гиперурикемия [2]. В предыдущей работе нами была выдвинута гипотеза, что клетки крови пациентов, которые были сенсibiliзированы в условиях *in vivo* к присутствию специфичных факторов, характерных для того или иного заболевания, будут продуцировать другой спектр (или количественное соотношение) цитокинов, по сравнению с клетками крови потенциально здоровых доноров. В данной работе представлены результаты по проверке данной гипотезы на примере анализа инфламмасом-регулируемого цитокина IL-18, вырабатываемого в культуральную среду клеток крови индивидуальных пациентов с подагрическим артритом. Было проведено сравнение концентраций данного цитокина в сыворотке и в культуральной среде клеток крови тех же доноров в условиях *in vitro* с использованием гемотест-системы. Проведенное сравнение продемонстрировало преимущества использо-

вания клеточной гемотест-системы *in vitro* для оценки IL-18 цитокинового статуса пациентов с подагрическим артритом.

Материалом для исследования послужили образцы крови потенциально здоровых лиц из Самарской областной клинической станции переливания крови (ГБУЗ «СОКСПК») и образцы крови пациентов с диагнозом подагрический артрит из клиник Самарского государственного медицинского университета (клиники СамГМУ). В рамках проведения исследования была оформлена разрешительная документация Биоэтического комитета СамГМУ (протокол № 215 от 20.01.2021 г.). В 100% эпизодов ГБУЗ «СОКСПК» это были лица мужского пола. Пациенты из клиник СамГМУ были обоего пола. Характеристики пациентов с острой формой подагры представлены в таблице 1.

Отбор участников исследования из реестра доноров ГБУЗ «СОКСПК» производили рандомизировано. Каждый участник подписал добровольное информированное согласие на обработку персональных данных, а также на передачу

биологического материала (венозной крови) в рамках проводимого исследования. Венозную кровь забирали в вакуумные пробирки с ЭДТА (Kometaline, Россия). Процедуру проводили утром натощак. Вакутейнеры с кровью хранили при комнатной температуре не более 4 часов после забора крови.

Клеточная гемотест-система была использована как описано [2]. Кратко, цельную кровь разводили питательной средой RPMI (ООО «БиолоТ», Россия), содержащей 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ООО «БиолоТ», Россия). 200 мкл аликвоты 5-кратно разбавленной крови разливали по лункам 96-луночного планшета (TPP, Швейцария) в множественных репликах. Планшеты инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ в течение 22±4 часов. Через указанное время проводили отбор 100 мкл культуральной среды в 1.5 мл микропробирки, которые замораживали при -20°С для иммуноферментного анализа (ИФА). Образцы сывороток и культуральной среды клеток анализировали в соответствии с инструкциями производителя Иммуноферментного

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ПОДАГРИЧЕСКИМ АРТРИТОМ ИЗ КЛИНИК СамГМУ

TABLE 1. PROFILE OF PATIENTS WITH GOUTY ARTHRITIS FROM THE CLINICS OF THE SAMARA STATE MEDICAL UNIVERSITY

№ пациента Patient No.	П3 P3	П4 P4	П5 P5
Пол Sex	Жен. Female	Жен. Female	Муж. Male
Возраст Age	64	71	43
Диагноз клинический Clinical diagnosis	Подагрический артрит, тофусный Urarthritis, tophaceous	Подагрический артрит, интермиттирующий Urarthritis, intermittent	Подагрический артрит, тофусный Urarthritis, tophaceous
Максимальное МК / мкмоль/л (Обострение) Maximum UA / μmol/L (exacerbation)	520	480	620
Лекарства Drugs	н/о Unexamined (None of prescriptions)	Аллопуринол 100 мг; Лорноксикам 8 мг Allopurinol 100 mg; Lornoxicam 8 mg	Аллопуринол 100 мг; Лорноксикам 8 мг Allopurinol 100 mg; Lornoxicam 8 mg
МК после уратопонижающей терапии, мкмоль/л UA after urate-lowering therapy, μmol/L	н/о Unexamined	327,3	338,1
Сопутствующие заболевания Co-existing disease	ИБС Coronary artery disease	ИБС Coronary artery disease	Нет None
Дебют подагры Gout manifestation	3 года 3 years	15 лет 15 years	4 года 4 years

анализа (ИФА) АО «Вектор-Бест» (Россия). Чувствительность ИФА для IL-18 составляла 2 пг/мл.

Со станции переливания крови были выбраны три здоровых доноров с разным содержанием мочевой кислоты (МК) (195; 249,1; 374,9 мкмоль/л) и три пациента с подагрическим артритом (характеристики пациентов представлены в таблице 1), у которых в день забора крови МК в сыворотке составляла > 400 мкмоль/л (П4 = 405,9; П3 = 479,7 и П5 = 498,3). Концентрация IL-18 в сыворотке пациентов демонстрировала сильно варьируемые значения от 274 пг/мл до 1614 пг/мл (рис. 2). Усредненные значения концентраций IL-18 были выше у больных с подагрическим артритом ($918,23 \pm 603,13$) по сравнению с контрольной группой доноров ($552,22 \pm 366,72$), при этом среднестатистические отклонения превышали 50% отметку средних значений. В целом же не существовало прямой корреляции между концентрациями IL-18 и содержанием МК в сыворотках доноров. Культивируемые *in vitro* клетки крови тех

же самых доноров были использованы в качестве гемотест-системы для определения их способности продуцировать IL-18 в культуральную среду в условиях *in vitro*. Мы предположили, что *in vivo* сенсibilизированные клетки крови пациентов с диагнозом «подагрический артрит», которые подвергались пролонгированному воздействию повышенных концентраций мочевой кислоты (и/или других инфламмасом-активирующих молекул), будут по-другому продуцировать IL-18, чем клетки потенциально здоровых доноров, у которых уровень мочевой кислоты был в норме. В тот же день, используя тех же доноров, у которых определяли сывороточное содержание IL-18, было проведено сравнение IL-18 продукции клетками крови в культуральную среду в условиях *in vitro* с помощью гемотест-системы (рис. 2).

Сравнение значений IL-18 в сыворотке и в культуральной среде клеток крови доноров и пациентов с подагрическим артритом выявило существенные различия в продукции IL-18 (рис. 2).

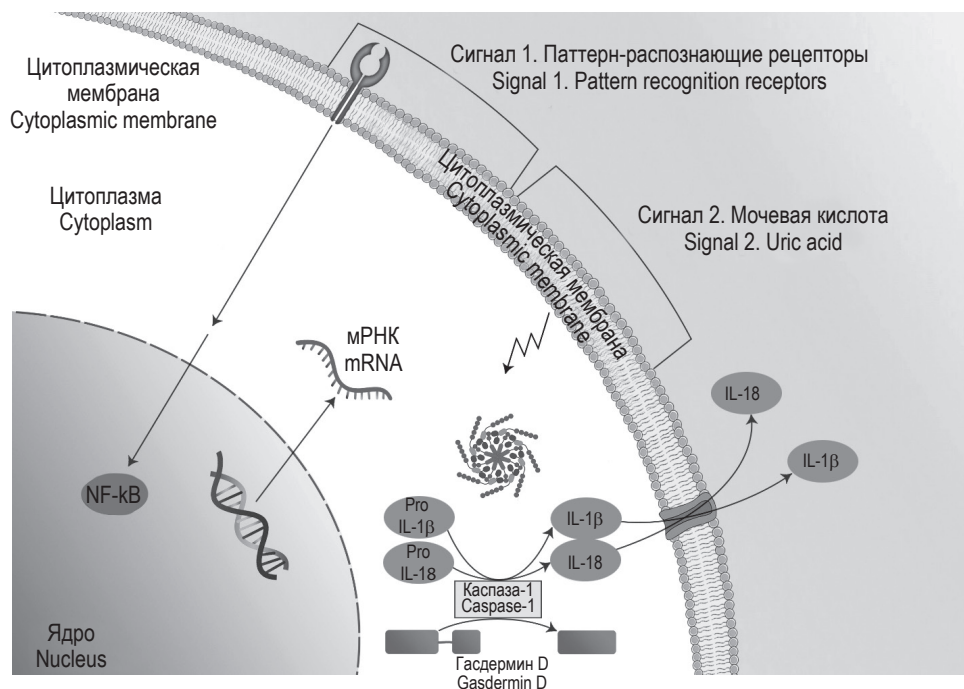


Рисунок 1. 2-сигнальная активация инфламмосомы NLRP3

Примечание. Активация инфламмосомы NLRP3 способствует высвобождению caspase-1, которая превращает неактивные формы про-IL-1β и про-IL-18 в активные IL-1β и IL-18 соответственно. Сигнал 1 при взаимодействии с паттерн-распознающими (PRR) рецепторами сенсibilизирует клетки (прайминг), вызывая активацию транскрипционного фактора NF-κB, который в свою очередь обеспечивает транскрипцию генов caspase-1 и про-IL-1β. мРНК данных генов деградирует в отсутствие Сигнала 2, которым могут служить различные стимуляторы, включая кристаллическую или растворимую форму мочевой кислоты. Только при наличии 2 сигналов идет образование Gasdermin-D – регулируемых мембранных пор и высвобождение зрелых форм интерлейкинов IL-1β и IL-18 в окружающую среду.

Figure 1. Two-signal pathway activation of the NLRP3 inflammasome

Note. Activated NLRP3 inflammasomes promote the release of Caspase-1, which converts the inactive forms of pro-IL-1β and pro-IL-18 to mature active IL-1β and IL-18, respectively. Signal 1 through the interaction with pattern recognition receptors (PRRs) sensitizes cells (priming), causing activation of the transcription factor NF-κB, which in turn ensures transcription of the caspase-1 and pro-IL-1β genes. The mRNA of these genes is degraded in the absence of Signal 2, which could be various stimulators, including crystalline or soluble forms of uric acid. The presence of 2 signals is required to form Gasdermin-D – regulated membrane pores and to release the mature forms of interleukins IL-1β and IL-18 into the extracellular environment.

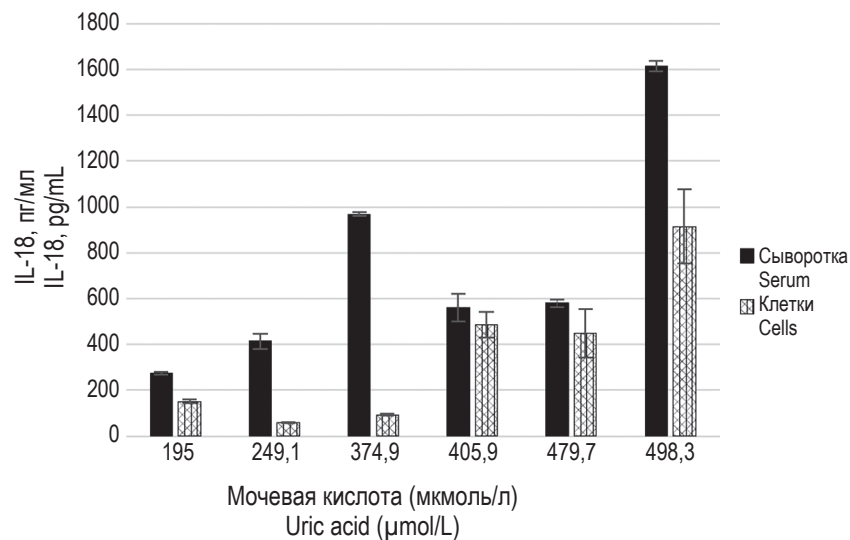


Рисунок 2. Сравнение концентраций IL-18 в сыворотках и культуральной среде гемотест-системы *in vitro*, содержащей клетки крови доноров (с показателями МК в крови 195, 249.5, 374.9 мкмоль/л) и пациентов с подагрическим артритом и гиперурикемией (с показателем МК 405,9; 479,7; 498,3 мкмоль/л)

Figure 2. Comparison of IL-18 concentrations in sera and cell growth media of cell-based hemotest *in vitro*, containing blood cells from donors (with uric acid values of 195, 249.5, 374.9 μmol/L) and patients with gouty arthritis and hyperuricemia (with uric acid values of 405.9, 479.7, 498.3 μmol/L)

Несмотря на индивидуальные вариации в продукции IL-18 существовала статистически значимая корреляция повышенной секреции IL-18 в культуральную среду гемотест-системы *in vitro*, содержащей клетки крови больных с подагрой по сравнению с клетками от здоровых доноров (рис. 2). Разница усредненных значений IL-18 в культуральной среде доноров и пациентов с подагрическим артритом была более выраженной по сравнению с сывороточными значениями и составляла $101,77 \pm 45,95$ (доноры) и $615,6 \pm 259,09$ (пациенты). При этом среднестатистические отклонения не превышали 50%-ную отметку средних значений. Таким образом, эти данные подтверждают нашу гипотезу, что клетки здоровых доноров и клетки пациентов, которые были сенсibilизированы в условиях *in vivo* к присутствию специфичных факторов, характерных для того или иного заболевания, будут продуцировать разное количество инфламмасом-регулируемых и, возможно, разный спектр других провоспалительных цитокинов, что позволит проводить более целенаправленную диагностику и прогнозирование развития заболевания. Согласно представленным данным, клетки крови пациентов с подагрическим артритом, которые в условиях *in vivo* находились пролонгированное время в присутствии повышенных концентраций МК, продолжали вырабатывать повышенные количества IL-18 в условиях *in vitro* по сравнению с клет-

ками здоровых доноров. За счет этого феномена значения IL-18 в культуральной среде, содержащей клетки крови пациентов с подагрой, были приближены к значениям IL-18 в сыворотке, а клетки доноров, у которых МК была в норме, продуцировали значительно меньшее количество цитокина по сравнению с концентрациями IL-18 в сыворотке этих доноров. Надо отметить, что в отличие от IL-1β транскрипция IL-18 имеет конститутивный характер [12]. Возможно, за счет конститутивного характера транскрипции IL-18 наблюдается накопительный эффект присутствия IL-18 в сыворотке доноров.

Представленные данные укладываются в общепринятую модель сенсibilизации клеток крови больных подагрой в условиях *in vivo*, хотя не исключают варианта, что не только МК, но и другие инфламмасом-активирующие факторы (PAMPs/DAMPs) могли также оказывать сенсibilизирующий эффект на клетки пациентов с подагрой. Эти данные позволяют рекомендовать масштабный скрининг продукции IL-18 у пациентов с подагрическим артритом для мониторинга заболевания. Недостатком этого исследования является маленькая выборка пациентов. Планируется провести более масштабированное сравнение IL-18 статуса пациентов с использованием клеточной гемотест-системы *in vitro* до и после применения лекарственных препаратов противовоспалительного, антицитокинового и

уратопонижающего действия. Возможно, введение индекса корреляции концентраций цитокинов/хемокинов для больных с хроническими аутовоспалительными заболеваниями позволит более точно проводить персонализированную диагностику. Другим перспективным направлением в использовании гемотест-системы *in vitro* является тестирование лекарственных препаратов, ингибирующих активность инфламмосомного воспаления, таких как колхицин и аникра (моноклональные антитела к IL-1 β). Получены предварительные результаты об эффективности использования данного подхода (данные не приведены). Таким образом, с помощью разработанной клеточной гемотест-системы *in vitro* обнаружены количественные различия в продукции воспалительного цитокина IL-18, вырабаты-

ваемых клетками крови потенциально здоровых доноров и пациентов с подагрическим артритом. Показано, что *in vitro* клетки крови пациентов, сенсibilизированные в условиях *in vivo* специфичными факторами, характерными для подагрического артрита, продуцируют в культуральную среду повышенные концентрации IL-18, чем клетки потенциально здоровых доноров.

Благодарности

Благодарим Рябова Н.А. и Данильченко О.П. за техническую поддержку и ценные предложения.

Финансирование

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

Список литературы / References

1. Волова Л.Т., Осина Н.К., Кузнецов С.И., Гусякова О.А., Алексеев Д.Г., Пугачев Е.И., Гончаренко С.А. Донор-специфичная продукция цитокинов клетками крови под влиянием иммуномодуляторов: новые аспекты персонализированного подхода в медицине // Наука и инновации в медицине, 2022. Т. 7, № 4. С. 250-257. [Volova L.T., Osina N.K., Kuznetsov S.I., Gusyakova O.A., Alekseev D.G., Pugachev E.I., Goncharenko S.A. Donor-specific production of cytokines by blood cells under the influence of immunomodulators: New aspects of a personalized approach in medicine. *Nauka i innovatsii v meditsine = Science and Innovations in Medicine*, 2022, Vol. 7, no. 4, pp. 250-257. (In Russ.)]
2. Волова Л.Т., Пугачев Е.И., Старикова Т.В., Лебедев П.А., Шафиева И.А., Кузнецов С.И., Гусякова О.А., Светлова Г.Н., Осина Н.К. *In vitro* клеточная гиперурикемическая гемотест-система для определения цитокинового статуса пациентов с подагрическим артритом // Наука и инновации в медицине, 2024. Т. 9, № 1. С. 14-21. [Volova L.T., Pugachev E.I., Starikova T.V., Lebedev P.A., Shafieva I.A., Kuznetsov S.I., Gusyakova O.A., Svetlova G.N., Osina N.K. *In vitro* cell-based Hyperuricemia-hemotest bioassay for cytokine status evaluation in patients with gouty arthritis. *Nauka i innovatsii v meditsine = Science and Innovations in Medicine*, 2024, Vol. 9, no. 1, pp. 14-21. (In Russ.)]
3. Зайцева Г.А., Вершинина О.А., Матрохина О.И., Сенькина Е.А., Карпова М.В. Цитокиновый статус доноров крови и её компонентов // Фундаментальные исследования, 2011. Т. 3. С. 61-65. [Zaitseva G.A., Verшинina O.A., Matrokhina O.I., Senkina E.A., Karpova M.V. Cytokine status of the donors of blood and its components. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2011, no. 3, pp. 61-65. (In Russ.)]
4. Малышев И.Ю., Пихлак А.Э., Буданова О.П. Молекулярные и клеточные механизмы воспаления при подагре // Научно-практический журнал «Патогенез», 2019. № 4. С. 4-13. [Malyshev I.Yu., Pihlak A.E., Budanova O.P. Molecular and cellular mechanisms of inflammation in gout. *Nauchno-prakticheskiy zhurnal "Patogenez" = Scientific and practical journal "Pathogenesis"*, 2019, no. 4, pp. 4-13. (In Russ.)]
5. Насонов Е.Л., Авдеева А.Л. Интерлейкин 18 при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях и COVID-19 // Наука и практика ревматологии, 2022. № 2. С. 195-204. [Nasonov E.L., Avdeeva A.S. Interleukin 18 in Immune-mediated rheumatic diseases and COVID-19. *Nauka i praktika revmatologii = Rheumatology Science and Practice*, 2022, no. 2, pp. 195-204. (In Russ.)]
6. Braga T.T., Forni M., Correa-Costa M., Ramos R., Barbuto J., Branco P., Castoldi A., Hiyane M., Davanso M., Latz E., Franklin B., Kowaltowski A., Camara N. Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 39884. doi: 10.1038/srep39884.
7. Cavalcanti N.G., Marques C., Lins e Lins T., Pereira M., Rêgo M., Duarte A., Pitta I., Pitta M. Cytokine profile in gout: inflammation driven by IL-6 and IL-18? *Immunol. Invest.*, 2016, Vol. 45, no. 5, pp. 383-395.
8. Giamarellos-Bourboulis E.J., Mouktaroudi M., Bodar E., van der Ven J., Kullberg B.J., Netea M.G., van der Meer J.W. Crystals of monosodium urate monohydrate enhance lipopolysaccharide-induced release of interleukin 1 β by mononuclear cells through a caspase 1-mediated process. *Ann. Rheum. Dis.*, 2009, Vol. 68, no. 2, pp. 273-278.
9. Inokuchi T., Moriwaki Y., Tsutsui H., Yamamoto A., Takahashi S., Tsutsumi Z., Ka T., Nakanishi K., Yamamoto T. Plasma interleukin (IL)-18 (interferon-gamma-inducing factor) and other inflammatory cytokines in patients with gouty arthritis and monosodium urate monohydrate crystal-induced secretion of IL-18. *Cytokine*, 2006, Vol. 33, no. 1, pp. 21-27.
10. Jena M., Tripathy A., Mishra A., Maiti R. Effect of canakinumab on clinical and biochemical parameters in acute gouty arthritis: a meta-analysis. *Inflammopharmacology*, 2021, Vol. 29, no. 1, pp. 35-47.

11. Jeria-Navarro S., Gomez-Gomez A., Park H., Calvo-Aranda E., Corominas H., Pou M., Diaz-Torne C. Effectiveness and safety of anakinra in gouty arthritis: A case series and review of the literature. *Front. Med. (Lausanne)*, 2023, Vol. 9, 1089993. doi: 10.3389/fmed.2022.1089993.
12. Kaplanski G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol. Rev.*, 2018, Vol. 281, no. 1, pp. 138-153.
13. Li G., Zhang H., Ma H., Qu S., Xing Q., Wang G. MiR-221-5p is involved in the regulation of inflammatory responses in acute gouty arthritis by targeting IL-1 β . *Int. J. Rheum. Dis.*, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 335-340.
14. Liu Y., Wang J., Li J. Role of NLRP3 in the pathogenesis and treatment of gout arthritis. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1137822. doi: 10.3389/fimmu.2023.1137822.
15. Martinon F. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 2006, Vol. 440, no. 7081, pp. 237-241.
16. Martinon F., Burns K., Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell.*, 2002. Vol. 10, no. 2, pp. 417-426.

Авторы:

Осина Н.К. — к.б.н., ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института «БиоТех» ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Волова Л.Т. — д.м.н., профессор, директор Научно-исследовательского института «БиоТех» ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Лебедев П.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой терапии с курсом функциональной диагностики, Институт профессионального образования ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Шафиева И.А. — к.м.н., заведующая отделением эндокринологии и ревматологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Пугачев Е.И. — научный сотрудник Научно-исследовательского института «БиоТех» ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Гончаренко С.А. — студент ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет», г. Самара, Россия

Кузнецов С.И. — к.м.н., ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института «БиоТех» ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Гусьякова О.А. — д.м.н., заведующая кафедрой фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Светлова Г.Н. — к.м.н., доцент кафедры факультетской терапии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Authors:

Ossina N.K., PhD (Biology), Leading Research Associate, Research Center "BioTech", Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Volova L.T., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Center "BioTech", Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Lebedev P.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Therapy with a Course of Functional Diagnostics, Institute of Postgraduate Education, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Shafieva I.A., PhD (Medicine), Head, Department of Endocrinology and Rheumatology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Pugachev E.I., Research Associate, Research Center "BioTech", Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Goncharenko S.A., Student, Samara State Technical University, Samara, Russian Federation

Kuznetsov S.I., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Center "BioTech", Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Gusyakova O.A., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Fundamental and Clinical Biochemistry with Laboratory Diagnostics, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Svetlova G.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Faculty Therapy Department, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Поступила 31.03.2024

Отправлена на доработку 06.04.2024

Принята к печати 18.04.2024

Received 31.03.2024

Revision received 06.04.2024

Accepted 18.04.2024

ПРОТОЧНО-ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К РАЗЛИЧНЫМ ЭПИТОПАМ МОЛЕКУЛЫ БТШ70 С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ И МЕМБРАНО- АССОЦИИРОВАННЫМИ ФОРМАМИ ЭТОГО ПРОТЕИНА

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

¹ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. 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. В настоящее время накопилось большое число сведений о том, что многие разновидности опухолевых клеток, в отличие от их нетрансформированных форм, характеризуются транслокацией внутриклеточных белков теплового шока 70 кДа (БТШ70) на поверхность плазматической мембраны. Это позволило отнести БТШ70, экспонированные на клеточной поверхности, к опухоль-ассоциированным антигенам и явилось основанием для поиска возможностей практического использования данного феномена в клинической онкологии. Существенным аргументом в пользу перспективности таких исследований послужила обнаруженная способность БТШ70, представленных на поверхности клеток-мишеней, усиливать цитотоксическую активность НК-клеток. В связи с этим, работы многих исследовательских групп посвящены разработке подходов к повышению уровня мембрано-ассоциированных БТШ70 в опухолевых тканях. В то же время, учитывая присутствие таких протеинов на поверхности многих разновидностей опухолевых клеток, в качестве одного из перспективных подходов можно рассматривать применение для противоопухолевой терапии моноклональных антител, взаимодействующих с молекулами БТШ70. Хорошо известно, что препараты антител, селективно взаимодействующих с раковыми клетками, могут применяться для таргетной противоопухолевой иммунотерапии.

Ранее нами была получена панель из шести В-клеточных гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к индуцируемой и конститутивной формам БТШ70 человека, направленные к раз-

Адрес для переписки:

Овсяникова Ольга Викторовна
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»
119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1.
Тел.: 8 (495) 330-40-11.
E-mail: olgaovsyanickova@yandex.ru

Address for correspondence:

Olga V. Ovsyanikova
Lomonosov Moscow State University
1 Leninskie Gory
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (495) 330-40-11.
E-mail: olgaovsyanickova@yandex.ru

Образец цитирования:

О.В. Овсяникова, О.А. Шустова, М.В. Гречихина,
А.М. Сапожников «Проточно-цитометрический
анализ взаимодействия моноклональных антител
к различным эпитопам молекулы БТШ70
с внутриклеточными и мембрано-ассоциированными
формами этого протеина» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 905-912.
doi: 10.15789/1563-0625-FCA-16716

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

For citation:

O.V. Ovsyanikova, O.A. Shustova, M.V. Grechikhina,
A.M. Sapozhnikov "Flow cytometric analysis of the interaction
of monoclonal antibodies to various epitopes of the HSP70
molecule with intracellular and membrane-associated forms
of this protein", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 905-912.
doi: 10.15789/1563-0625-FCA-16716

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

DOI: 10.15789/1563-0625-FCA-16716

личным эпитопам этой молекулы. Существенно, что три разновидности гибридом из этой панели, продуцируют антитела со специфичностью к сайтами связывания на С-концевом домене молекулы БТШ70, а вторая тройка моноклонов антител была специфична к эпитопам на N-концевом домене БТШ70, в то время как практически все известные коммерческие антитела взаимодействуют только с С-концевыми фрагментами БТШ70. В данной работе мы провели сравнительное исследование связывания полученных антител с этими протеинами, локализующимися в разных типах клеток как во внутриклеточном пространстве, так и на клеточной поверхности.

Полученные результаты позволяют рассматривать выявленные разновидности моноклональных антител, наиболее эффективно распознающих поверхностные БТШ70, как перспективную основу для создания новых препаратов для противоопухолевой иммунотерапии.

Ключевые слова: белки теплового шока, БТШ70, моноклональные антитела, противоопухолевая иммунотерапия, линии опухолевых клеток, проточно-цитометрический анализ

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF THE INTERACTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO VARIOUS EPITOPES OF THE HSP70 MOLECULE WITH INTRACELLULAR AND MEMBRANE-ASSOCIATED FORMS OF THIS PROTEIN

Ovsyanikova O.V.^{a,b}, Shustova O.A.^a, Grechikhina M.V.^a, Sapozhnikov A.M.^a

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

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Currently, a large amount of data has demonstrated that many types of tumor cells, in contrast to their non-transformed forms, are characterized by the translocation of intracellular heat shock proteins 70 kDa (HSP70) to the surface of the plasma membrane. This made it possible to classify HSP70 exposed on the cell surface as a tumor-associated antigen and was the basis for searching the opportunities for the practical use of this phenomenon in clinical oncology. A significant argument in favor of the prospects of such studies was the discovered ability of HSP70, present on the surface of target cells, to enhance the cytotoxic activity of NK cells. In this regard, the work of many research groups is devoted to developing approaches to increasing the level of membrane-associated HSP70 in tumor tissues. At the same time, given the presence of such proteins on the surface of many types of tumor cells, the use of monoclonal antibodies that interact with HSP70 molecules for antitumor therapy can be considered as one of the promising approaches. It is well known that antibody preparations that selectively interact with cancer cells can be used for targeted antitumor immunotherapy. Previously, we obtained a panel of six B cell hybridomas producing monoclonal antibodies to the inducible and constitutive forms of human HSP70, directed to various epitopes of this molecule. It is significant that three varieties of hybridomas produced antibodies with specificity for binding sites on the C-terminal domain of the HSP70 molecule, and the second trio of monoclonal antibodies were specific to epitopes on the N-terminal domain of HSP70, while almost all known commercial antibodies interact only with C-terminal fragments of HSP70. In this work, we conducted a comparative study of the binding of the obtained antibodies to these proteins localized in different types of cells, both in the intracellular space and on the cell surface.

The results obtained allow us to consider the identified varieties of monoclonal antibodies that most effectively recognize surface HSP70 as a promising basis for the creation of new drugs for antitumor immunotherapy.

Keywords: heat shock proteins, HSP70, monoclonal antibodies, antitumor immunotherapy, tumor cell lines, flow cytometric analysis

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

Введение

Белки теплового шока 70 кДа (БТШ70) принадлежат к большому семейству стресс-индуцируемых протеинов (белков теплового шока, БТШ). Одной из основных функций данных молекул является защита внутриклеточных протеинов от повреждающих воздействий стрессирующих факторов различной природы [6]. Наряду с этим, БТШ играют важную роль в жизнедеятельности клеток в нормальных физиологических условиях, взаимодействуя с широким спектром внутриклеточных протеинов и выполняя вспомогательные, так называемые шаперонные, функции. Указанные функции БТШ реализуются во внутриклеточном пространстве, однако в ряде случаев эти протеины обнаруживаются также на клеточной поверхности и во внеклеточной среде. Такая необычная локализация наиболее характерна для БТШ70, являющихся одними из основных представителей семейства БТШ. В частности, БТШ70 обнаруживают на поверхности опухолевых и вирус-инфицированных клеток [4, 5, 11]. В наших предыдущих исследованиях было продемонстрировано, что процессы транслокации БТШ70 на клеточную поверхность наблюдаются в культурах линий опухолевых лимфоидных клеток [7]. Установлено, что транспорт БТШ70 на клеточную поверхность осуществляется с помощью неклассического, аппарат Гольджи независимого механизма. Было также обнаружено, что транслокация БТШ70 на клеточную поверхность усиливается на заключительных этапах апоптоза и направлена, вероятно, на стабилизацию мембраны погибающих клеток [8]. Наряду с этим, наши данные свидетельствовали о том, что включение БТШ70 в состав плазматической мембраны может быть связано с необходимостью поддержания ионного гомеостаза опухолевых клеток [9].

Феномен экспрессии БТШ70 на поверхности опухолевых клеток явился поводом для изучения не только механизмов этого процесса, но и для поиска возможностей практического использования данного явления в клинической онкологии. Отсутствие БТШ70 на поверхности нормальных клеток свидетельствует об уникальности этих протеинов, и локализацию их на поверхности плазматической мембраны, можно рассматривать в качестве опухоли-ассоциированного маркера. Принимая во внимание активизирующее действие поверхностных БТШ70 на цитотоксическую активность НК-клеток по отношению к таким клеткам-мишеням [5, 10],

один из предложенных подходов основан на разработке препаратов, стимулирующих транслокацию цитоплазматических БТШ70 на поверхность раковых клеток. Однако наиболее привлекательным и перспективным подходом, на наш взгляд, является использование для противоопухолевой иммунотерапии моноклональных антител, эффективно взаимодействующих с БТШ70, представленными на поверхности опухолевых клеток. Хорошо известно, что препараты антител, селективно взаимодействующих с раковыми клетками, могут применяться для таргетной противоопухолевой иммунотерапии [1, 2].

Ранее нами была получена панель из шести В-клеточных гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к индуцируемой и конститутивной формам БТШ70 человека, направленным к различным эпитопам этой молекулы. Для расширения спектра аналитических возможностей создаваемой панели гибридом мы были заинтересованы в получении продуцентов моноклональных антител, направленных как к С-, так и к N-концевым участкам молекулы БТШ70, поскольку практически все известные коммерческие антитела взаимодействуют только с С-концевыми фрагментами БТШ70. В результате, нами были получены три разновидности гибридом, продуцирующие антитела с сайтами связывания на С-концевом домене молекулы БТШ70 (2E4, 4F11, 2F3), и вторая тройка моноклонов антител (6G2, 2E5, 3C5), направленных к эпитопам на N-концевом домене БТШ70 [3]. В данной работе мы с помощью метода проточной цитометрии провели сравнительное исследование связывания полученных антител с этими протеинами, локализующимися в разных типах клеток как во внутриклеточном пространстве, так и на клеточной поверхности.

Материалы и методы

В работе использовались опухолевые клетки человека: клеточные линии К-562 – хроническая миелогенная лейкемия; U-937 – гистиоцитарная лимфома. Клетки культивировались в культуральных флаконах (25 см², Costar, США) в питательной среде RPMI 1640 (Flow Laboratories, Великобритания), содержащей 10% фетальной сыворотки плода тельца (FCS), 50 мкг/мл стрептомицина (ОАО «Синтез», Россия) и 50 мкг/мл пенициллина (ПАО «Биосинтез», Россия) в 5% CO₂ при +37 °С, или в условиях умеренного стресса – тепловой шок, +43 °С, 10 мин.

Образцы периферической крови были получены от здоровых доноров. Фракции нейтрофилов и мононуклеаров получали из образцов путем центрифугирования (400 g 30 мин) на ступенчатом градиенте плотности фиколла 1,114 и

1,077 г/мл соответственно. Клетки двукратно отмывали и ресуспендировали в растворе Хенкса для дальнейшего использования в опытах. Тепловой шок проводили путем нагревания пробирки с суспензией клеток на водяной бане при 43 °С в течение 10 мин.

Для определения содержания БТШ70 в нейтрофилах и мононуклеарах использовали специальный набор для анализа внутриклеточных протеинов (BD Cytofix/Cytoperm™, BD Biosciences, США) в соответствии с протоколом компании-производителя. Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание БТШ70 выполняли с помощью моноклональных антител, полученных от гибридом нашей панели (2E4, 4F11, 2F3, 6G2, 2E5, 3C5) и коммерческих антител BRM22 (Sigma, США) при 4 °С в течение 30 мин. В качестве вторых антител использовали флуоресцентномеченые Fab-фрагменты кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши (Sigma, США). Средний уровень флуоресценции клеток измеряли с помощью метода проточной цитометрии.

Цитометрические измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США). В каждом образце анализировали не менее 10 000 событий. Обработку полученных результатов проводили с помощью программы CellQuest.

Результаты и обсуждение

Как было упомянуто выше, нами была получена панель из шести гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к БТШ70, направленные к различным эпитопам этой молекулы. Проведенные методом проточной цитофлуориметрии исследования обнаружили существенные различия между группами антител специфичных к С- или N-домену БТШ70 по окрашиванию внутриклеточного пула этих молекул в мононуклеарах и гранулоцитах периферической крови человека. Ранее для подобных измерений мы использовали коммерческие антитела BRM22 (Sigma, США), взаимодействующие с С-доменом как конститутивной, так и индуцируемой форм БТШ70, экспрессируемыми широким спектром биологических видов, включая человека. Поэтому в данную серию экспериментов мы включили эти антитела как хорошо охарактеризованный стандарт. Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание БТШ70 всеми разновидностями антител проводили с помощью специального набора для анализа внутриклеточных протеинов (BD Cytofix/Cytoperm™, BD Biosciences, США) в соответствии с протоколом компании-производителя. В качестве вторых антител использовали специфичные к иммуноглобулинам мыши Fab-фрагменты кроличьих антител, конъюгирован-

ных с флуорохромом ФИТЦ (Sigma, США). Проточно-цитометрические измерения проводили на приборе FACScan (Becton Dickinson, США).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования разработанной нами панели антител для анализа уровня экспрессии БТШ70 лейкоцитами человека с помощью метода проточной цитометрии. При этом оказалось, что все протестированные моноклоны различаются по степени распознавания внутриклеточных БТШ70. Особенно существенные различия по окрашиванию БТШ70, экспрессируемых мононуклеарами и гранулоцитами периферической крови человека, наблюдались между группами антител, специфичных к С- и N-домену этого протеина. Так, уровень флуоресценции этих клеток, окрашенных антителами 2E4, 2F3 и 2E11 (специфичными к С-домену БТШ70) превышал таковой для клеток, окрашенных моноклонами 6G2, 2E5 и 3C5 (специфичными к N-домену БТШ70), в среднем более чем в шесть раз (табл. 1).

Изложенные результаты проведенного тестирования полученной нами панели моноклональных антител демонстрируют не только возможность применения этих моноклонов для анализа внутриклеточного содержания БТШ70 в лейкоцитах человека. Эти данные свидетельствуют также о том, что все шесть моноклонов имеют различные сайты связывания в молекуле БТШ70, поскольку выявляемый ими уровень экспрессии БТШ70 в одних и тех же образцах клеток достоверно различается. Очевидно, что указанные различия свойств антител могут позволить получить дополнительную информацию о состоянии пула внутриклеточных БТШ70, т. к. экспонирование тех или иных сайтов на поверхности молекулы протеина тесно связано с ее конформационными изменениями, с процессами агрегации и с взаимодействиями с другими внутриклеточными молекулами.

Проведенные исследования обнаружили также существенные различия между группами антител специфичных к С- или N-домену БТШ70 по окрашиванию внутриклеточного пула этих молекул у двух протестированных линий опухолевых клеток (K562, U937) человека. Так, уровень флуоресценции клеток, окрашенных антителами 2E4, 2F3 и 2E11 (специфичными к С-домену БТШ70), существенно варьировал и превышал таковой для клеток, окрашенных моноклонами 6G2, 2E5 и 3C5 (специфичными к N-домену БТШ70) (рис. 1). При этом оказалось, что выявляемые тестируемыми антителами уровни экспрессии БТШ70 в одних и тех же образцах клеток достоверно отличались, что иллюстрирует на-

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОТОЧНО-ЦИТОМЕТРИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПАНЕЛИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К БТШ70 ДЛЯ АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ ЭТИХ ПРОТЕИНОВ В МОНОНУКЛЕАРАХ И НЕЙТРОФИЛАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

TABLE 1. RESULTS OF FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF THE POSSIBILITY OF USING THE PANEL OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO HSP70 TO DETECT THE CONTENT OF THESE PROTEINS IN MONONUCLEAR CELLS AND NEUTROPHILS OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD

Моноклон Monoclonе	Относительный уровень флуоресценции Relative fluorescence level			
	Донор 1 Donor 1		Донор 2 Donor 2	
	Мононуклеары Mononuclears	Нейтрофилы Neutrophils	Мононуклеары Mononuclears	Нейтрофилы Neutrophils
BRM22	27,2	9,9	13,0	6,5
2E4	116,2	129,5	51,6	98,2
2F3	423,0	588,1	118,5	485,4
2E11	91,7	193,9	48,5	166,4
6G2	5,0	15,4	5,6	14,9
2E5	8,2	11,7	7,6	28,7
3C5	8,0	21,4	9,6	17,9

правленность моноклонов к различным эпитопам молекулы-мишени.

Но наиболее интересные результаты были получены при использовании анализируемой панели антител для детекции БТШ70, экспонированных на клеточной поверхности. Известно, что необычная поверхностная локализация этих протеинов, не свойственная нормальным клет-

кам, может наблюдаться в разных типах опухолевой ткани, в том числе у лимфоидных клеток [6]. Причем было показано, что для выявления мембрано-ассоциированных БТШ70 необходимы антитела, направленные к определенным участкам данной молекулы [9]. Результаты проведенных нами экспериментов свидетельствовали о больших различиях между моноклонами из ана-

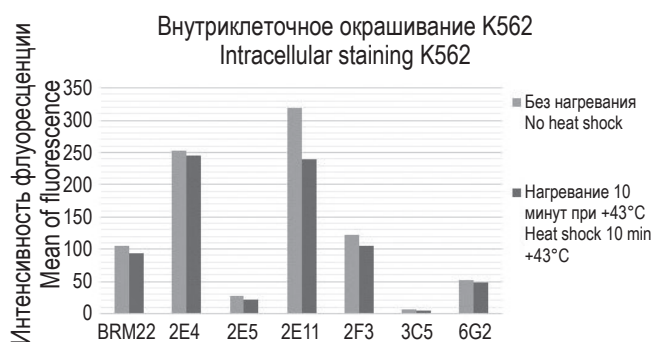
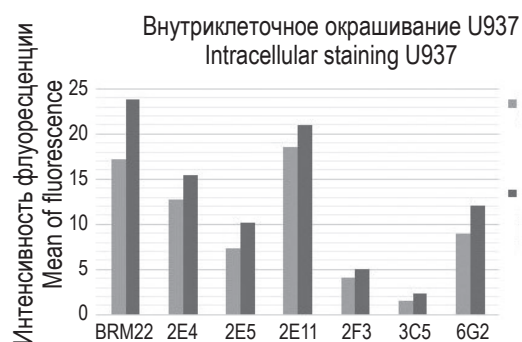


Рисунок 1. Результаты проточно-цитометрического анализа внутриклеточного окрашивания двух линий опухолевых клеток тестируемой панелью моноклональных антител к БТШ70 и коммерческими антителами BRM22 в нормальных условиях и после воздействия на клетки теплового шока (43 °С, 10 мин)

Примечание. На шкале ординат отложены зарегистрированные средние уровни флуоресценции окрашенных клеток за вычетом уровня флуоресценции в контроле (окрашивание только вторыми антителами).

Figure 1. Results of flow cytometric analysis of intracellular staining of two tumor cell lines with a tested panel of monoclonal antibodies to HSP70 and commercial antibodies BRM22 under normal conditions and after exposure of cells to heat shock (43 °C, 10 min)

Note. The ordinate scale shows the recorded average fluorescence levels of stained cells minus the fluorescence level in the control (staining with second antibodies only).

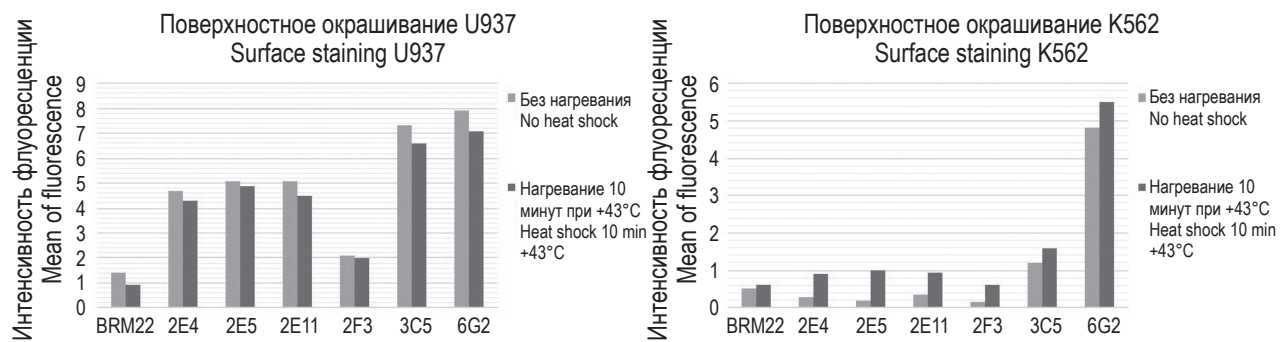


Рисунок 2. Результаты проточно-цитометрического анализа окрашивания поверхности двух линий опухолевых клеток тестируемой панелью моноклональных антител к БТШ70 и коммерческими антителами BRM22 в нормальных условиях и после воздействия на клетки теплового шока (43 °С, 10 мин)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Results of flow cytometric analysis of surface staining of two tumor cell lines with a tested panel of monoclonal antibodies to HSP70 and commercial BRM22 antibodies under normal conditions and after exposure of cells to heat shock (43 °С, 10 min)

Note. As for Figure 1.

лизируемой панели антител по их способности связываться с БТШ70, присутствующими на поверхности опухолевых клеток K562 и U937. Оказалось, что из числа шести полученных нами разновидностей антител, два моноклона (6G2 и 3C5) характеризуются значительно более высокой чувствительностью к мембрано-ассоциированному БТШ70 по сравнению не только с остальными моноклонами из нашей панели, но и со всеми протестированными нами коммерческими анти-БТШ70 антителами (рис. 2).

Заключение

Представленные данные продемонстрировали существенные различия в связывании шести разновидностей полученных нами монокло-

нальных антител с молекулами БТШ70, локализующимися во внутриклеточном пространстве и на поверхности нормальных и опухолевых клеток. Наиболее важным результатом данного исследования явилось выявление в составе анализируемой панели антител, обладающих способностью к детекции поверхностных БТШ70 с чувствительностью, значительно превышающей таковую для остальных разновидностей антител из состава этой панели и для широкого спектра протестированных нами коммерческих анти-БТШ70 антител. Указанные результаты позволяют рассматривать выявленные разновидности моноклональных антител, наиболее эффективно распознающих поверхностные БТШ70, как перспективную основу для создания новых препаратов для противоопухолевой иммунотерапии.

Список литературы / References

1. Abès R., Teillaud J.L. Modulation of tumor immunity by therapeutic monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev.*, 2011, Vol. 30, no. 1, pp. 111-124.
2. Bodey B., Siegel S.E., Kaiser H.E. Human cancer detection and immunotherapy with conjugated and non-conjugated monoclonal antibodies. *Anticancer Res.*, 1996, Vol. 16, no. 2, pp. 661-674.
3. Boyko A.A., Vetchinin S.S., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I. Changes in the heat shock 70 kDa protein level in human neutrophils induced by heat shock. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2014, Vol. 40, no. 5, pp. 488-498.
4. Moseley P.L. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1998, Vol. 856, pp. 206-213.
5. Multhoff G., Botzler C., Jennen L., Schmidt J., Ellwart J., Issels R. Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J. Immunol.*, 1997, Vol. 158, pp. 4341-4350.
6. Parsell D.A., Kowal A.S., Singer M.A., Lindquist S. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*, 1994, Vol. 372, no. 6505, pp. 475-478.
7. Sapozhnikov A.M., Ponomarev E.D., Tarasenko T.N., Telford G.W. Spontaneous apoptosis and expression of cell surface heat shock proteins in cultured EL-4 lymphoma cells. *Cell Prolif.*, 1999, Vol. 32, pp. 363-378.

8. Sapozhnikov A.M., Gusarova G.A., Ponomarev E.D., Telford W.G. Translocation of cytoplasmic HSP70 onto the surface of EL-4 cells during apoptosis. *Cell Prolif.*, 2002, Vol. 35, pp. 193-206.
9. Sapozhnikov A.M., Baev D.V., Gusarova G.A. Involvement of heat shock proteins in the phenomenon of cell protection against apoptosis mediated by inhibitors of plasma membrane chlorine channels. *Dokl. Biol. Sci.*, 2002, Vol. 384, pp. 206-208.
10. Stangl S., Gehrmann M., Riegger J., Kuhs K., Riederer I., Sievert W., Hube K., Mocikat R., Dressel R., Kremmer E., Pockley A.G., Friedrich L., Vigh L., Skerra A., Multhoff G. Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *PNAS*, 2011, Vol. 108, pp. 733-738.
11. Stangl S., Tontcheva N., Sievert W., Shevtsov M., Niu M., Schmid T.E., Pigorsch S., Combs S.E., Haller B., Balermipas P., Rödel F., Rödel C., Fokas E., Krause M., Linge A., Lohaus F., Baumann M., Tinhofer I., Budach V., Stuschke M., Grosu A.L., Abdollahi A., Debus J., Belka C., Maihöfer C., Mönnich D., Zips D., Multhoff G. Heat shock protein 70 and tumor-infiltrating NK cells as prognostic indicators for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck after radiochemotherapy: A multicentre retrospective study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Int. J. Cancer*, 2018, Vol. 142, no. 9, pp. 1911-1925.

Авторы:

Овсяникова О.В. — аспирант 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

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

Authors:

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

Shustova O.A., Junior Research Associate, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

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

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

Сапожников А.М. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

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

Поступила 01.04.2024

Отправлена на доработку 06.04.2024

Принята к печати 18.04.2024

Received 01.04.2024

Revision received 06.04.2024

Accepted 18.04.2024

ЭКСПРЕССИЯ ЧЕК-ПОИНТ-МОЛЕКУЛ ПОПУЛЯЦИЯМИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Останин А.А., Баторова Д.С., Сизикова С.А., Крукович А.Б.

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

Резюме. При множественной миеломе (ММ) повышено содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих «чек-поинт»-молекулы PD-1, TIM-3, LAG-3 и др. Важную роль в патогенезе ММ также играют регуляторные Т-клетки (Treg), способные подавлять противоопухолевый иммунный ответ. Подобно эффекторным Т-лимфоцитам, часть Treg экспрессирует чек-поинт-рецепторы PD-1, TIM-3 и др., однако биологический смысл такой экспрессии, а также последствия блокады этих рецепторов не ясны. Также остается не изученным значение регуляторных Т-клеток I типа (Tr1), продуцирующих иммуносупрессорный цитокин интерлейкин-10, при ММ. Целью настоящей работы было изучение содержания PD-1- и TIM-3-экспрессирующих Treg и Tr1 у больных ММ.

В исследование были включены 36 больных ММ и 24 сопоставимых здоровых донора. Содержание популяций CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺Treg и IL-10-продуцирующих CD4⁺IL-10⁺Tr1, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, оценивали в периферической крови (ПК) и костном мозге (КМ) методом проточной цитометрии.

Относительное содержание циркулирующих CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺Treg и IL-10-продуцирующих CD4⁺IL-10⁺Tr1 было значимо выше у больных ММ по сравнению со здоровыми донорами. Было отмечено более высокое по сравнению с Treg относительное содержание IL-10-продуцирующих Т-лимфоцитов. Относительное содержание Treg и Tr1 в образцах КМ значимо не отличалось от показателей ПК. Доля Treg, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, у больных ММ значимо не отличалась от значений здоровых доноров. Содержание PD-1- и TIM-3-позитивных CD4⁺IL-10⁺Т-клеток было значимо выше в образцах ПК больных ММ по сравнению с донорами.

IL-10-продуцирующие CD4⁺Т-клетки составляют значительную долю Т-лимфоцитов в ПК и КМ больных ММ и могут играть важную роль в патогенезе ММ. Их содержание превосходит количество CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺Treg. Относительно небольшое количество Treg экспрессирует чек-поинт-рецепторы PD-1 и TIM-3, не отличаясь от показателей доноров. Доля PD-1-/TIM-3-позитивных клеток составляет ~20 % CD4⁺IL-10⁺Т-клеток и значимо превышает значения здоровых лиц.

Ключевые слова: регуляторные Т-клетки, Tr1, IL-10, PD-1, TIM-3, множественная миелома

Адрес для переписки:

Останин Александр Анатольевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
E-mail: ostanin62@mail.ru

Address for correspondence:

Aleksander A. Ostanin
Research Institute of Fundamental
and Clinical Immunology
14 Yadrinsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone +7 (383) 228-21-01.
E-mail: ostanin62@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Останин, Д.С. Баторова, С.А. Сизикова,
А.Б. Крукович «Экспрессия чек-поинт-молекул
популяциями регуляторных Т-клеток при
множественной миеломе» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 913-918.
doi: 10.15789/1563-0625-EOC-16849

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

For citation:

A.A. Ostanin, D.S. Batorova, S.A. Sizikova, A.B. Krukovich
“Expression of checkpoint molecules by regulatory T cells
in multiple myeloma”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5,
pp. 913-918.
doi: 10.15789/1563-0625-EOC-16849

© Ostanin A.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EOC-16849

EXPRESSION OF CHECKPOINT MOLECULES BY REGULATORY T CELLS IN MULTIPLE MYELOMA

Ostanin A.A., Batorova D.S., Sizikova S.A., Krukovich A.B.

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

Abstract. In multiple myeloma (MM), the content of T lymphocytes expressing “checkpoint” molecules PD-1, TIM-3, LAG-3, etc. is increased. Regulatory T cells (Treg) can suppress antitumor immune response and play a sufficient role in MM pathogenesis. Like effector T lymphocytes, some Tregs express checkpoint receptors PD-1, TIM-3, etc., however, the biological meaning of such expression, as well as the consequences of blockade of these receptors, are not clear. The significance of type I regulatory T cells (Tr1), which produce the immunosuppressive cytokine interleukin-10, in MM also remains unexplored. The purpose of this work was to study the content of PD-1- and TIM-3-expressing Tregs and Tr1 in patients with MM. The study included 36 patients with MM and 24 matched healthy donors. The content of CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺Tregs and IL-10-producing CD4⁺IL-10⁺Tr1 populations expressing PD-1 and TIM-3 was assessed in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) by flow cytometry. The relative content of circulating CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺Tregs and IL-10-producing CD4⁺IL-10⁺Tr1 was significantly higher in MM patients compared to healthy donors. A higher relative content of IL-10-producing T lymphocytes was noted compared to Treg. The relative content of Tregs and Tr1 in BM samples did not differ significantly from PB values. The proportion of Tregs expressing PD-1 and TIM-3 in patients with MM did not differ significantly from the values in healthy donors. The content of PD-1- and TIM-3-positive CD4⁺IL-10⁺T cells was significantly higher in PB samples from MM patients compared to donors.

IL-10-producing CD4⁺T cells constitute a significant proportion of T lymphocytes in the PB and BM of patients with MM and may play an important role in the pathogenesis of MM. Their content exceeds that of CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺Treg. A relatively small number of Tregs express the checkpoint receptors PD-1 and TIM-3, no different from donors. The proportion of PD-1-/TIM-3-positive cells is ~20% of CD4⁺IL-10⁺T cells and significantly exceeds the values of healthy individuals.

Keywords: regulatory T cells, Tr1, IL-10, PD-1, TIM-3, multiple myeloma

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00399.

Введение

При множественной миеломе (ММ), как и при других неопластических процессах, повышена доля как активированных, так и дисфункциональных Т-лимфоцитов, экспрессирующих «чек-поинт»-молекулы PD-1, TIM-3, LAG-3 и др. [4]. Блокада анти-PD-1 таргетными препаратами в клинической практике и анти-TIM-3 в экспериментальных работах приводит к усилению противоопухолевого иммунного ответа. На анти-PD-1 терапию хорошо отвечают многие солидные опухоли, классическая лимфома Ходжкина и отдельные неходжкинские лимфомы. При этом применение подобной таргетной иммунотерапии может приводить к развитию вторичной резистентности, аутоиммунных осложнений и гиперпрогрессии опухоли [6]. Клинические испытания анти-PD-1 моноклональных антител при ММ были прерваны в связи с тяжелыми побочными реакциями и снижением показателей выживаемости [14]. Тем не менее продолжает рассматриваться возможность применения ингибиторов чек-поинт-молекул после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Важную роль во взаимодействиях клеток опухоли и иммунной системы играют регуляторные Т-клетки (Treg), способные подавлять иммунный ответ. Увеличение содержания Treg при ММ ассоциировано с прогрессией заболевания [4].

Известно, что подобно эффекторным Т-лимфоцитам часть Treg экспрессирует чек-поинт-рецепторы PD-1, TIM-3 и др., однако биологический смысл такой экспрессии, а также последствия блокады этих рецепторов не ясны. В работах *in vitro* и мышинных моделях показано, что Treg, экспрессирующие рецепторы PD-1 или TIM-3, являются активированными клетками [13]. Контакт с соответствующими лигандами, в отличие от эффекторных Т-клеток, потенцирует функциональную активность Treg, а анти-PD-1/TIM-3 блокада, наоборот, приводит к ограничению супрессорного потенциала.

Кроме того, экспрессия PD-1 может быть связана с регуляторными Т-клетками 1-го типа

(Tr1), продуцирующими иммуносупрессорный цитокин IL-10 [12]. Клиническое значение Tr1 при MM остается во многом не изученным.

При клиническом применении анти-PD-1 моноклональных антител было продемонстрировано, что данная терапия может приводить не к описанному выше снижению активности Treg, а к их активации, подобно тому, как это происходит с дисфункциональными эффекторными PD-1⁺T-клетками, на которые направлено действие античек-поинт ингибиторов. Клинически увеличение количества и активация PD-1⁺Treg ассоциированы с гиперпрогрессией опухоли [10]. Можно ли рассматривать активацию Treg в качестве одного из механизмов, опосредовавших отрицательные результаты анти-чек-поинт-терапии при MM, не известно.

Целью настоящей работы было изучение содержания PD-1- и TIM-3-экспрессирующих Treg и Tr1 у больных MM.

Материалы и методы

В исследование после подписания информированного согласия были включены 36 больных

MM, находившихся на стационарном лечении в отделении гематологии Клиники иммунопатологии НИИФКИ, и 24 сопоставимых здоровых донора.

Медиана возраста пациентов составила 55 лет (39-68 лет). Распределение по полу: 20 женщин, 16 мужчин. У 25 больных диагностирован IgG-вариант MM, у четырех – IgA, у пяти – миелома Бенс-Джонса, у двух – нет данных. Стадия заболевания по Durie-Salmon: II – у 11 больных, III – у 25 больных. У 23 на момент обследования был зарегистрирован полный или частичный ответ, у 13 – отсутствие ответа на терапию (стабилизация или прогрессия болезни).

Содержание популяций CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺Treg и IL-10-продуцирующих CD4⁺IL-10⁺Tr1, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, оценивали в периферической крови (ПК) и костном мозге (КМ) пациентов после курса индукционной терапии. Образцы ПК и КМ больных MM получали при проведении стандартных диагностических процедур. Лизис эритроцитов проводили раствором Lysing Buffer (BD Biosciences, США). Методом проточной цитометрии оценивали от-

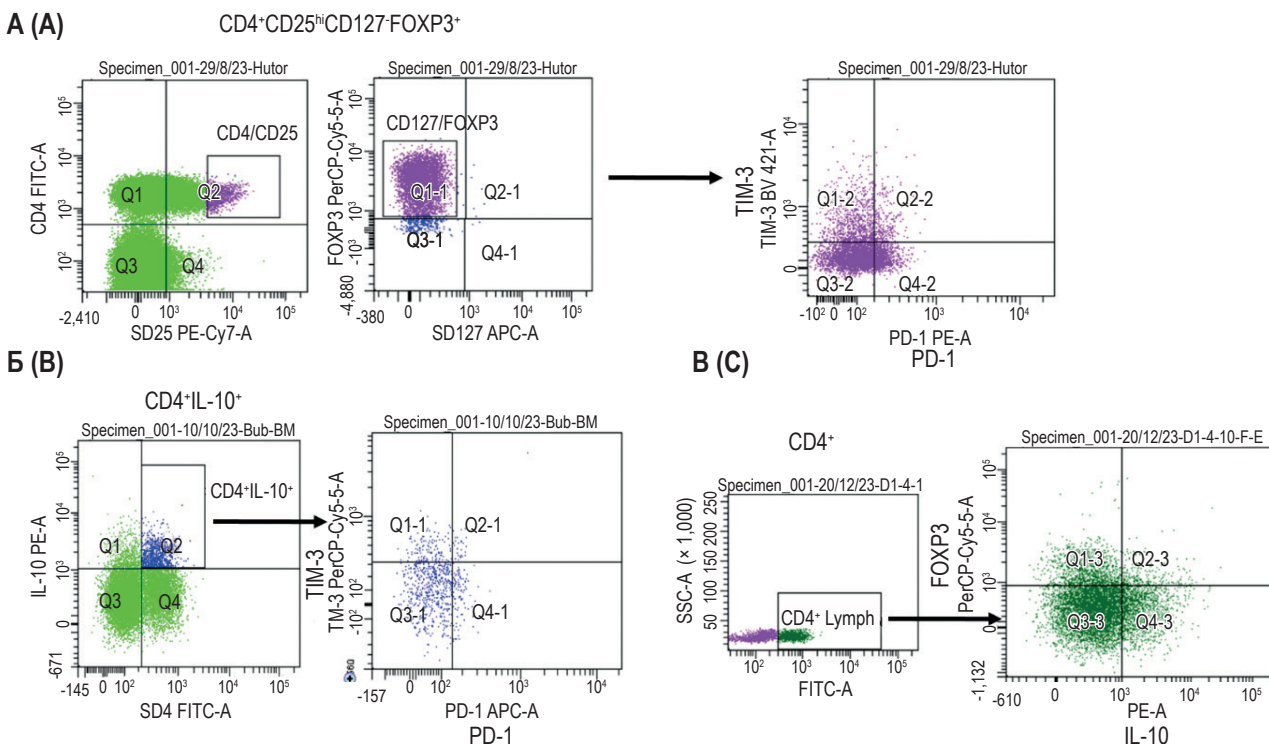


Рисунок 1. Стратегия гейтирования популяций регуляторных Т-клеток

Примечание. Представлена цитометрическая характеристика (А) CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺Treg и (Б) IL-10-продуцирующих CD4⁺IL-10⁺Treg 1-го типа (Tr1), экспрессирующих ингибиторные сигнальные молекулы PD-1 и TIM-3, больного множественной миеломой. В – различные популяции CD4⁺T-клеток экспрессируют транскрипционный фактор FoxP3 и продуцируют IL-10.

Figure 1. Gating strategy for regulatory T cell populations

Note. Cytometric characterization of (A) CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺Tregs and (B) IL-10-producing CD4⁺IL-10⁺ type 1 Tregs (Tr1) expressing inhibitory signaling molecules PD-1 and TIM-3 is presented. C. Different populations of CD4⁺T cells express the transcription factor FoxP3 and produce IL-10. Data of a patient with multiple myeloma are presented.

носительное содержание популяций Treg, экспрессирующих PD-1 или TIM-3, используя анти-CD4 (FITC), анти-CD25 (PE/Cy 7, APC-Cy7), анти-CD127 (Alexa Fluor 647), анти-FoxP3 (PerCP/Cy 5.5), анти-IL-10 (PE), анти-PD-1 (PE, APC), анти-TIM-3 (PE, PerCP/Cy 5.5, BV421) моноклональные антитела (BD Biosciences или BioLegend, США). Для исследования внутриклеточной продукции IL-10 мононуклеарные клетки (МНК) активировали в течение 5 ч. фоболмирилатом ацетатом (Sigma, Германия; конечная концентрация 10 нг/мл суспензии клеток), иономицином (Sigma; конечная концентрация 10 мкг/мл суспензии клеток); после первого часа активации в суспензию клеток добавляли ингибитор транспорта белков BD GolgiStop™ (BD Biosciences, США). Фиксацию и пермеабиллизацию МНК для оценки внутриядерной экспрессии FoxP3 и внутриклеточной продукции IL-10 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов; использовали набор растворов для фиксации/пермеабиллизации True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, США). Исследование проводили на проточном цитометре FACS Canto II (BD Biosciences, США). Анализ проводили после накопления не менее 50 000 событий в регионе CD4⁺T-клеток. Стратегия гейтирования представлена на рисунке 1.

Статистическую обработку данных проводили в GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Для оценки значимости различий использовали U-критерий Манна–Уитни. 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 циркулирующих CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺Treg и IL-10-продуцирующих CD4⁺IL-10⁺Tr1 было значимо выше у больных ММ ($n = 33$) по сравнению со здоровыми донорами ($n = 24$): 3,06% (2,13-5,35%) против 1,96% (0,92-3,16%); $P_U = 0,0054$, и 22,1% (9,3-31,93%) против 10,7% (7,33-19,38%); $P_U = 0,046$ соответственно, данные приведены в виде доли от CD4⁺T-клеток. Нужно отметить более высокое по сравнению с Treg относительное содержание IL-10-продуцирующих T-лимфоцитов, при этом значительная доля FoxP3⁺Treg была IL-10-негативной (рис. 1B). Относительное содержание Treg и Tr1 в образцах КМ ($n = 13$) значимо не отличалось от показателей ПК (приведены выше): 4,37% (2,07-6,02%); $P_U = 0,040$, и 20,5% (13,6-27,4%); $P_U = 0,95$ соответственно.

Доля Treg, экспрессирующих рецепторы PD-1 и TIM-3, у больных ММ значимо не отличалась от значений здоровых доноров (рис. 2). Содержание PD-1- и TIM-3-позитивных CD4⁺IL-10⁺T-клеток было значимо выше в образцах ПК больных ММ по сравнению с донорами (рис. 3).

Описанное увеличение количества Treg при ММ в микроокружении опухоли и в ПК согласуется с ранее опубликованными данными и является одним из механизмов ускользания малигнизированных клеток из-под иммунного надзора и одной из причин малоэффективного иммунного ответа [9]. Feyler и соавт. показано, что опухолевые плазматические клетки больных ММ, а также ее клеточных линий обладают способностью индуцировать образование Treg [7]. Veuer и соавт. при исследовании показателей ПК 76 пациентов с ММ и моноклональными гаммапатиями неясного генеза показали более высокое содержание CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺Treg при этих нозологиях, для ММ также было выявлено увеличение их количества в зависимости от стадии болезни [3]. На массиве из 207 больных ММ была выявлена ассоциация более высокого содержания Treg с развитием рецидива заболевания, а также тяжелыми осложнениями (гиперкальциемия, более низкое количество нормальных В-клеток) [11]. Более высокое количество Treg также было ассоциировано с быстрым прогрессированием болезни при ММ [8, 11].

Несмотря на про-опухолевую роль IL-10 в патогенезе ММ, данных о IL-10-продуцирующих популяциях T-клеток при этом заболевании недостаточно. Полученные нами данные об относительном количестве IL-10-продуцирующих T-лимфоцитов представляются важными для понимания патогенеза ММ, с учетом описываемого нами более высокого их содержания по сравнению с CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺Treg. Ранее Wang и соавт. не выявили различий по уровню продукции IL-10 FoxP3^{hi}/CD25⁺⁺Treg между больными ММ и здоровыми донорами, однако также отметили более высокую секрецию этого цитокина CD4⁺CD45RA⁺FoxP3^{lo}/CD25⁺T-клетками [15].

Увеличение PD-1- и/или TIM-3-экспрессирующих Treg описано в моделях опухолей и при различных онкологических заболеваниях, в большинстве исследований отмечается селективное увеличение в опухолевом микроокружении и выраженный супрессорный потенциал PD-1⁺/TIM-3⁺Treg [1]. По данным Roessner и соавт., экспрессия PD-1 также может быть ассоциирована с популяцией CD25⁻FoxP3⁻Tr1 при хроническом лимфолейкозе [12]. В работах, основанных на анализе результатов клинических испытаний анти-PD-1 моноклональных антител, продемонстрировано увеличение количества и функцио-

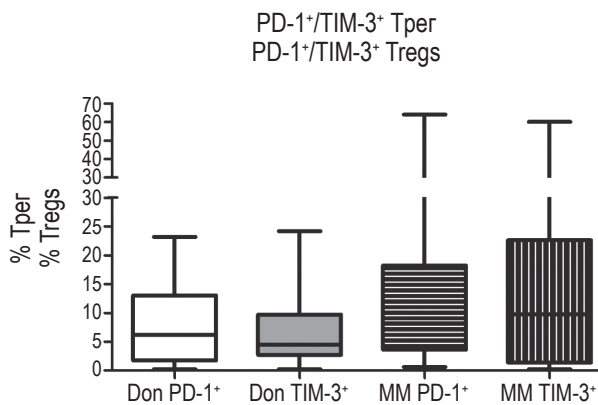


Рисунок 2. Относительное содержание CD4⁺CD25^{hi}CD127-FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, здоровых доноров и больных множественной миеломой

Примечание. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона, минимального и максимального значений. Доля PD-1⁺ и TIM-3⁺Т-клеток представлена в виде процента от Treg.

Figure 2. Relative counts of CD4⁺CD25^{hi}CD127-FoxP3⁺ regulatory T cells expressing PD-1 and TIM-3 in healthy donors and patients with multiple myeloma

Note. Data are presented as median, interquartile range, minimum and maximum values. The proportion of PD-1⁺ and TIM-3⁺T cells is presented as a percentage of Tregs.

нальной активности PD-1⁺Treg, причем Kamada и соавт. прямо связали синдром гиперпрогрессии опухоли при раке желудка с активацией этих клеток [10].

При MM данные о PD-1⁺/TIM-3⁺Treg очень ограничены и представлены работами последних лет. Bae и соавт. также описали более высокое содержание Treg, экспрессирующих PD-1 и LAG-3, у больных MM, обработка анти-PD-1 моноклональными антителами *in vitro* приводила к усилению экспансии Treg [2]. В недавней работе Dahlhoff и соавт. экспрессия чек-пойнт-рецепторов опухоль-ассоциированными Treg отражала высокую супрессорную активность [5]. Данные об экспрессии PD-1 и/или TIM-3 Tr1, а также влиянии анти-PD-1 блокирующих моно-

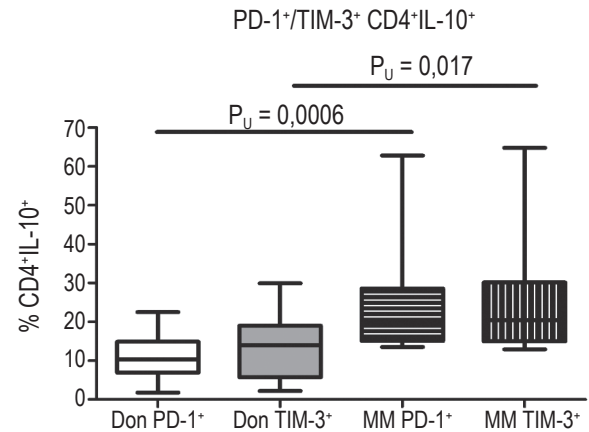


Рисунок 3. Относительное содержание CD4⁺IL-10⁺Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, здоровых доноров и больных множественной миеломой

Примечание. Данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона, минимального и максимального значений. Доля PD-1⁺ и TIM-3⁺Т-клеток представлена в виде процента от CD4⁺IL-10⁺. Значимость различий между группами оценена по U-критерию Манна-Уитни.

Figure 3. Relative counts of CD4⁺IL-10⁺T cells expressing PD-1 and TIM-3 in healthy donors and patients with multiple myeloma

Note. Data are presented as median, interquartile range, minimum and maximum values. The proportion of PD-1⁺ and TIM-3⁺T cells is presented as a percentage of CD4⁺IL-10⁺. P values are assessed with the Mann-Whitney U test.

клональных антител на Treg и Tr1 при MM в настоящее время отсутствуют.

Заключение

Таким образом, IL-10-продуцирующие CD4⁺Т-клетки составляют значительную долю Т-лимфоцитов в ПК и КМ больных MM. Их содержание превосходит количество CD4⁺CD25^{hi}CD127-FoxP3⁺Treg. Относительно небольшое количество Treg (~10%) экспрессирует чек-пойнт-рецепторы PD-1 и TIM-3, не отличаясь от показателей доноров. Доля PD-1-/TIM-3-позитивных клеток составляет ~20% CD4⁺IL-10⁺Т-клеток и значительно превышает значения здоровых лиц.

Список литературы / References

1. Alissafi T., Hatzioannou A., Legaki A.I., Varveri A., Verginis P. Balancing cancer immunotherapy and immune-related adverse events: The emerging role of regulatory T cells. *J. Autoimmun.*, 2019, Vol. 104, 102310. doi: 10.1016/j.jaut.2019.102310.
2. Bae J., Accardi F., Hideshima T., Tai Y.T., Prabhala R., Shambley A., Wen K., Rowell S., Richardson P.G., Munshi N.C., Anderson K.C. Targeting LAG3/GAL-3 to overcome immunosuppression and enhance anti-tumor immune responses in multiple myeloma. *Leukemia*, 2022, Vol. 36, no 1, pp. 138-154.
3. Beyer M., Kochanek M., Giese T., Endl E., Weihrauch M.R., Knolle P.A., Classen S., Schultze J.L. *In vivo* peripheral expansion of naive CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood*, 2006, Vol. 107, no 10, pp. 3940-3949.

4. Chen H., Wang X., Wang Y., Chang X. What happens to regulatory T cells in multiple myeloma. *Cell Death Discov.*, 2023, Vol. 9, no. 1, 468. doi: 10.1038/s41420-023-01765-8.
5. Dahlhoff J., Manz H., Steinfatt T., Delgado-Tascón J., Seebacher E., Schneider T., Wilnit A., Mokhtari Z., Tabares P., Böckle D., Rasche L., Martin Kortüm K., Lutz M.B., Einsele H., Brandl A., Beilhack A. Transient regulatory T-cell targeting triggers immune control of multiple myeloma and prevents disease progression. *Leukemia*, 2022, Vol. 36, no. 3, pp. 790-800.
6. Das S., Johnson D.B. Immune-related adverse events and anti-tumor efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer*, 2019, Vol. 7, no. 1, 306. doi: 10.1186/s40425-019-0805-8.
7. Feyler S., Scott G.B., Parrish C., Jarmin S., Evans P., Short M., McKinley K., Selby P.J., Cook G. Tumour cell generation of inducible regulatory T-cells in multiple myeloma is contact-dependent and antigen-presenting cell-independent. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 5, e35981. doi: 10.1371/journal.pone.0035981.
8. Giannopoulos K., Kaminska W., Hus L., Dmoszynska A. The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. *Br. J. Cancer*, 2012, Vol. 106, no 3, pp. 546-552.
9. Hadjiaggelidou C., Katodritou E. Regulatory T-Cells and Multiple Myeloma: Implications in Tumor Immune Biology and Treatment. *J. Clin. Med.*, 2021, Vol. 10, no. 19, 4588. doi: 10.3390/jcm10194588.
10. Kamada T., Togashi Y., Tay C., Ha D., Sasaki A., Nakamura Y., Sato E., Fukuoka S., Tada Y., Tanaka A., Morikawa H., Kawazoe A., Kinoshita T., Shitara K., Sakaguchi S., Nishikawa H. PD-1⁺ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019, Vol. 116, no. 20, pp. 9999-10008.
11. Muthu Raja K.R., Rihova L., Zahradova L., Klincova M., Penka M., Hajek R. Increased T regulatory cells are associated with adverse clinical features and predict progression in multiple myeloma. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 10, e47077. doi: 10.1371/journal.pone.0047077.
12. Roessner P.M., Llaó Cid L., Lupar E., Roider T., Bordas M., Schifflers C., Arseni L., Gaupel A.C., Kilpert F., Krötschel M., Arnold S.J., Sellner L., Colomer D., Stilgenbauer S., Dietrich S., Lichter P., Izcue A., Seiffert M. EOMES and IL-10 regulate antitumor activity of T regulatory type 1 CD4⁺ T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2021, Vol. 35, no. 8, pp. 2311-2324.
13. Sakuishi K., Ngiow S.F., Sullivan J.M., Teng M.W., Kuchroo V.K., Smyth M.J., Anderson A.C. TIM3⁺FOXP3⁺ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology*, 2013, Vol. 2, no. 4, e23849. doi: 10.4161/onci.23849.
14. Usmani S.Z., Schjesvold F., Oriol A., Karlin L., Cavo M., Rifkin R.M., Yimer H.A., LeBlanc R., Takezako N., McCroskey R.D., Lim A.B.M., Suzuki K., Kosugi H., Grigoriadis G., Avivi I., Facon T., Jagannath S., Lonial S., Ghori R.U., Farooqui M.Z.H., Marinello P., San-Miguel J. KEYNOTE-185 Investigators. Pembrolizumab plus lenalidomide and dexamethasone for patients with treatment-naïve multiple myeloma (KEYNOTE-185): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol.*, 2019, Vol. 6, no. 9, pp. e448-e458.
15. Wang J.N., Cao X.X., Zhao A.L., Cai H., Wang X., Li J. Increased activated regulatory T cell subsets and aging Treg-like cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a case control study. *Cancer Cell Int.*, 2018, Vol. 18, 187. doi: 10.1186/s12935-018-0687-8.

Авторы:

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Баторова Д.С. — к.м.н., врач-гематолог ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сизикова С.А. — к.м.н., врач-гематолог ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Крукович А.Б. — клинический ординатор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Batorova D.S., PhD (Medicine), Hematologist, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sizikova S.A., PhD (Medicine), Hematologist, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Krukovich A.B., Medical Resident, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 01.04.2024

Отправлена на доработку 06.04.2024

Принята к печати 15.04.2024

Received 01.04.2024

Revision received 06.04.2024

Accepted 15.04.2024

МЫШИНАЯ МОДЕЛЬ СВЕРХЭКСПРЕССИИ IL-6 ЧЕЛОВЕКА ТКАНЕРЕЗИДЕНТНЫМИ МАКРОФАГАМИ В КОНТЕКСТЕ LPS-ИНДУЦИРОВАННОГО ВОСПАЛЕНИЯ

**Чичерина Н.Р.^{1,2}, Горшкова Е.А.¹, Мячев Е.А.^{1,3}, Яковлева А.С.^{1,3},
Литвинова А.М.², Намаканова О.А.¹, Зварцев Р.В.¹,
Недоспасов С.А.^{1,2}, Друцкая М.С.^{1,2}**

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

² АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. Хроническое воспаление, обусловленное сверхэкспрессией IL-6, лежит в основе ряда патологических состояний. Мышиные модели системного хронического воспаления со сверхэкспрессией IL-6 человека (hIL-6) востребованы не только в контексте изучения молекулярных механизмов воспаления, но и при оценке эффективности клинически применяемых или разрабатываемых блокаторов hIL-6. Одним из экспериментальных подходов в исследовании подобных моделей с использованием мышей является индукция системного острого воспаления в ответ на введение липополисахарида (LPS). В представленной работе описаны мыши, у которых тамоксифен-зависимая сверхэкспрессия IL-6 человека в CX3CR1⁺ миелоидных клетках была сопряжена с индукцией системного воспаления в ответ на введение LPS. В ходе исследования было установлено, что наиболее высокая экспрессия трансгена, несущего *IL-6*, наблюдается в сердце, при этом на системном уровне в сыворотке крови детектируется высокая продукция этого цитокина. В ответ на введение LPS у трансгенных мышей возрастала продукция hIL-6 в крови, при этом продукция mIL-6 также увеличивалась и была сравнима с таковой у мышей дикого типа. Последствия высокой системной продукции hIL-6, источником которого в нашей модели служат CX3CR1⁺ тканерезидентные макрофаги, были заметны даже в тех органах, в которых эти клетки не представлены. Так, в тканевых лизатах легких трансгенных мышей были обнаружены значимые количества hIL-6 в ответ на введение LPS. Оценка экспрессии генов, кодирующих цитокины и маркеры ремоделирования ткани при повреждении, методом количественной ПЦР в реальном времени показала достоверные изменения в их экспрессии на фоне

Адрес для переписки:

Чичерина Неля Рафаиловна
АНО ВО Научно-технологический
университет «Сириус»
Россия, Краснодарский край, Федеральная
территория «Сириус»
Тел.: 8 (968) 034-43-97.
Факс: 8 (499) 135-14-05.
E-mail: nelyayakhina@mail.ru

Address for correspondence:

Nelya R. Chicherina
Sirius University of Science and Technology
Krasnodar Region
Russian Federation
Phone: +7 (968) 034-43-97.
Fax: +7 (499) 135-14-05.
E-mail: nelyayakhina@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Р. Чичерина, Е.А. Горшкова, Е.А. Мячев,
А.С. Яковлева, А.М. Литвинова, О.А. Намаканова,
Р.В. Зварцев, С.А. Недоспасов, М.С. Друцкая
«Мышиная модель сверхэкспрессии IL-6 человека
тканерезидентными макрофагами в контексте
LPS-индуцированного воспаления» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 919-926.
doi: 10.15789/1563-0625-AMM-16918

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

For citation:

N.R. Chicherina, E.A. Gorshkova, E.A. Myachev,
A.S. Yakovleva, A.M. Litvinova, O.A. Namakanova,
R.V. Zvartsev, S.A. Nedospasov, M.S. Drutskaya "A mouse
model of overexpression of human IL-6 by tissue-resident
macrophages in the context of LPS-induced inflammation",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 5, pp. 919-926.
doi: 10.15789/1563-0625-AMM-16918

© Chicherina N.R. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-AMM-16918

LPS-индуцированного системного воспаления. Таким образом, в настоящей работе показана целесообразность использования линии мышей с тамоксифен-зависимой активацией трансгена в CX3CR1⁺ тканерезидентных макрофагах для изучения эффектов системной сверхэкспрессии IL-6 и фармакологической блокировкой этого цитокина клинически применяемыми блокаторами в контексте экспериментально индуцируемых заболеваний.

Ключевые слова: доклинические модели воспаления, цитокины, фиброз, IL-6

A MOUSE MODEL OF OVEREXPRESSION OF HUMAN IL-6 BY TISSUE-RESIDENT MACROPHAGES IN THE CONTEXT OF LPS-INDUCED INFLAMMATION

Chicherina N.R.^{a, b}, Gorshkova E.A.^a, Myachev E.A.^{a, c}, Yakovleva A.S.^{a, c}, Litvinova A.M.^b, Namakanova O.A.^a, Zvartsev R.V.^a, Nedospasov S.A.^{a, b}, Drutskaya M.S.^{a, b}

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

^b Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

^c Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Chronic inflammation caused by overexpression of IL-6 underlies a number of pathological conditions. Mouse models of systemic chronic inflammation with overexpression of human IL-6 (hIL-6) are in demand not only in the context of studying the molecular mechanisms of inflammation, but also in assessing the effectiveness of clinically approved or newly developed IL-6 inhibitors. One experimental approach in addressing such models in mice relies on the induction of systemic acute inflammation in response to lipopolysaccharide (LPS) administration. This work describes mice with tamoxifen-dependent overexpression of human IL-6 in CX3CR1⁺ myeloid cells in the context of systemic inflammation induced by LPS administration. Our study demonstrates that the highest expression of the transgene carrying *IL6* was observed in the heart, while high production of this cytokine was detected in the blood serum. In response to LPS administration, the production of hIL-6 in the blood increased in transgenic mice, while the production of mIL-6 also increased and was comparable to that in wild-type mice. The consequences of high systemic production of hIL-6, which in our model originates from CX3CR1⁺ tissue-resident macrophages, were noticeable even in the organs in which these cells are not present. Thus, significant amounts of hIL-6 were detected in tissue lysates of the lungs of transgenic mice after LPS administration. Evaluation of the expression of genes encoding cytokines and markers of tissue remodeling upon injury using quantitative real-time PCR showed significant changes in their expression in the context of LPS-induced systemic inflammation. Thus, this work demonstrates the feasibility of using a mouse model with tamoxifen-dependent transgene activation in CX3CR1⁺ tissue-resident macrophages to study the effects of systemic overexpression of IL-6 and pharmacological blockade of this cytokine with clinically approved or newly developed inhibitors in the context of experimentally induced diseases.

Keywords: preclinical models of inflammation, cytokines, fibrosis, IL-6

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №19-75-30032). Анализ экспрессии генов был выполнен в НТУ Сириус при поддержке Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; Проект НИР-ИМБ-2102).

Введение

IL-6 – цитокин с функциональной плеiotропией: он играет важную роль как в защите организма, так и в индукции патологического воспаления. В ответ на возникновение инфекций или повреждение тканей IL-6 вырабатывается моно-

цитами и макрофагами, способствуя удалению инфекционных агентов и восстановлению поврежденных тканей путем активации иммунных, гематологических реакций и реакций острой фазы. Однако неконтролируемая избыточная или стойкая выработка IL-6 вносит вклад в развитие различных воспалительных заболеваний и рака [9].

Существование патогенетических функций IL-6 наряду с гомеостатическими может объясняться в том числе и наличием различных источников IL-6, а также локальной (в ткани) или системной (в крови) продукцией этого цитокина. Так, для моделирования IL-6-ассоциированного воспаления в нашей лаборатории ранее были получены мыши с конститутивной сверхэкспрессией IL-6 человека в миелоидных клетках [2]. Такие мыши оказались нежизнеспособными в условиях конвенционального содержания и погибали от последствий системного воспаления вскоре после рождения. Поэтому следующим этапом в создании релевантной модели IL-6-зависимого воспаления стало получение новой

линии генетически-модифицированных мышей с тамоксифен-зависимой сверхэкспрессией IL-6 человека тканерезидентными CX3CR1⁺ макрофагами [1]. У таких мышей активация трансгена, кодирующего IL-6 человека и репортерный белок EGFP, происходит в ответ на введение тамоксифена и исключительно в CX3CR1⁺ клетках. Локализация экспрессии IL-6 человека в тканях обусловлена элиминацией пула обновляющихся CX3CR1⁺ клеток из системного кровотока через месяц после инъекции тамоксифена, в то время как долгоживущие CX3CR1⁺ тканерезидентные макрофаги продолжают экспрессировать трансген и поддерживают высокий уровень hIL-6 в сыворотке крови даже спустя 6 месяцев после курса тамоксифена (рис. 1А, В).

В настоящее время актуален вопрос валидации этой мышью модели IL-6-ассоциированного хронического воспаления в тканях. Кроме того, важно понять, как у таких мышей будет развиваться острая воспалительная реакция и будет ли изменяться системная (в крови) и локальная (в ткани) концентрация hIL-6 в ответ на инъек-

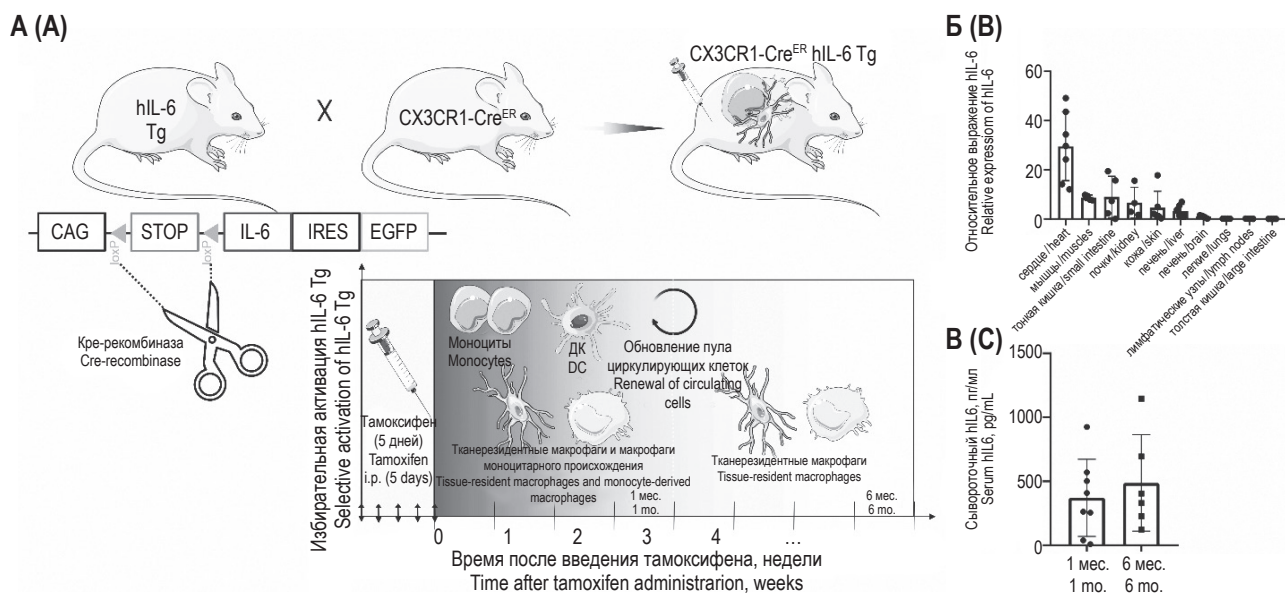


Рисунок 1. Мыши с индуцируемой тамоксифеном сверхэкспрессией hIL-6 в CX3CR1⁺ миелоидных клетках

Примечание. А – у мышей происходит тамоксифен-зависимая активация трансгена, несущего hIL-6 и белок-репортер EGFP, в CX3CR1⁺ клетках. Избирательная активация hIL-6 в тканях обусловлена элиминацией пула обновляющихся CX3CR1⁺ клеток из системного кровотока в течение месяца после инъекции тамоксифена, в то время как CX3CR1⁺ тканерезидентные макрофаги продолжают экспрессировать hIL-6. Б – относительная экспрессия IL6 в органах и тканях CX3CR1-CreER hIL-6 Tg мышей через месяц после введения тамоксифена. В – концентрация hIL-6 в сыворотке крови трансгенных мышей через месяц и 6 месяцев после введения тамоксифена. Содержание hIL-6 в сыворотке крови мышей спустя 6 месяцев сохраняется на высоком уровне, сопоставимом с таковым через месяц после активации трансгена.

Figure 1. Mice with tamoxifen-induced overexpression of hIL-6 in CX3CR1⁺ myeloid cells

Note. A, in mice, tamoxifen-dependent activation of a transgene carrying hIL-6 and EGFP reporter protein occurs in CX3CR1⁺ cells. Selective activation of hIL-6 in tissues is due to the elimination of a pool of renewing CX3CR1⁺ cells from the systemic bloodstream within a month after tamoxifen injection, while CX3CR1⁺ tissue-like macrophages continue to express hIL-6. B, relative expression of IL6 in organs and tissues of CX3CR1-CreER hIL-6 Tg mice one month after tamoxifen administration. C, the concentration of hIL-6 in the blood serum of transgenic mice one month and 6 months after tamoxifen administration. Concentration of hIL-6 in the blood serum of mice remains at a high level after 6 months, comparable to that one month after the activation of the transgene.

цию LPS. С этой целью у CX3CR1-Cre^{ER} hIL-6 Tg мышей спустя месяц после курса тамоксифена индуцировали острое системное воспаление путем внутрибрюшинного введения LPS и оценивали продукцию hIL-6 системно и в тканях, а также экспрессию генов, кодирующих некоторые медиаторы и маркеры воспаления. Показано, что активации трансгена в CX3CR1⁺ тканерезидентных макрофагах достаточно для поддержания высокой системной продукции hIL-6 в течение длительного времени, при этом такие мыши отвечают на экспериментально индуцированное воспаление еще более высокой продукцией hIL-6 и значимыми изменениями в тканях с низкой экспрессией трансгена, что говорит о применимости этой линии мышей для изучения последствий IL-6-зависимого воспаления и исследования эффективности блокаторов IL-6 человека.

Материалы и методы

Мыши

Эксперименты проводили на самцах и самках в возрасте 6-8 недель генетически-модифицированных мышей CX3CR1-Cre^{ER} hIL-6 Tg. Для этого ранее полученную линию мышей с Cre-зависимой активацией трансгена, кодирующего ген интерлейкина-6 человека [2], скрещивали с Cre-делиторной линией мышей, у которой экспрессия Cre-рекомбиназы происходит тканеспецифично под контролем промотора миелоидных клеток в ответ на введение тамоксифена [10]. В качестве контрольной группы по результатам генотипирования брали однопометных мышей дикого типа. Содержание и экспериментальные манипуляции проводили на базе Автономного экспериментально-биологического комплекса для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИМБ РАН (модульный виварий ИМБ РАН). Все манипуляции с мышами были выполнены согласно правилам работы с лабораторными животными, принятыми Федерацией Европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA) и согласованы с комиссией по биоэтике ИМБ РАН (Протокол № 3 от 19.10.2022).

Тамоксифен-индуцированная активация Cre-рекомбиназы

Для активации Cre-рекомбиназы в миелоидных клетках и последующей индукции экспрессии трансгена, кодирующего hIL-6 и белок-репортер EGFP, CX3CR1-Cre^{ER} hIL-6 Tg мышам и контрольной группе внутрибрюшинно вводили тамоксифен из расчета 75 мг/кг массы мыши в

течение пяти дней. Для этого готовили раствор тамоксифена с концентрацией 15 мг/мл путем разведения 120 мг тамоксифена в 8 мл стерильного кукурузного масла и перемешивали на шейкере на 250 rpm при 37 °C в течение ночи до растворения осадка. Схема введения тамоксифена заключалась в пятикратном введении рассчитанной исходя из массы дозы растворенного тамоксифена. Выбранная схема введения тамоксифена обеспечивала активацию трансгена только в тканерезидентных макрофагах, потому что CX3CR1⁺ моноциты и дендритные клетки к моменту анализа уже репопулировали из костного мозга.

LPS-индуцированное воспаление

В эксперименте участвовало две группы мышей, каждая из которых включала мышей дикого типа и CX3CR1-Cre^{ER} hIL-6 Tg мышей через месяц после курса тамоксифена. Одной из групп внутрибрюшинно вводили LPS из расчета 50 мкг/кг массы мыши для индукции воспаления. По истечении четырех часов мыши были терминированы (рис. 2А).

Измерение продукции hIL-6 и mIL-6

Цитокины в сыворотке крови, лизатах легких и БАЛ (бронхоальвеолярном лаваже) анализировали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go и Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go (Thermo-Fisher) по протоколу производителя.

Получение тканевых лизатов

Для получения тканевых лизатов использовали RIPA лизис-буфер, приготавливаемый из 50 mM Tris HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,5% дезоксихолата натрия; 0,1% SDS; с добавлением ингибиторов протеаз (cOmpleteTM ULTRA Tablets, Protease Inhibitor Cocktail, Sigma) и фосфатаз (PhosStop, Sigma) в таблетках. На каждый мг ткани добавляли 10 мкл RIPA лизис-буфера и гомогенизировали.

Измерение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

Полученную из образцов тканей РНК обрабатывали ДНКазой согласно инструкции производителя Thermo Scientific DNase I, RNase-free, чтобы удалить ДНК. Затем синтезировали кДНК в соответствии с инструкцией производителя Евроген по применению Mint-RT.

Измерение экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени проводили с использованием qPCRMix-HS SYBR («Евроген») и соответствующего набора праймеров (табл. 1) на амплификаторах 7500 Real Time PCR System Amplificator (Applied Biosystems) и QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems). Для определения относительной экспрессии генов применяли сравнительный метод 2^{-ΔΔCt} [7].

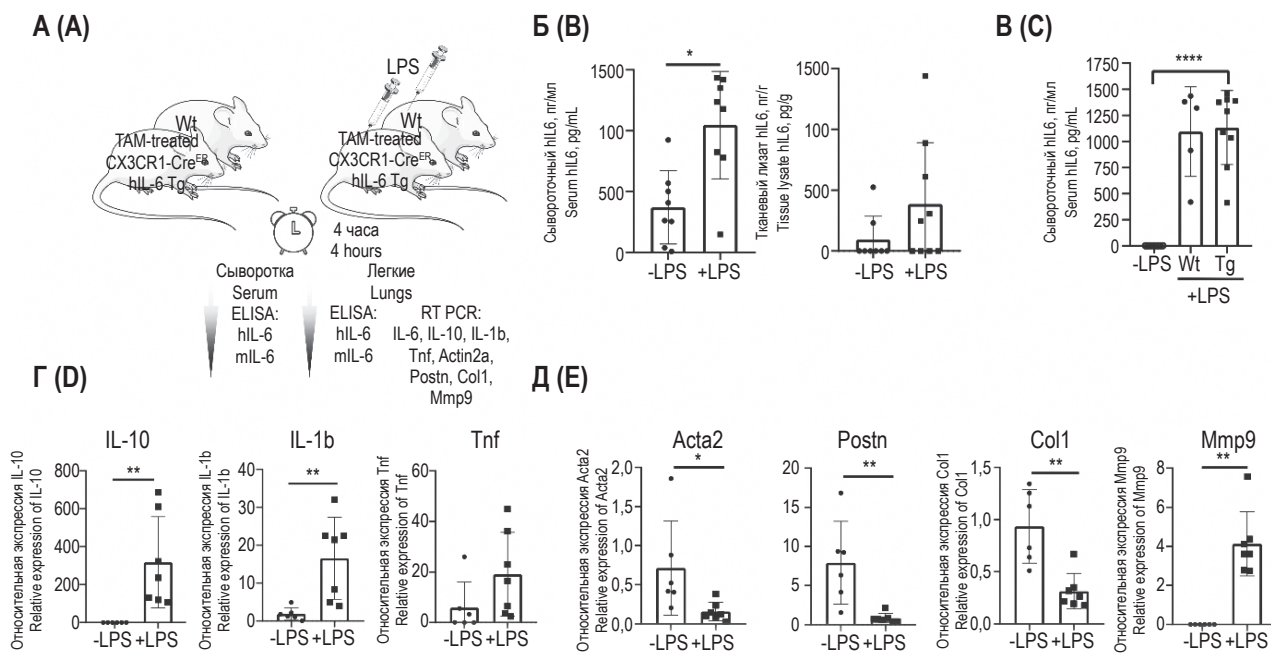


Рисунок 2. В ответ на введение LPS у CX3CR1-CreER hIL-6 Tg мышей повышается системная продукция hIL-6 и изменяется профиль экспрессии генов, кодирующих маркеры воспаления и ремоделирования ткани легкого. Примечание. А – схема эксперимента. Б – концентрация hIL-6 в сыворотке крови и лизатах легких трансгенных мышей до и после инъекции LPS. В – концентрация mIL-6 в сыворотке крови мышей. До инъекции LPS у мышей Wt и Tg mIL-6 не детектируется, а после инъекции его продукция многократно возрастает в обеих группах. Г – изменения в экспрессии генов, кодирующих основные медиаторы воспаления – *IL-1b*, *Tnf*, *IL-10* в лизатах легких. Д – изменения в экспрессии генов, вовлеченных в ремоделирование ткани при повреждении, в образцах легких трансгенных мышей до и после инъекции LPS. Статистический анализ проведен с помощью критерия Манна-Уитни, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Figure 2. Increased systemic production of hIL-6 and changes in the expression profile of genes encoding markers of inflammation and lung tissue remodeling in CX3CR1-CreER hIL-6 Tg mice in response to LPS

Note. A, the scheme of the experiment. B, the concentration of hIL-6 in the blood serum and lung lysates of transgenic mice before and after LPS injection. C, the concentration of mIL-6 in the blood serum of mice. Prior to LPS injection, mIL-6 was not detected in the serum of Wt and Tg mice, however, its production increased significantly in both groups in response to LPS. D, changes in the expression of genes encoding the major inflammatory mediators – *IL-1b*, *Tnf*, *IL-10* in the lung lysates. E, changes in the expression of genes involved in tissue remodeling during injury in lung samples of transgenic mice before and after LPS injection. The statistical analysis was performed using the Mann-Whitney criterion, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ДЛЯ qRT-PCR АНАЛИЗА

TABLE 1. PRIMERS SEQUENCES USED FOR qPCR ANALYSIS

Ген Gene	Праймеры / Primers (5'→3')		Протокол количественной ПЦР qPCR protocol
	F	R	
<i>hIL-6</i>	AACAACCTGAACCTTCCA	GCTTGTTCTCACTACTCTC	50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 40× (95 °C 15 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 30 sec), 95 °C 15 sec, 60 °C 1 min, 95 °C 1 sec
<i>IL-1b</i>	AAAAGCCTCGTGCTGTCG	AGCCACAGGTATTTGTCTG	
<i>Tnf</i>	ACAAGGTACAACCCATCGGC	TAGCCACGTCGTAGCAAAC	
<i>IL-10</i>	TACAGCCGGGAAGACAATAA	AGCAGTCGGTTAGCAGTATG	
<i>Actin2a</i>	GGCACCCTCTTTCTATAACGAG	GCACAATACCAGTTGTACGTCC	
<i>Postn</i>	ACTACCACTCAGCACTACTCC	GCGAATGTCAGAATCCAGGT	
<i>Col1</i>	ACGCCATCAAGGTCTACTG	GTA CT CGAACGGGAA	
<i>Mmp-9</i>	CTCCAACCTCACGGACAC	GACTGCTTCTCTCCCATCATC	

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 8 при помощи критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Результаты и обсуждение

Ранее при изучении особенностей мышей с конститутивной сверхэкспрессией hIL-6 в миелоидных клетках были отмечены значительные патологические изменения во многих органах и тканях. Однако высокая неонатальная смертность [2] и значительные фенотипические изменения, например, существенное отставание в развитии на фоне hIL-6-ассоциированного хронического системного воспаления, накладывали ряд серьезных ограничений на работу с такими мышами и делали невозможным их изучение в контексте экспериментально-индуцированных патологических состояний. Разработанная в настоящей работе модель с индуцируемой сверхэкспрессией hIL-6 в CX3CR1⁺ клетках позволяет изучать hIL-6-ассоциированное хроническое воспаление как на системном уровне, так и локально – в тканях. Среди преимуществ данной модели следует отметить отсутствие неонатальной смертности. Кроме того, фенотипически мыши с генотипом CX3CR1-Cre^{ER} hIL-6 Tg не отличаются от контрольных мышей дикого типа. Несмотря на то, что у CX3CR1-Cre^{ER} hIL-6 Tg мышей наиболее высокая экспрессия hIL-6 была отмечена в сердце, почках и мышцах (рис. 1Б), мы исследовали эффекты системной продукции hIL-6 в легких, поскольку альвеолярные макрофаги не экспрессируют CX3CR1 и, тем самым, не экспрессируют трансген. Кроме того, показано, что именно легкие наиболее подвержены нежелательным эффектам IL-6-зависимого воспаления [4, 5].

Введение LPS индуцировало острое системное воспаление, одним из проявлений которого служит повышение уровня провоспалительных цитокинов. Действительно, в ответ на LPS и у Tg, и у Wt мышей значительно возросла концентрация mIL-6 в сыворотке крови (рис. 2В). Стоит отметить, что в лизатах легких и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) его практически не удавалось детектировать ни до, ни после введения LPS (данные не представлены). Параллельно с этим у CX3CR1-Cre^{ER} hIL-6 Tg мышей в ответ на введение LPS в сыворотке крови возрастало содержание hIL-6 и наблюдалась его значимая детекция в лизатах легких (рис. 2Б). Далее, мы исследовали, какие значимые изменения происходят в легких CX3CR1-Cre^{ER} hIL-6 Tg после индукции воспаления. Для этого был проведен анализ экспрес-

сии ряда генов, ассоциированных с воспалением и ремоделированием ткани при повреждении. Оценку экспрессии генов в образцах легких, полученных от CX3CR1-Cre^{ER} hIL-6 Tg мышей и контрольных мышей дикого типа, проводили методом количественной ПЦР в реальном времени. Показано, что в ответ на LPS у CX3CR1-Cre^{ER} hIL-6 Tg мышей увеличивается экспрессия генов, кодирующих ключевые медиаторы воспаления – *IL1b*, *Tnf*, *IL10*, а также изменяется экспрессия генов, вовлеченных в ремоделирование ткани при повреждении и, в конечном итоге, участвующих в фиброзе – снижается в ответ на инъекцию LPS для *Acta2*, *Postn*, *Col1* и возрастает в ответ на инъекцию LPS для *Mmp9* (рис. 2Д). Так, известно, что белок MMP-9 ассоциирован с воспалением [3] и участвует в активации IL-1 β [6] (рис. 2Г). Примечательно, что мы не обнаружили изменений в продукции TGF β ни в BAL, ни в тканевых лизатах легких (данные не представлены). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованным исследованием, в котором было показано, что LPS снижал экспрессию *Acta2*, *Pdgfrb*, *Col1a1*, но не изменял экспрессию *Tgfb* [8]. Последнее, предположительно, может быть связано с тем, что LPS увеличивал экспрессию декорина (*Den*) – ингибитора экспрессии *Tgfb*.

Обобщая все описанное выше, мы установили, что рассматриваемая в настоящей работе линия мышей с индуцируемой сверхэкспрессией hIL-6 в CX3CR1-Cre^{ER} клетках является подходящей моделью для изучения IL-6-ассоциированного хронического и острого LPS-индуцированного воспаления как на системном уровне, так и конкретных органах и тканях.

Заключение

Системы с индуцибельной сверхэкспрессией человеческих цитокинов предоставляют платформу для изучения функций этих цитокинов в рамках животных моделей. Активация продукции цитокинов в таких системах в ответ на воспалительный стимул расширяет спектр применения данных моделей и предоставляет возможность исследовать их в контексте острого и хронического воспаления. В настоящей работе показано, что при введении LPS мышам с индуцируемой тамоксифеном сверхэкспрессией hIL-6 в CX3CR1⁺ клетках у них развивается острое LPS-ассоциированное воспаление в легких, аналогично тому, как оно развивается у мышей дикого типа. Кроме того, у CX3CR1-Cre^{ER} hIL-6 Tg мышей в ответ на инъекцию LPS возрастает уровень hIL-6, что позволяет использовать эту модель патологического воспаления для изучения эффективности блокаторов IL-6 человека.

Список литературы / References

1. Горшкова Е.А., Зварцев Р.В., Друзцкая М.С., Губернаторова Е.О. Гуманизированные мыши со сверхэкспрессией генов человека как инструмент изучения функций провоспалительных цитокинов // Молекулярная биология, 2019. Т. 53, № 5. С. 755-773. [Gorshkova E.A., Zvartsev R.V., Drutskaya M.S., Gubernatorova E.O. Humanized mouse models of proinflammatory cytokine genes overexpression. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2019, Vol. 53, no. 5, pp. 755-773. (In Russ.)]
2. Зварцев Р.В., Коршунова Д.С., Горшкова Е.А., Носенко М.А., Корнеев К.В., Максименко О.Г., Коробко И.В., Купраш Д.В., Друзцкая М.С., Недоспасов С.А., Дейкин А.В. Неонатальная смертность и воспалительный фенотип у новых трансгенных мышей со сверхэкспрессией интерлейкина-6 человека в миелоидных клетках // Доклады Академии наук, 2018. Т. 483, № 1. С. 344-347. [Zvartsev R.V., Korshunova D.S., Gorshkova E.A., Nosenko M.A., Korneev K.V., Maksimenko O.G., Korobko I.V., Kuprash D.V., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Deikin A.V. Neonatal Lethality and Inflammatory Phenotype of the New Transgenic Mice with Overexpression of Human Interleukin-6 in Myeloid Cells. *Doklady Akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences*, 2018, Vol. 483, no. 1, pp. 344-347. (In Russ.)]
3. Лещенко И.В., Жеребцов А.Д. Идиопатический легочный фиброз: современный взгляд на патогенез и роль биомаркеров // РМЖ, 2018. Т. 10, № 1. С. 6-10. [Leshchenko I.V., Zherebtsov A.D. Idiopathic pulmonary fibrosis: modern view of pathogenesis and the role of biomarkers. *RMZh = Russian Medical Journal*, 2018, Vol. 10, no. 1, pp. 6-10. (In Russ.)]
4. Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Namakanova O.A., Zvartsev R.V., Hidalgo J., Drutskaya M.S., Tumanov A.V., Nedospasov S.A. Non-redundant Functions of IL-6 Produced by Macrophages and Dendritic Cells in Allergic Airway Inflammation. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2718. doi: 10.3389/fimmu.2018.02718.
5. Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Polinova A.I., Drutskaya M.S. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2020, Vol. 53, pp. 13-24.
6. Opdenakker G., van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., van Coillie E., Masure S., Proost P., van Damme J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.*, 2001, Vol. 69, no. 6, pp. 851-859.
7. 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.
8. Sharma A., Wang J., Gandhi C.R. CD14 is not required for carbon tetrachloride-induced hepatic inflammation and fibrosis with or without lipopolysaccharide challenge. *J. Cell Physiol.*, 2023, Vol. 238, no. 7, pp. 1530-1541.
9. Tanaka T., Narazaki M., Masuda K., Kishimoto T. Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2016, Vol. 941, pp. 79-88.
10. Yona S., Kim K.W., Wolf Y., Mildner A., Varol D., Breker M., Strauss-Ayali D., Viukov S., Guillemins M., Misharin A., Hume D.A., Perlman H., Malissen B., Zelzer E., Jung S. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 1, pp. 79-91.

Авторы:

Чичерина Н.Р. — магистрант АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край; ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Горшкова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Мячев Е.А. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Яковлева А.С. — лаборант-исследователь в Лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Authors:

Chicherina N.R., Master's Degree Student, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Gorshkova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Myachev E.A., Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russian Federation

Yakovleva A.S., Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russian Federation

Литвинова А.М. — магистрант АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Намаканова О.А. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Зварцев Р.В. — младший научный сотрудник Лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, 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 направления «Иммунология и биомедицина», АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Друцкая М.С. — д.б.н., ведущий научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия; доцент АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Litvinova A.M., Master's Degree Student, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

Namakanova O.A., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Zvartsev R.V., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 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, Moscow; Head, Division of Immunobiology and Biomedicine, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

Drutskaya M.S., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow; Associate Professor, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 06.04.2024
Принята к печати 17.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 06.04.2024
Accepted 17.04.2024

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ И ТРАНСКРИПЦИОННЫХ СИГНАТУР CD8⁺HLA-DR⁺ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ: ПЕРСПЕКТИВЫ В ПОНИМАНИИ СТАРЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Матвеева К.С., Рыбцов С.А., Шевырев Д.В.

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

Резюме. Способность популяции CD8⁺HLA-DR⁺Т-лимфоцитов к регуляции иммунного ответа впервые была описана несколько лет назад. Известно, что супрессорные эффекты клеток данной популяции зависят от межклеточного контакта и опосредованы экспрессией молекул-ингибиторов контрольных точек, таких как CTLA-4, TIM-3, PD-1 и LAG-3. Также популяция CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-клеток имеет ряд свойств, объединяющих данную субпопуляцию с конвенциональными CD4⁺ регуляторными Т-лимфоцитами. Тем не менее, характер и функция данной субпопуляции до сих пор остаются слабо изученными. Кроме того, исследование свойств CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-клеток становится актуальным в контексте общих изменений иммунной системы человека, ассоциированных с возрастом, и более высокой чувствительности CD8⁺ Т-лимфоцитов к этим изменениям. Таким образом, целью данной работы стало изучение возрастной динамики и поиск транскрипционных сигнатур субпопуляции CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-клеток. Для этого был проведен цитометрический анализ мононуклеарных клеток периферической крови 18 доноров от 21 до 85 лет. Поиск сигнатур был осуществлен при помощи биоинформатического анализа открытых данных РНК секвенирования одиночных клеток. Было обнаружено, что популяция CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-клеток накапливается с возрастом. Транскрипционные сигнатуры данной популяции представляют собой гены, вовлеченные в антигенную презентацию и цитотоксичность, совместно с понижением экспрессии генов транскрипционного комплекса белка-активатора 1. Исходя из этих данных можно предположить механизм супрессорной функции CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-лимфоцитов, ассоциированные со способностью данных клеток презентировать антигены и осуществлять цитотоксическое действие в отношении эффекторных Т-лимфоцитов. Накопление клеток исследуемой популяции может подразумевать потенциальное влияние CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-лимфоцитов на эффективность адаптивных иммунных реакций в процессе старения. Дальнейшие исследования данной популяции могут помочь лучше понять ее роль в возрастных изменениях иммунной системы и разработать стратегии для улучшения иммунного ответа у пожилых людей.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, CD8⁺HLA-DR⁺Treg, старение, транскриптомика, сигнатуры, секвенирование РНК одиночных клеток

Адрес для переписки:

Шевырев Даниил Вадимович
АНОО ВО «Научно-технологический
университет «Сириус»
354340, Россия, Краснодарский край, федеральная
территория «Сириус», Олимпийский пр., 1.
Тел.: 8 (923) 134-55-05.
E-mail: dr.daniil25@mail.ru

Address for correspondence:

Daniil V. Shevyrev
1 Olympic Ave
Sirius Federal Territory, Krasnodar Region
354340 Russian Federation
Phone: +7 (923) 134-55-05.
E-mail: dr.daniil25@mail.ru

Образец цитирования:

К.С. Матвеева, С.А. Рыбцов, Д.В. Шевырев «Исследование
возрастной динамики и транскрипционных сигнатур
CD8⁺HLA-DR⁺ регуляторных Т-лимфоцитов:
перспективы в понимании старения иммунной
системы» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 5. С. 927-932.
doi: 10.15789/1563-0625-IAR-16899

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

For citation:

K.S. Matveeva, S.A. Rybtsov, D.V. Shevyrev "Investigating
age-related dynamics and transcriptional signatures of
CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T lymphocytes: perspectives in
understanding immune system aging", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5,
pp. 927-932.
doi: 10.15789/1563-0625-IAR-16899

© Matveeva K.S. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IAR-16899

INVESTIGATING AGE-RELATED DYNAMICS AND TRANSCRIPTIONAL SIGNATURES OF CD8⁺HLA-DR⁺ REGULATORY T LYMPHOCYTES: PERSPECTIVES IN UNDERSTANDING IMMUNE SYSTEM AGING

Matveeva K.S., Rybtsov S.A., Shevyrev D.V.

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

Abstract. The ability of the CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T lymphocytes population to regulate the immune response was first described several years ago. It is known that the suppressive effects of these cells depend on intercellular interactions and are mediated by the expression of checkpoint inhibitor molecules such as CTLA-4, TIM-3, PD-1 and LAG-3. The CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T cells also share some properties with conventional CD4⁺ regulatory T lymphocytes. Nevertheless, the characteristics and function of this subpopulation remain poorly understood. Furthermore, studying the properties of CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T cells becomes relevant in the light of general age-associated changes in the human immune system and the increased sensitivity of CD8⁺T lymphocytes to these changes. Therefore, the aim of this study was to investigate the age dynamics and search for transcriptional signatures of the CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T cells. For this purpose, flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells from 18 donors aged 21 to 85 years was performed. Bioinformatic analysis of single-cell RNA sequencing data was carried out to search for signatures. It was found that CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T cells accumulate with age. The transcriptional signatures of this population consist of genes involved in antigen presentation and cytotoxicity, along with a decrease in the expression of genes encoding proteins of activating protein 1 complex. These data suggest mechanisms of suppressor function of CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T lymphocytes associated with the ability of these cells to present antigens and perform cytotoxic activity against effector T lymphocytes. The accumulation of the studied cells may imply a potential influence of CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T lymphocytes on the efficiency of adaptive immune response in the aging. Further studies of this population may provide insights into its role in age-related changes in the immune system and develop strategies to improve the immune response in the elderly.

Keywords: T lymphocytes, CD8⁺HLA-DR⁺Treg, aging, transcriptomics, signatures, single cell RNA seq

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) №23-15-00443.

Введение

Регуляторные Т-лимфоциты (Treg) – это подгруппа Т-лимфоцитов, которая играет ключевую роль в регуляции иммунного ответа организма. Основная функция регуляторных Т-лимфоцитов заключается в поддержании иммунологической толерантности и предотвращении избыточного иммунного ответа, который может привести к аутоиммунным заболеваниям или воспалительным процессам. Treg способны подавлять активацию других клеток иммунной системы, таких как Т- и В-лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки, что помогает предотвращать неадекватные иммунные реакции на собственные ткани организма. Это делается путем выработки специфических цитокинов и молекул, которые подавляют активацию и пролиферацию других клеток иммунной системы [4].

Наиболее изученной является популяция конвенциональных CD4⁺Treg, основными фенотипическими маркерами которой являются CD25 и FoxP3, а также низкая экспрессия CD127. При этом представленность FoxP3 и CD127 обратно коррелируют друг с другом [4]. В 2014 г. в периферической и пуповинной крови человека была идентифицирована новая популяция CD8⁺Treg-клеток, характеризующаяся экспрессией HLA-DR. Супрессорная активность CD8⁺HLA-DR⁺-клеток зависит от межклеточного контакта, опосредованного экспрессией на их поверхности молекул CTLA-4 и PD-1 [1]. Среди этих CD8⁺HLA-DR⁺Treg субпопуляция CD28⁺ демонстрирует более высокую супрессивную способность по сравнению с их аналогами негативными по CD28, а также экспрессирует более высокие уровни молекул, ингибирующих контрольные точки: CTLA-4, TIM-3, PD-1 и LAG-3, нейтрализация которых при помощи антител существенно снижает супрессорный эффект популяции CD8⁺HLA-DR⁺Treg [8]. Было обна-

ружено сходство между CD8⁺HLA-DR⁺Treg и CD4⁺FoxP3⁺Treg в отношении экспрессии TIGIT и хемокиновых рецепторов CCR4 и CCR5. Кроме того, после поликлональной стимуляции TCR CD8⁺HLA-DR⁺Treg увеличивают экспрессию IFN γ и TNF α , что свидетельствует о том, что они не являются истощенными клетками, несмотря на экспрессию PD-1 [3].

В контексте того, что CD8⁺T-лимфоциты, в отличие от CD4⁺T-клеток, более подвержены возраст-ассоциированным изменениям [6], углубленное изучение популяции CD8⁺HLA-DR⁺Treg и их изменений с возрастом не только расширит существующие знания о старении регуляторного звена иммунной системы, но также поможет получить данные, позволяющие прогнозировать глобальные изменения компартмента Treg-клеток в глубокой старости. Таким образом, целью данной работы является изучение возрастной динамики и поиск транскрипционных сигнатур субпопуляции CD8⁺HLA-DR⁺Treg.

Материалы и методы

Объект исследования

Для проведения исследования были взяты 18 условно-здоровых доноров в возрасте от 21 до 85 лет. Образцы крови и сопутствующая информация были получены от доноров после получения от них добровольного информированного согласия, утвержденного локальным этическим комитетом (Протокол заседания Комитета по биоэтике НГУ «Сириус» от 6 марта 2023 года). Забор венозной крови производился из локтевой вены доноров в вакуумные пробирки с натрий-гепарином объемом 10 мл.

Выделение мононуклеарных клеток (МНК). Фракцию МНК выделяли из периферической крови методом дифференциального центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности фикола ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Кровь ресуспендировали в 1× PBS с добавлением 0,02% ЭДТА в соотношении 1:1, наносили на фикола и центрифугировали при 8 °C, 660 g в течение 30 минут. После центрифугирования интерфазное кольцо, содержащее МНК, переносили в отдельную пробирку и дважды отмывали в 1× PBS + 0,02% ЭДТА центрифугированием 5 минут при 300 g.

Цитометрический анализ. Для подготовки раствора антител брали требуемый объем буфера для окрашивания (1× PBS + 1% FCS) и вносили в него предварительно рассчитанные объемы меченых флуорохромами антител (CD3 PerCP, клон SK7, #345766 (BD Biosciences, USA); CD8 APC, клон RPA-T8, #17-0088-42 (Thermo Fisher Scientific, USA); HLA-DR PE, клон L243, #347401 (BD Biosciences, USA)), сохраняя для конечного объема соотношение 1 × 10⁶ клеток на 100 мл

объема. Смесь клеток и раствора антител и инкубировали 15 минут при комнатной температуре в темноте, затем клетки дважды отмывали буфером для окрашивания и разбавляли до нужного объема.

Биоинформатический анализ. Для определения транскрипционных сигнатур популяции CD8⁺HLA-DR⁺Treg были взяты два открытых набора данных секвенирования одиночных клеток МНК здоровых доноров, каждый из которых содержал по 10 тысяч клеток (10× Genomics). Обработка данных производилась при помощи пакета scanpy [7]. Пайплайн обработки данных представлен на рисунке 1.

После кластеризации МНК с помощью визуализации уровней экспрессии генов в пространстве UMAP был выделен кластер CD8⁺ эффекторных T-лимфоцитов (CD3E high, CD8A high, CCR7 low; рис. 2A), а входящие в него клетки были отобраны для дальнейшего анализа. Для кластеризации на уровне, позволяющем выделить предполагаемый кластер CD8⁺HLA-DR⁺Treg, отобраным клеткам присваивали их исходные значения каунтов генов и повторяли шаги по предобработке данных. Два этапа кластеризации с предобработкой *de novo* позволяют получить более корректное представление целевых клеток в пространстве сниженной размерности и в итоге увеличить разрешение анализа. По результатам второго этапа кластеризации при помощи визуализации уровней экспрессии генов (HLA-DRA high, TIGIT high; рис. 2B), определяли кластер CD8⁺HLA-DR⁺Treg и вычисляли дифференциально экспрессирующиеся гены между данным кластером и остальными кластерами при помощи критерия Манна–Уитни (рис. 2B).

Обработка данных. Статистическая обработка и визуализация данных производилась с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 10.1.2 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA). Для проверки гипотезы о нормальном распределении выборки использовался критерий Шапиро–Уилка. Данные анализировались с доверительным интервалом 95%, а значение p менее 0,05 считалось показателем значимости. Обработка и визуализация данных проточной цитометрии осуществлялась в программном обеспечении FlowJo™ v. 10.10 (BD Life Sciences, USA).

Результаты и обсуждение

Популяция CD8⁺HLA-DR⁺Treg была выделена в ходе цитометрического анализа образцов МНК доноров в возрасте от 21 до 85 лет. Стратегия гейтирования представлена на рисунке 3A. Последующий статистический анализ этих данных показал, что популяция CD8⁺HLA-DR⁺Treg

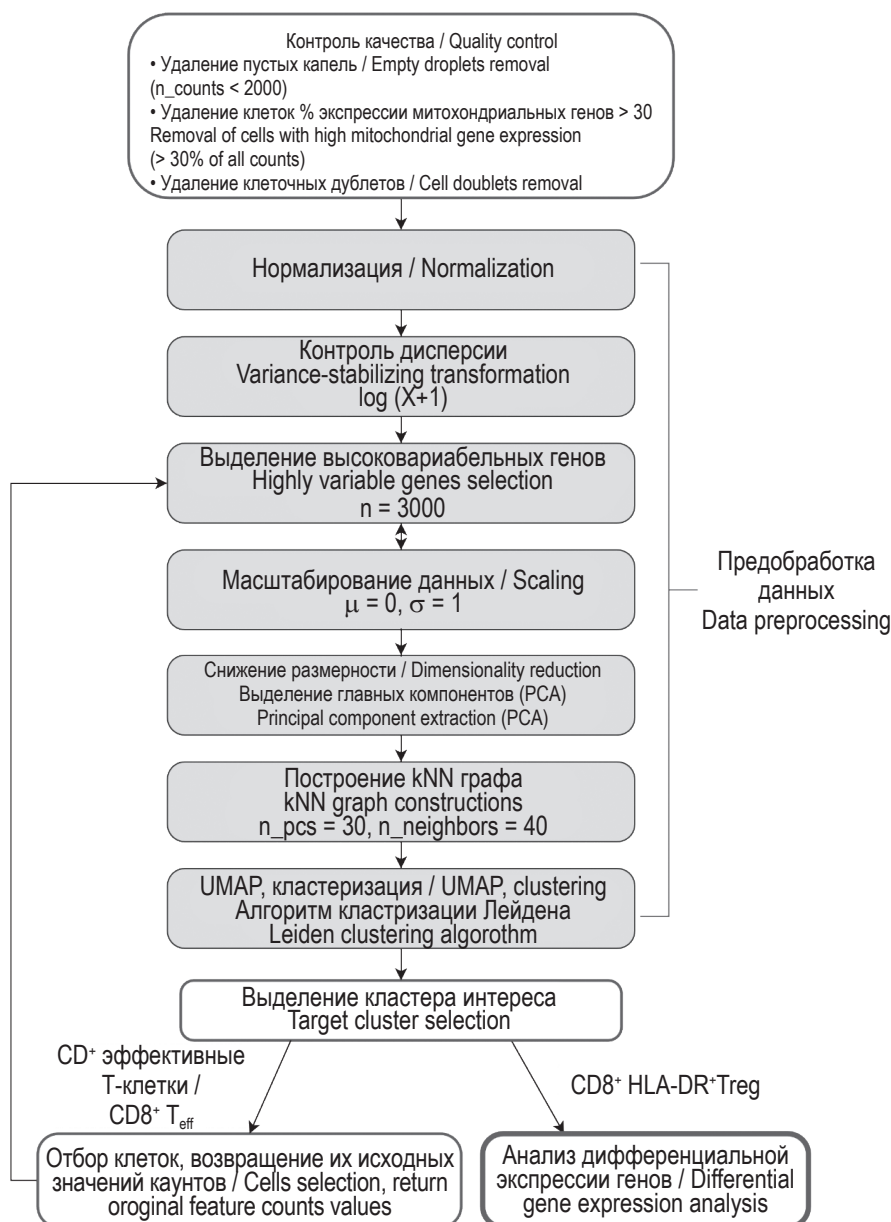


Рисунок 1. Блок-схема стратегии биоинформатического анализа со значениями примененных параметров

Figure 1. Flowchart of the bioinformatics analysis pipeline with values of the applied parameters

накапливается с возрастом (рис. 2Б), что говорит о вовлеченности данной субпопуляции в возраст-ассоциированные изменения иммунной системы. Предполагается, что вместе с характерным для пожилых людей повышением частоты CD4⁺Treg-клеток, накопление CD8⁺HLA-DR⁺Treg может способствовать снижению эффективности адаптивных иммунных реакций в процессе старения [5].

Для более детального описания субпопуляции CD8⁺HLA-DR⁺Treg и поиска молекул, способных прояснить механизм функционирования этих клеток, был проведен биоинформатический

анализ открытых данных РНК секвенирования одиночных клеток (рис. 2). Среди генов с повышенной экспрессией присутствуют группы генов, вовлеченные в презентацию антигенов через молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1, CD74) и реализующие цитотоксичность (GZMA, GZMK, GZMM, NKG7). Также было обнаружено, что в данной субпопуляции снижена экспрессия генов JUN, JUNB и FOS, являющихся субъединицами комплекса белка-активатора 1 (AP-1). Данный транскрипционный фактор регулирует множество процессов,

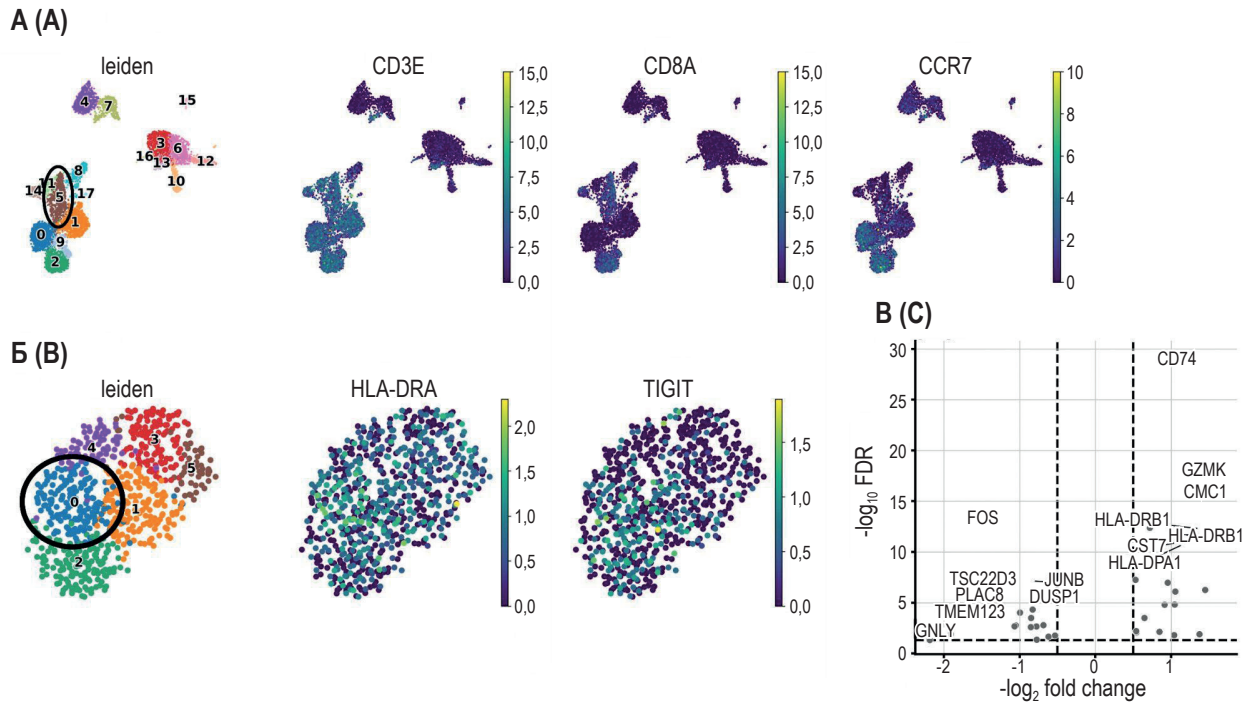


Рисунок 2. Биоинформатический анализ данных РНК секвенирования одиночных клеток

Примечание. А – визуализация кластеризации МНК в представлении UMAP. Кластер под номером 5 (обведен) характеризуется высокой экспрессией генов CD3E, CD8A и низкой экспрессией CCR7, что описывает его как кластер эффекторных $CD8^+$ T-лимфоцитов. Б – визуализация кластеризации эффекторных $CD8^+$ T-лимфоцитов в представлении UMAP. Кластер под номером 0 (обведен) характеризуется повышенной экспрессией HLA-DRA и TIGIT и соответствует кластеру $CD8^+HLA-DR^+Treg$. В – гены, дифференциально экспрессированные в кластере $CD8^+HLA-DR^+Treg$. Названия генов соответствуют 7 генам с повышенной экспрессией ($\log_2 FC > 0,5$) и 7 генам с пониженной экспрессией ($\log_2 FC < 0,5$).

Figure 2. Bioinformatics analysis of single-cell RNA sequencing data

Note. A, visualization of PBMCs clustering in UMAP embedding. Cluster number 5 (encircled) is characterized by high expression of genes CD3E, CD8A and low expression of CCR7, describing it as a cluster of $CD8^+$ effector T lymphocytes. B, visualization of $CD8^+$ effector T lymphocyte clustering in UMAP embedding. Cluster number 0 (encircled) is characterized by increased expression of HLA-DRA and TIGIT, corresponding to the $CD8^+HLA-DR^+Treg$ cluster. C, differentially expressed genes in the $CD8^+HLA-DR^+Treg$ cluster. Gene names correspond to 7 genes with increased expression ($\log_2 FC > 0.5$) and 7 genes with decreased expression ($\log_2 FC < 0.5$).

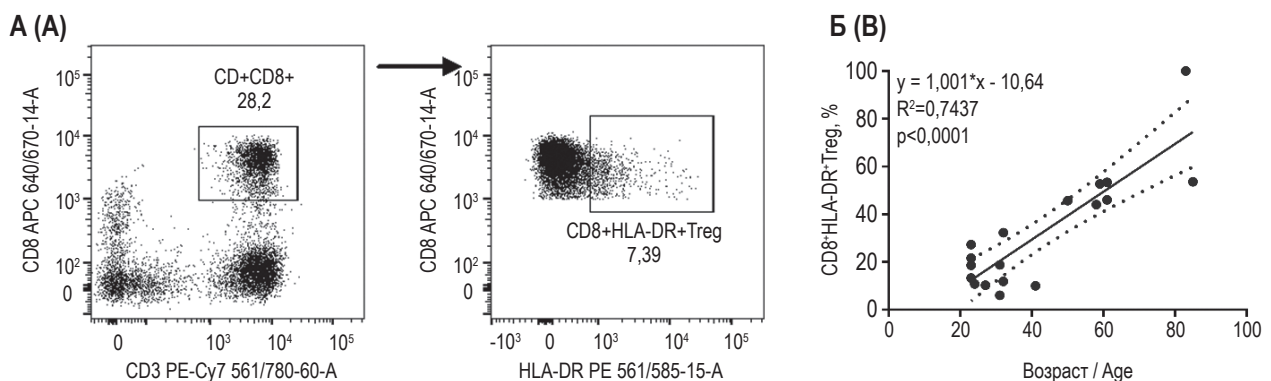


Рисунок 3. Результаты цитометрического анализа субпопуляции $CD8^+HLA-DR^+Treg$

Примечание. А – стратегия гейтирования, использованная при цитометрическом анализе. Популяция $CD3^+CD8^+$ гейтирована из живых одиночных клеток. Б – линейная регрессионная модель, описывающая увеличение процентного содержания субпопуляции $CD8^+HLA-DR^+Treg$ с возрастом.

Figure 3. Results of flow cytometry analysis of the $CD8^+HLA-DR^+Treg$ subpopulation

Note. A, gating strategy used in flow cytometry analysis. $CD3^+CD8^+$ population was gated from live single cells. B, linear regression model describing the increase in percentage content of the $CD8^+HLA-DR^+Treg$ subpopulation with age.

связанных с пролиферацией и активацией клеток. Эффекты AP-1 также играют важную роль в дифференцировке и функционировании в случае Т-лимфоцитов, в том числе Treg. Например, дефицит JunB приводит к снижению супрессивной способности CD4⁺Treg [2]. Исходя из полученных данных можно предположить, что субпопуляция CD8⁺HLA-DR⁺Treg может регулировать CD4⁺ эффекторные Т-лимфоциты за счет способности к антигенной презентации и последующей цитотоксичности в отношении эффекторных Т-лимфоцитов. Вероятно, данная субпопуляция при этом обладает более низкой супрессорной активностью, чем CD4⁺Treg, однако с возрастом способность CD8⁺HLA-DR⁺Treg к регуляции иммунного ответа может приобретать более значимую роль.

Заключение

Таким образом, в данной работе была более детально изучена субпопуляция CD8⁺HLA-DR⁺Treg. Обнаружено, что доля данной популяции в периферической крови линейно увеличивается с возрастом. На уровне транскриптома были найдены гены, потенциально связанные с супрессивной способностью этой популяции, а также сигнатуры, ассоциированные с истощением клеток. Накопление CD8⁺HLA-DR⁺Treg с возрастом позволяет предположить, что данная популяция может быть вовлечены в патологические процессы, ассоциированные с возрастными изменениями. Поэтому важно подтвердить полученные данные экспериментально путем оценки супрессивной и пролиферативной активности популяции CD8⁺HLA-DR⁺Treg.

Список литературы / References

1. Arruvito L., Payaslián F., Baz P., Podhorzer A., Billordo A., Pandolfi J., Semeniuk G., Arribalzaga E., Fainboim L. Identification and Clinical Relevance of Naturally Occurring Human CD8⁺HLA-DR⁺ Regulatory T Cells. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 9, pp. 4469-4476.
2. Katagiri T., Kameda H., Nakano H., Yamazaki S. Regulation of T cell differentiation by the AP-1 transcription factor JunB. *Immunol. Med.*, 2021, Vol. 44, no. 3, pp. 197-203.
3. Machicote A., Belén S., Baz P., Billordo L.A., Fainboim L. Human CD8⁺HLA-DR⁺ Regulatory T Cells, Similarly to Classical CD4⁺Foxp3⁺ Cells, Suppress Immune Responses via PD-1/PD-L1 Axis. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2788. doi: 10.3389/fimmu.2018.02788.
4. Shevyrev D., Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 10, 3100. doi: 10.3389/fimmu.2019.03100.
5. Simone R., Zicca A., Saverino D. The frequency of regulatory CD3⁺CD8⁺CD28⁻CD25⁺ T lymphocytes in human peripheral blood increases with age. *J. Leukoc. Biol.*, 2008, Vol. 84, no. 6, pp. 1454-1461.
6. Whiting C.C., Siebert J., Newman A.M., Du H., Alizadeh A.A., Goronzy J., Weyand C.M., Krishnan E., Fathman C.G., Maecker H.T. Large-Scale and Comprehensive Immune Profiling and Functional Analysis of Normal Human Aging. *PLOS One*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0133627. doi: 10.1371/journal.pone.0133627.
7. Wolf F.A., Angerer P., Theis F.J. SCANPY: Large-scale single-cell gene expression data analysis. *Genome Biol.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 15. doi: 10.1186/s13059-017-1382-0.
8. Yani S.L., Keller M., Melzer F.L., Weinberger B., Pangrazzi L., Sopper S., Trieb K., Lobina M., Orrù V., Fiorillo E., Cucca F., Grubeck-Loebenstein B. CD8⁺HLA-DR⁺ Regulatory T Cells Change With Aging: They Increase in Number, but Lose Checkpoint Inhibitory Molecules and Suppressive Function. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1201. doi: 10.3389/fimmu.2018.01201.

Авторы:

Матвеева К.С. – студент магистратуры направления «Иммунология и биомедицина» АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Рыбцов С.А. – к.б.н., руководитель ресурсного центра клеточных технологий и иммунологии АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Шевырев Д.В. – к.м.н., научный сотрудник ресурсного центра клеточных технологий и иммунологии АНОО ВО «Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Authors:

Matveeva K.S., Master's Student of Immunobiology and Biomedicine Department, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

Rybtsov S.A., PhD (Biology), Head, Cell Technology and Immunology Resource Center, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

Shevyrev D.V., PhD (Medicine), Research Associate, Cell Technology and Immunology Resource Center, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

Поступила 03.04.2024

Отправлена на доработку 09.04.2024

Принята к печати 24.04.2024

Received 03.04.2024

Revision received 09.04.2024

Accepted 24.04.2024

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ И ПРОДУКЦИЯ ИНТЕРФЕРОНОВ I И II ТИПОВ В ЛОКАЛЬНОМ МИКРООКРУЖЕНИИ СИНОНАЗАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Нижегородова Д.Б.^{1,2}, Морозова Н.А.³, Иванчик Г.И.¹, Кулинич С.С.¹,
Колядич Ж.В.³, Зафранская М.М.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск, Республика Беларусь

² Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

³ Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минский район, Республика Беларусь

Резюме. Субпопуляционный состав дендритных клеток и их функциональный потенциал, определяемый эндогенным интерфероновым статусом в микроокружении опухолевой ткани, являются решающим этапом в формировании эффекторных реакций опухоль-специфических Т-лимфоцитов. В связи с этим понимание закономерностей изменения иммунных клеток в условиях синоназальных новообразований является важным в контексте поиска биомаркеров опухолевого процесса, что может открывать новые возможности для разработки таргетной терапии. В данном исследовании впервые приводится сравнительная характеристика субпопуляционного состава дендритных клеток и продукция интерферонов I и II типов у пациентов со злокачественными и доброкачественными синоназальными опухолями.

Материалом исследования явилась опухолевая ткань 30 пациентов с новообразованиями – основная группа (15 пациентов со злокачественными опухолями и 15 пациентов с инвертированной папилломой) и биопсийный материал слизистой оболочки 15 пациентов с полипозным риносинуситом (группа сравнения). Опухоль-инфильтрирующие иммунные клетки выделяли из ткани методом автоматизированной и ферментативной клеточной диссоциации. Поверхностный и внутриклеточный фенотип клеток оценивали с использованием моноклональных антител и метода проточной цитометрии. Продукцию α - и γ -интерферонов определяли методом иммуноферментного анализа. Статистический анализ данных проводили в Statistica 10.0. У пациентов со злокачественными опухолями установлено увеличение количества опухоль-инфильтрирующих миелоидных дендритных клеток относительно группы сравнения, которое коррелировало со стадией онкологического процесса ($R = -0,67$; $p = 0,01$). У пациентов с инвертированной папилломой относительно группы сравнения отмечалось увеличение резидентных как миелоидных, так и плазмоцитоидных дендритных

Адрес для переписки:

Нижегородова Дарья Борисовна
Научно-исследовательский институт
экспериментальной и клинической медицины
220040, Республика Беларусь,
Минский р-н, Боровлянский с/с, а. г. Лесной 106-2.
Тел.: +375 (29) 608-99-94.
E-mail: nzh@tut.by

Address for correspondence:

Darya B. Nizheharodava
Scientific Research Institute of Experimental
and Clinical Medicine
106-2 Lesnoy
Borovlyansky s/s, Minsk Region
220040 Republic of Belarus
Phone: +375 (29) 608-99-94.
E-mail: nzh@tut.by

Образец цитирования:

Д.Б. Нижегородова, Н.А. Морозова, Г.И. Иванчик,
С.С. Кулинич, Ж.В. Колядич, М.М. Зафранская
«Дендритные клетки и продукция интерферонов I и II
типов в локальном микроокружении синоназальных
опухолей» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 5. С. 933-940. doi: 10.15789/1563-0625-DCA-16593
© Нижегородова Д.Б. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.B. Nizheharodava, N.A. Marozava, G.I. Ivanchyk,
S.S. Kulinich, J.V. Kolyadich, M.M. Zafranskaya “Dendritic
cells and type I and II interferon production in the local
microenvironment of sinonasal tumors”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5,
pp. 933-940.
doi: 10.15789/1563-0625-DCA-16593
© Nizheharodava D.B. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DCA-16593

клеток. При этом микроокружение злокачественных новообразований характеризовалось увеличением *in situ* продукции α - и γ -интерферонов в сочетании с выраженным снижением количества IFN γ -продуцирующих Т-клеток, в то время как у пациентов с инвертированной папилломой регистрировалось снижение как внутриклеточной, так и внеклеточной продукции γ -интерферона относительно группы сравнения.

У пациентов с синоназальными опухолями выявлены изменения субпопуляционного состава дендритных клеток и снижение резервных возможностей синтеза γ -интерферона, что может характеризовать вовлечение данных механизмов в формирование несостоятельности противоопухолевого иммунного ответа и требует дальнейшего исследования для установления их патогенетической роли.

Ключевые слова: дендритные клетки, интерфероны, опухолевое микроокружение, синоназальные новообразования, инвертированная папиллома, полипозный риносинусит

DENDRITIC CELLS AND TYPE I AND II INTERFERON PRODUCTION IN THE LOCAL MICROENVIRONMENT OF SINONASAL TUMORS

Nizheharodava D.B.^{a, b}, Marozava N.A.^c, Ivanchyk G.I.^a, Kulinich S.S.^a, Kolyadich J.V.^c, Zafranskaya M.M.^{a, b}

^a Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

^b International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

^c N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk District, Republic of Belarus

Abstract. The subpopulations of dendritic cells and their functional potential determined by endogenous interferon status in tumor microenvironment is an important stage in tumor-specific T-lymphocytes effector reactions development. In this regard, understanding the patterns of sinonasal neoplasms immune cells changes is important in the context of the search for biomarkers of the tumor process which may open up new opportunities for targeted therapy. This study is the first to provide a comparative description of dendritic cells subsets and the type I and type II interferon production in patients with malignant and benign sinonasal tumors.

Tumor tissue from 30 patients with neoplasms – main group (15 patients with malignant tumors and 15 patients with inverted papilloma) and biopsy material of the mucous membrane from 15 patients with polypous rhinosinusitis (comparison group) were used. Tumor-infiltrating immune cells were isolated from tissue using automated and enzymatic cell dissociation. The surface and intracellular cells phenotype was assessed using monoclonal antibodies and flow cytometry. The production of α - and γ -interferons was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Statistical data analysis was proceeded in Statistica 10.0.

An increase of tumor-infiltrating myeloid dendritic cells number was found in patients with malignant tumors as compared to control group what correlated with the stage of the pathological process ($R = -0.67$; $p = 0.01$). There was an increase in both myeloid and plasmacytoid dendritic cells in the neoplasm tissue in patients with inverted papilloma relative to the comparison group. The microenvironment of malignant growth was characterized by an increase in α - and γ -interferons production in combination with a pronounced decrease in IFN γ -producing T cells percent while a decrease in both intracellular and extracellular production of γ -interferons was detected in tumor tissue of patients with inverted papilloma as compared with control group.

In patients with sinonasal tumors changes in dendritic cells subpopulations as well as a decrease in the reserve capacity of γ -interferon synthesis were revealed what may characterize the involvement of these mechanisms in the formation of the antitumor immune response failure and requires further research to establish their pathogenetic role.

Keywords: dendritic cells, interferons, tumor microenvironment, sinonasal neoplasms, inverted papilloma, polypous rhinosinusitis

Введение

Синоназальные опухоли представляют собой важную медико-социальную проблему в связи с выявлением злокачественного процесса на позд-

них стадиях. От 50 до 80% всех злокачественных новообразований полости носа и околоносовых пазух составляет плоскоклеточный рак (с наибольшей частотой встречаемости в европейских странах) [5], в то время как доминирующим ти-

пом доброкачественных синоназальных опухолей (62%) является инвертированная папиллома, риск малигнизации которой варьирует от 7 до 16% [4]. Несмотря на значительные достижения в методах визуализации, эндоскопических хирургических подходах и прецизионной лучевой терапии злокачественных синоназальных новообразований прогноз остается неблагоприятным: общая 5-летняя выживаемость составляет 30-50% с частотой рецидивов 31-56%, являющихся основной причиной смертности [6].

Предлагаемые прогностические биомаркеры эффективности иммунотерапии синоназальных новообразований включают наряду с мутационной нагрузкой наличие опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток [1, 5], однако до сих пор до конца не изучен их субпопуляционный состав и функциональный статус в локальном микроокружении опухолей полости носа и околоносовых пазух.

Одним из ключевых компонентов опухоль-инфильтрирующих клеток являются дендритные клетки, которые представляют собой гетерогенную популяцию, участвующую в распознавании, процессинге и презентации опухолевых антигенов и инициирующих развитие опухоль-специфического Т-клеточного иммунного ответа. Некоторыми авторами продемонстрировано, что количество зрелых дендритных клеток зависит от степени патологического процесса или стадии опухоли и положительно коррелирует с терапевтическим эффектом и общей выживаемостью пациентов с солидными опухолями [2].

Среди основных популяций дендритных клеток выделяют миелоидные или классические (mDCs) и плазматоцитоподобные (pDCs) дендритные клетки. mDCs осуществляют внутриклеточный процессинг и презентацию образующихся при некрозе или апоптозе опухоль-ассоциированных антигенов в составе МНС I класса CD8⁺Т-лимфоцитам, а также эффективно представляют онкоантигены в составе молекул МНС II класса CD4⁺Т-хелперам, стимулируя их поляризацию в Th1-, Th2- и Th17-лимфоциты [11]. В свою очередь Т-хелперы способны напрямую активировать цитотоксические Т-клетки и опосредованно через синтез интерферона II типа (IFN γ) стимулировать макрофаги и NK-клетки. Наряду с реализацией эффекторных механизмов контактной цитотоксичности Т-киллеров и NK-клеток IFN γ принимает участие в ингибировании ангиогенеза в опухолевой ткани, индукции апоптоза регуляторных Т-клеток (Treg), стимуляции активности провоспалительных M1 макрофагов и эффекторных Т-клеток, тем самым подавляя опухолевую прогрессию [12].

pDCs являются основными клетками врожденного иммунитета в связи с их высокой способностью к продукции интерферонов I типа (IFN α и IFN β), которые помимо усиления ме-

ханизмов врожденного иммунитета и формирования противовирусной защиты вовлекаются также в поддержание адаптивных иммунных реакций и участвуют в активации опухоль-специфических Т-лимфоцитов, в том числе за счет кросс-презентации онкоантигенов. При этом IFN I типа инициирует противоопухолевый иммунитет и предотвращает рост и прогрессию новообразования на нескольких уровнях регуляции: на уровне опухолевых клеток – индуцирует апоптоз, останавливает клеточный цикл и усиливает презентацию опухолевых антигенов; на уровне новообразования – предотвращает инвазию и метастазирование; на уровне иммунной системы – усиливает праймирование опухоль-специфических Т-лимфоцитов дендритными клетками наряду с супрессией активности протуморогенных Treg и миелоидных супрессивных клеток [13].

Одним из основных механизмов иммунологического ускользания опухолевых клеток рассматривается нарушение распознавания онкоантигенов дендритными клетками, что приводит к подавлению развития опухоль-специфического Т-клеточного иммунного ответа. Иммуносупрессивное микроокружение опухоли может влиять на эффекторные функции дендритных клеток как посредством растворимых медиаторов (IL-10, TGF- β и PGE2 или VEGF), так и за счет модуляции межклеточного взаимодействия (снижение экспрессии костимулирующих молекул и увеличение коингибиторных молекул), изменяя фенотип дендритных клеток и способствуя их дисфункции в результате формирования толерогенных сигналов [8]. В связи с этим, наряду с количественным содержанием дендритных клеток важен также и цитокиновый профиль микроокружения, который определяет не только созревание дендритных клеток, но и поляризацию Т-лимфоцитов с последующей реализацией их эффекторных реакций.

Целью данного исследования явилась характеристика субпопуляционного состава дендритных клеток и оценка продукции интерферонов I и II типов *in situ* у пациентов со злокачественными и доброкачественными синоназальными новообразованиями.

Материалы и методы

Материалом исследования явились биопсийный материал слизистой оболочки полости носа и околоносовых пазух 45 пациентов (30 мужчин и 15 женщин), возрастом 54,0 (42,0 ÷ 64,0) года, находившихся на лечении в отделении опухолей головы и шеи ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (Минский район, Республика Беларусь). Основную группу составили пациенты со злокачественными новообразованиями полости носа и около-

носовых пазух (группа 1, $n = 15$) и пациенты с инвертированной папилломой (группа 2, $n = 15$). В группу 1 вошли пациенты со следующими диагнозами: плоскоклеточный рак верхнечелюстной пазухи ($n = 7$), меланома полости носа ($n = 3$), рак *in situ* ($n = 2$), рабдомиосаркома полости носа ($n = 2$), нейроэндокринный рак ($n = 1$), из которых у 60% определялась 4 стадия, у 7% – 3 стадия, у 7% – 2 стадия, у 13% – 1 стадия, у 13% – 0 стадия (рак *in situ*). Группу сравнения (ГС) составили пациенты с полипозным риносинуситом ($n = 15$), сопоставимые по возрасту и полу. Диагнозы подтверждались морфологическими исследованиями биопсийного материала. Все пациенты предоставили информированное согласие.

Опухоль-инфильтрирующие иммунные клетки выделяли из биопсийного материала слизистых оболочек путем ферментативной диссоциации опухолевой ткани с использованием набора ферментов Tumor dissociation kit (Miltenyi, Германия) и последующей автоматизированной диссоциацией биоматериала в программируемом диссоциаторе GentleMACS™ Dissociator (Miltenyi, Германия). Жизнеспособность опухоль-инфильтрирующих клеток подтверждали по исключению мертвых клеток окрашиванием трипановым синим, концентрацию выделенных клеток подсчитывали на гематологическом анализаторе Micros (ABX, Франция).

Для получения супернатанта тканевого гомогената ткань слизистой оболочки промывали холодным фосфатно-буферным раствором, измельчали на мелкие фрагменты, взвешивали и криоконсервировали в жидком азоте с последующим хранением образцов при -70°C . После размораживания образцы ткани гомогенизировали в холодном фосфатно-буферном растворе (масса ткани (г): объем раствора (мл) = 1:9) и проводили механическую гомогенизацию в диссоциаторе. Для получения супернатанта гомогенаты тканей центрифугировали в течение 10 мин при $5000 \times g$ и температуре $2-8^{\circ}\text{C}$.

Субпопуляционный состав опухоль-инфильтрирующих дендритных клеток определяли методом проточной цитометрии с использованием панели моноклональных DuraClone IM Dendritic Cells, включающей CD16-FITC, CD1c-PC5.5, CD11c-PC7, CD123-APC-A700, HLA-DR-PB, Clec9A-APC, Lin-PE, CD45K α O (Beckman Coulter, Германия). Для фенотипирования к 100 мкл опухоль-инфильтрирующих клеток добавляли коктейли моноклональных антител в концентрации согласно инструкции производителя. Инкубацию проб с моноклональными антителами осуществляли в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Регистрацию результатов выполняли на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США).

Внутриклеточную продукцию $\text{IFN}\gamma$ определяли в суточных культурах опухоль-инфиль-

трирующих клеток, в которые за 4 ч до окончания культивирования добавляли 10 нг/мл форбол 12-миристат 13-ацетата (Sigma, Германия), 1 мкг/мл кальциевой соли иономицина (Cayman Chemicals, США) и 10 мкг/мл брэфелдина А (Cayman Chemicals, США). После инкубации клетки окрашивали моноклональными антителами CD3-FITC (Beckman Coulter, США) и CD45-PB (Biolegend, США) и фиксировали в течение 10 мин 4% раствором пара-формальдегида. После отмывания клеток центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин добавляли моноклональные антитела $\text{IFN}\gamma$ -PE (Beckman Coulter, США), разведенные в 2% Triton X-100 (Sigma, Германия). Учет результатов проводили на проточном цитометре CytoFlex на 10000 T-лимфоцитов.

Концентрацию цитокинов $\text{IFN}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$ в супернатантах тканевых гомогенатов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием следующих коммерческих наборов: «альфа-Интерферон-ИФА-БЕСТ» (А-8758, ЗАО «Вектор-Бест», РФ, диагностическая чувствительность – 5,0 пг/мл) и «гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ» (А-8752, ЗАО «Вектор-Бест», РФ, диагностическая чувствительность – 2,0 пг/мл). Все этапы исследований осуществляли в соответствии с инструкцией фирмы изготовителя. Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли на спектрофотометре Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны $\lambda = 450 \text{ нм}$.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 10.0. Статистически значимые различия определяли при уровне $p < 0,05$. Для характеристики исследуемых групп использовались показатели медианы (Me), нижнего и верхнего процентилей (25-й процентиль ÷ 75-й процентиль). Сравнение групп и определение статистической значимости различий осуществлялась непараметрическим U-критерием Манна-Уитни для независимых переменных. Корреляционный анализ выполняли по Спирмену с расчетом коэффициентов корреляции (R).

Результаты и обсуждение

Современная концепция противоопухолевого иммунитета предполагает, что распознавание опухолевых антигенов и инициация иммунных реакций зависят от типа антиген-презентирующих клеток. В связи с этим у пациентов исследуемых групп охарактеризован *in situ* субпопуляционный состав дендритных клеток, выступающих в качестве профессиональных антиген-презентирующих клеток, по экспрессии CD123 и CD11c маркерам: CD123⁺CD11c⁺mDCs и CD123⁺CD11c⁻pDCs. Результаты представлены на рисунке 1.

У пациентов группы 1 установлено увеличение количества mDCs в ткани новообразования относительно ГС ($p = 0,004$), которое коррелировало со стадией онкологического процесса ($R = -0,67$; $p = 0,01$). В группе 2 отмечалось повышение процента как mDCs ($p = 0,002$) относительно ГС, так и pDCs ($p = 0,02$) относительно исследуемых групп. При этом у пациентов с инвертированной папилломой регистрировалось превалирование субпопуляции pDCs (39,4 (18,1 ÷ 59,0) %) относительно mDCs (23,2 (16,8 ÷ 58,1) %) среди опухоль-инфильтрирующих дендритных клеток, что не отмечалось у пациентов со злокачественными опухолями и ГС (рис. 1).

Выявленное в основной группе пациентов увеличение mDCs в слизистых оболочках новообразований отражает активацию механизмов противоопухолевого иммунитета *in situ* и подтверждает их активное вовлечение в формирование специфического клеточного иммунного ответа на опухолевые антигены вне зависимости от типа новообразования. Установленная корреляция опухоль-инфильтрирующих mDCs со стадией заболевания в группе 1 согласуется с литературными данными о высокой иммуногенности дендритных клеток на ранних стадиях злокачественного процесса [10]. При этом с прогрессированием заболевания рядом авторов показано, что дендритные клетки могут приобретать иммуносупрессивный фенотип (MHC II^{low}, CD40^{low} и PD-L1^{high}) или трансформироваться в регуляторные макрофаг-подобные клетки, способные за счет продукции оксида азота, активности аргиназы и синтеза IL-10 подавлять Т-клеточный ответ [11].

Принимая во внимание факт, что pDCs являются ключевыми участниками противовирусного иммунитета, выявленное их преимущественное увеличение в сочетании с повышением mDCs у пациентов с инвертированной папилломой может быть также результатом формирования иммунного ответа на папилломавирусную инфекцию, 16-й и 18-й серотип которой в большинстве случаев ассоциируется с развитием доброкачественного новообразования [2]. Кроме того, pDCs, представляя основной источник ИФН I типа, являются ключевыми регуляторами созревания mDCs в опухолевом микроокружении и за счет индукции дифференцировки mDCs усиливают эффекторные киллерные функции CD8⁺Т-клеток и NK-клеток. Противоопухолевая активность pDCs также опосредована экспрессией цитотоксических молекул гранзима В и TRAIL [12]. Однако, с другой стороны, pDCs могут способствовать росту опухоли за счет экспрессии иммуносупрессивных молекул, таких как PD-L1, ICOSL, индоламин-2,3-диоксигеназа или за счет экспансии Treg [13].

В связи с тем, что микроокружение опухоли формирует неблагоприятную среду для нормального функционирования дендритных клеток и большая часть из них являются незрелыми или находятся в состоянии анергии, происходит изменение не только их субпопуляционного состава, но и локального цитокинового баланса, в частности эндогенного интерферонового статуса. Принимая во внимание, что дендритные клетки являются основными продуцентами и клетками-мишенями для интерферонов, являющихся ключевыми регуляторами противоопухолевого иммунитета, изучена продукция IFN α и IFN γ су-

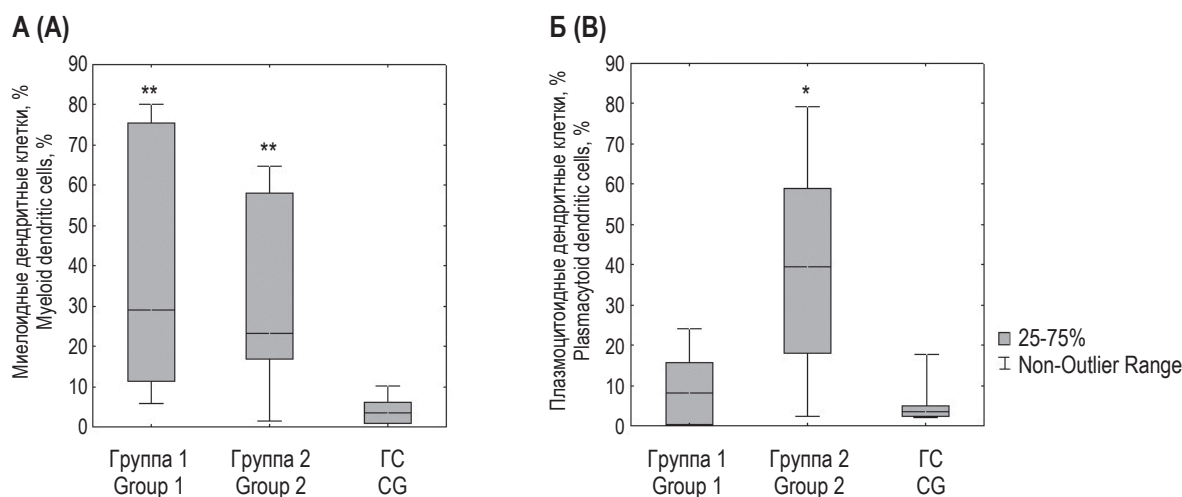


Рисунок 1. Количество миелоидных (А) и плазмацитоидных (Б) дендритных клеток среди опухоль-инфильтрирующих дендритных клеток у пациентов исследуемых групп, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$) – медиана, 25-й и 75-й процентиль; ГС – группа сравнения.

Figure 1. Myeloid (A) and plasmacytoid (B) dendritic cells number of among tumor-infiltrating dendritic cells in patients of investigated groups, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

Note. *, p-value < 0,05; **, p-value < 0,01; Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$), median, 25th and 75th percentiles; CG, comparison group.

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ИНТЕРФЕРОНОВ В ТКАНИ У ПАЦИЕНТОВ ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. THE CONCENTRATION OF INTERFERONS IN TISSUE SAMPLES FROM PATIENTS OF INVESTIGATED GROUPS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Интерфероны Interferons	Основная группа Main group		Группа сравнения Comparison group	p
	группа 1 / group 1	группа 2 / group 2		
IFN α , пг/мл IFN α , pg/mL	99,8 (92,1 ÷ 104,7)	65,4 (25,7 ÷ 88,5)	51,2 (33,8 ÷ 96,2)	p ₁₋₂ = 0,08
IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	115,1 (101,8 ÷ 120,0)	12,1 (6,1 ÷ 44,2)	43,6 (37,5 ÷ 59,3)	p ₁₋₂ = 0,03 p _{1-ГС} = 0,01

Примечание. p – уровень статистически значимых различий; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) – медиана, 25-й и 75-й процентиль; IFN α – α -интерферон; IFN γ – γ -интерферон.

Note. p-value, statistically significant test result; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), median, 25th and 75th percentiles; IFN α , α -interferon; IFN γ , γ -interferon.

пернатантах тканевых гомогенатов у пациентов исследуемых групп (табл. 1).

У пациентов группы 1 наблюдалась тенденция к увеличению локальной продукции IFN α (p = 0,08) относительно группы 2 в сочетании со статистически значимым повышением синтеза IFN γ по сравнению с аналогичными показателями в исследуемых группах. В то же время у пациентов группы 2 показатели уровня локального синтеза интерферонов I и II типов статистически значимо не отличались от таковых в ГС (табл. 1).

Известно, что уровень IFN I типа зависит от субпопуляционного состава дендритных клеток. В частности, pDCs являются преимущественным источником IFN I типа, которые при стимуляции эндосомальных TLR3/7/8/9 продуцируют его в 100 раз больше, чем классические mDCs. Так, иммунотерапевтические подходы, используемые у пациентов со злокачественными опухолями, основаны на стимуляции продукции IFN I типа pDCs для последующей активации классиче-

ских mDCs и генерации опухоль-специфических CD8⁺T-лимфоцитов [14].

Принимая во внимание отсутствие статистически значимых изменений в количестве опухоль-инфильтрирующих pDCs у пациентов группы 1, можно предположить, что основной вклад в повышение продукции IFN α происходит за счет популяции mDCs. Это согласуется с данными Zhou и соавторов, свидетельствующие о том, что опухолевое микроокружение плоскоклеточного рака может ингибировать дифференцировку pDCs и их созревание в результате снижения TLR7 и повышенной концентрации TGF β , IL-10, VEGF, что ведет к формированию толерогенного фенотипа и подавлению противоопухолевого иммунитета [13]. В то же время отсутствие изменений в локальной продукции IFN α в сочетании со статистически значимым увеличением количества pDCs у пациентов группы 2 может свидетельствовать о функциональной несостоятельности. Согласно литературным данным до сих пор не известно, в какой степени опухоль-инфильтри-

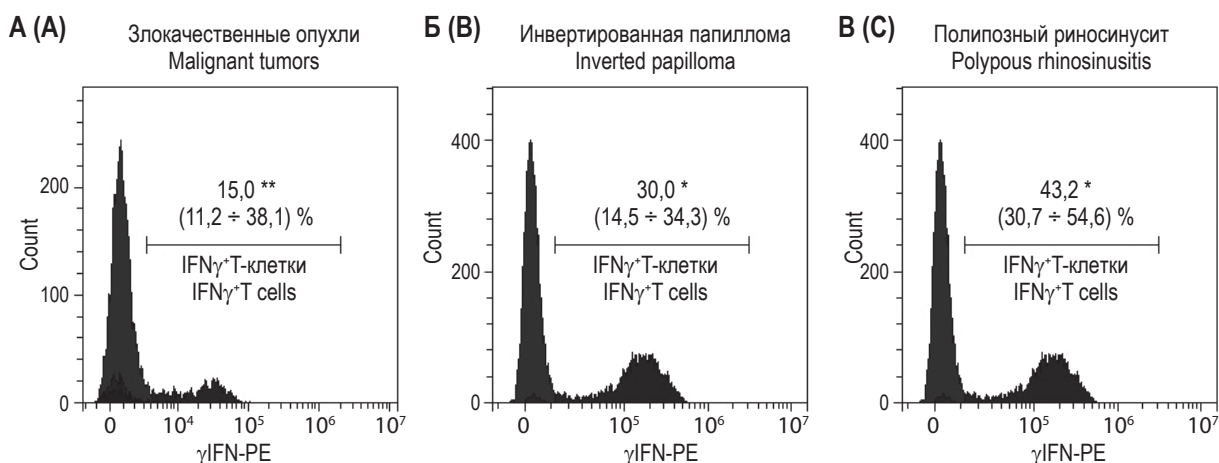


Рисунок 2. Количество CD3⁺IFN γ ⁺T-лимфоцитов в микроокружении опухоли у пациентов исследуемых групп, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Примечание. * – p < 0,05; ** – p < 0,01; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) – медиана, 25-й и 75-й процентиль; ГС – группа сравнения.

Figure 2. CD3⁺IFN γ ⁺T-lymphocytes number in the tumor microenvironment in patients of investigated groups, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Note. *, p-value < 0,05; **, p-value < 0,01; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), median, 25th and 75th percentiles.

рующие дендритные клетки являются надежным источником ИФН I типа. Некоторыми авторами показано, что среди опухоль-инфильтрирующих дендритных клеток находятся дефектные pDCs, не способные синтезировать IFN α в результате нарушения регуляции сигнального пути IFN I типа или потери экспрессии его рецептора [15].

Несмотря на то, что иммунологических функций IFN I и II типа часто перекрываются, тем не менее, IFN γ является основным эффекторным противоопухолевым цитокином и обладает большим иммунорегуляторным потенциалом, поскольку его механизмы способствует не только оптимизации иммунологических реакций, но и направлены на ограничение воспалительных реакций, которые вызывают повреждение тканей [7]. Учитывая выраженную *in situ* продукцию IFN γ у пациентов группы 1 (табл. 1), параллельно проведена оценка количества CD3⁺IFN γ ⁺Т-лимфоцитов в ткани у пациентов исследуемых групп для характеристики опухоль-специфического потенциала Т-клеточного иммунного ответа и его резервных возможностей на основе сопоставления внеклеточной и внутриклеточной продукции IFN γ (рис. 2).

У пациентов группы 1 получены результаты, противоположные внеклеточной продукции IFN γ , характеризующиеся снижением внутриклеточной продукции IFN γ в опухоль-инфильтрирующих CD3⁺Т-лимфоцитах относительно ГС ($p = 0,01$). Аналогичное уменьшение процента CD3⁺IFN γ ⁺Т-лимфоцитов в локальном микроокружении выявлено у пациентов группы 2 относительно ГС ($p = 0,02$). При этом у пациентов группы 1 снижение количества CD3⁺IFN γ ⁺Т-лимфоцитов в ткани новообразования наблюдалось в 61,5% случаев, в то время как у пациентов группы 2 – в 35,7% случаев. Наряду с этим, у пациентов со злокачественными новообразованиями выявлена взаимосвязь интерферонов I и II ти-

пов: с увеличением локальной продукцией IFN α опухоль-инфильтрирующими клетками количество внутриклеточной продукции IFN γ CD3⁺Т-лимфоцитами снижалось ($R = -0,9$, $p = 0,03$).

Заключение

Микроокружение синоназальных злокачественных опухолей характеризуется увеличением количества mDCs на фоне тенденции к повышению локальной продукции IFN α и высоким уровнем IFN γ в сочетании с выраженным снижением количества IFN γ -продуцирующих Т-клеток. Это может являться отражением функционирования опухоль-специфического иммунного ответа и свидетельствует о реализации эффекторного IFN γ -медиированного потенциала Т-клетками в полном объеме в очаге патологического процесса, что может приводить к несостоятельности в результате иммунологического истощения цитотоксических Т-лимфоцитов и снижения резервных возможностей клеточного иммунитета.

У пациентов с инвертированной папилломой выявлено увеличение всех субпопуляций дендритных клеток с превалированием pDCs при отсутствии изменений в концентрации IFN α и снижении как внутриклеточной, так и внеклеточной продукции IFN γ в очаге новообразования. Полученные данные могут свидетельствовать о недостаточной стимуляции эффекторных реакций, опосредованных интерфероном II типа со стороны pDCs и требуют дальнейшего детального исследования на уровне механизмов индукции и регуляции синтеза интерферонов.

Таким образом, изменение соотношения внутриклеточной и внеклеточной продукции IFN γ в совокупности с субпопуляционным составом дендритных клеток могут быть использованы в качестве потенциальных биомаркеров вероятности развития злокачественных опухолей у пациентов с предопухолевой патологией.

Список литературы / References

1. De Meulenaere A., Vermassen T., Aspeslagh S., Vandecasteele K., Rottey S., Ferdinande L. TILs in head and neck cancer: ready for clinical implementation and why (not)? *Head Neck Pathol.*, 2017, Vol. 11, no. 3, pp. 354-363.
2. Del Prete A., Salvi V., Soriani A., Laffranchi M., Sozio F., Bosisio D., Sozzani S. Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing. *Cell. Mol. Immunol.*, 2023, Vol., 20, no. 5, pp. 432-447.
3. Diao J., Mikhailova A., Tang M., Gu H., Zhao J., Cattral M.S. Immunostimulatory conventional dendritic cells evolve into regulatory macrophage-like cells. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 21, pp. 4919-4927.
4. Eide J.G., Welch K.C., Adappa N.D., Palmer J.N., Tong C.C.L. Sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma: contemporary management and patient outcomes. *Cancers (Basel)*, 2022, Vol. 14, no. 9, 2195. doi: 10.3390/cancers14092195.
5. García-Marín R., Reda S., Riobello C., Cabal V.N., Suárez-Fernández L., Vivanco B., Álvarez-Marcos C., López F., Llorente J.L., Hermsen M.A. Prognostic and therapeutic implications of immune classification by CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in sinonasal squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 13, 6926. doi: 10.3390/ijms22136926.
6. Gu J.T., Claudio N., Betts C., Sivagnanam S., Geltzeiler M., Pucci F. Characterization of the tumor immune microenvironment of sinonasal squamous-cell carcinoma. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, 2022, Vol. 12, no. 1, pp. 39-50.
7. Gulubova M. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells and cancer – new insights. *Open Access Maced. J. Med. Sci.*, 2019, Vol. 7, no. 19, pp. 3324-3340.
8. Gupta Y.H., Khanom A., Acton S.E. Control of dendritic cell function within the tumour microenvironment. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 10, no. 13, 733800. doi: 10.3389/fimmu.2022.733800.

9. Mitchell D., Chintala S., Dey M. Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer. *J. Neuroimmunol.*, 2018, Vol. 322, pp. 63-73.
10. Musella M., Galassi C., Manduca N., Sistigu A. The yin and yang of type I IFNs in cancer promotion and immune activation. *Biology (Basel)*, 2021, Vol. 10, no. 9, 856. doi: 10.3390/biology10090856.
11. Plesca I., Müller L., Böttcher J.P., Medyouf H., Wehner R., Schmitz M. Tumor-associated human dendritic cell subsets: phenotype, functional orientation, and clinical relevance. *Eur. J. Immunol.*, 2022, Vol. 52, no. 11, pp. 1750-1758.
12. Sittig S.P., De Vries I.J., Schreiber G. Primary human blood dendritic cells for cancer immunotherapy – tailoring the immune response by dendritic cell maturation. *Biomedicine*, 2015, Vol. 3, no. 4, pp. 282-303.
13. Sprooten J., Agostinis P., Garg A.D. Type I interferons and dendritic cells in cancer immunotherapy. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, 2019, Vol. 348, pp. 217-262.
14. Wu J., Li S., Yang Y., Zhu S., Zhang M., Qiao Y., Liu Y., Chen J. TLR-activated plasmacytoid dendritic cells inhibit breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 7, pp. 11708-11718.
15. Zhou B., Lawrence T., Liang Y. The role of plasmacytoid dendritic cells in cancers. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 749190. doi: 10.3389/fimmu.2021.749190.

Авторы:

Нижегородова Д.Б. – к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории, Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета; доцент кафедры иммунологии, Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

Морозова Н.А. – аспирант, врач – онколог-хирург отделения опухолей головы и шеи, Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минский район, Республика Беларусь

Иванчик Г.И. – старший научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории, Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск, Республика Беларусь

Кулинич С.С. – аспирант, научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории, Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск, Республика Беларусь

Колядич Ж.В. – д.м.н., профессор, заведующая лабораторией онкопатологии центральной нервной системы с группой онкопатологии головы и шеи, Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минский район, Республика Беларусь

Зафранская М.М. – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории, Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета; заведующая кафедрой иммунологии, Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

Authors:

Nizheharodava D.B., PhD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Immunology and Biomedical Technologies Department of Central Research Labor, Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University; Associate Professor, Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Marozava N.A., Postgraduate Student, Oncologist-Surgeon, Head and Neck Tumors Department, N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk District, Republic of Belarus

Ivanchyk G.I., Senior Research Associate, Immunology and Biomedical Technologies Department of Central Research Labor, Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Kulinich S.S., Postgraduate Student, Research Associate, Immunology and Biomedical Technologies Department of Central Research Labor, Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Kolyadich J.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Oncopathology of the Central Nervous System with a Group of Oncopathology of the Head and Neck, N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk District, Republic of Belarus

Zafranskaya M.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Immunology and Biomedical Technologies Department of Central Research Labor, Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Belarusian State Medical University; Head, Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Поступила 26.03.2024
Отправлена на доработку 08.04.2024
Принята к печати 10.04.2024

Received 26.03.2024
Revision received 08.04.2024
Accepted 10.04.2024

ИММУННЫЙ ОТВЕТ, ФОРМИРУЕМЫЙ ВВЕДЕНИЕМ ТРАНСГЕННЫМ МЫШАМ ДНК-ВЕКТОРА, СОДЕРЖАЩЕГО ФРАГМЕНТ КДНК ГЕНА РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА

Зубков А.В.¹, Бутова Л.Г.¹, Кузьмина Н.С.¹, Яковлева И.В.¹,
Гаврилова Н.Ф.¹, Корноухова А.А.¹, Сидоров А.В.¹,
Хрейм Уаель Б.В.², Кузьменко В.В.², Зубкова И.В.³, Фадеев В.В.³

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

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

Резюме. Во всем мире растет число больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (диффузный токсический зоб, аутоиммунный тиреоидит). Важнейшим моментом в диагностике диффузного токсического зоба является выявление аутоантител к рецептору тиреотропного гормона (рТТГ) в сыворотке крови больных. Для дифференциальной диагностики антител к антигенам щитовидной железы перспективно тестирование на основе моноклональных антител к рецептору тиреотропного гормона человека, которые можно получить не только в результате иммунизации животных нативным или рекомбинантным белком рецептора тиреотропного гормона, но и при ДНК-иммунизации генно-инженерными конструкциями, содержащими фрагменты гена рТТГ. На базе мРНК, выделенной нами из ткани щитовидной железы пациентов с диффузным токсическим зобом, клонирован ряд фрагментов гена рецептора тиреотропина, которые могли бы быть пригодны для ДНК-иммунизации животных; оценить один из сконструированных векторов – рVAX1pТТГ (1160) в качестве иммуногена на мышинной модели стало целью настоящей работы. Наличие фрагмента гена рецептора тиреотропного гормона, размером 1160 п.н., который был трансфецирован в составе вектора рVAX1 в клеточную линию CHO, было установлено методами иммуноблоттинга и ИФА. Иммунный ответ, формирующийся на введение мышам линии BALB/c вектора рVAX1, содержащего фрагмент кДНК гена рецептора тиреотропного гормона человека, был выявлен в разных вариантах ИФА. Иммунизация животных ДНК-вектором рVAX1-рТТГ по экспериментально подобранной схе-

Адрес для переписки:

Зубков Александр Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (903) 618-02-78.
E-mail: alex_zubkov@list.ru

Address for correspondence:

Alexander V. Zubkov
I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera
5a Malyy Kazenny Lane
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (903) 618-02-78.
E-mail: alex_zubkov@list.ru

Образец цитирования:

А.В. Зубков, Л.Г. Бутова, Н.С. Кузьмина,
И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, А.А. Корноухова,
А.В. Сидоров, Б.В. Хрейм Уаель, В.В. Кузьменко,
И.В. Зубкова, В.В. Фадеев «Иммуный ответ,
формируемый введением трансгенным мышам
ДНК-вектора, содержащего фрагмент кДНК
гена рецептора тиреотропного гормона человека»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5.
С. 941-952. doi: 10.15789/1563-0625-TIR-16841

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

For citation:

A.V. Zubkov, L.G. Butova, N.S. Kuzmina, I.V. Yakovleva,
N.F. Gavrilova, A.A. Kornoukhova, A.V. Sidorov, B.V. Khraim
Wael, V.V. Kuzmenko, I.V. Zubkova, V.V. Fadeev
“The immune response formed by the introduction of a DNA
vector containing a cDNA fragment of the human thyroid-
stimulating hormone receptor gene into transgenic mice”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 5, pp. 941-952.
doi: 10.15789/1563-0625-TIR-16841

© Zubkov A.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-TIR-16841

ме оказалась эффективной для формирования у опытных животных спленоцитов, секретирующих антитела к рецептору тиреотропного гормона человека, которые были использованы для успешной гибридизации. Это подтверждалось результатами определения антител — продукции к рецептору тиреотропного гормона человека в сыворотках крови мышей: уровень продукции антител оставался высоким (титр более 1:10 000) на 8-й неделе эксперимента. В результате селекции индивидуальных клонов по критериям пролиферативной активности и стабильности продукции антител были отобраны наиболее стабильные культуры гибридом, секретирующие МкАт против рецептора тиреотропного гормона человека.

Ключевые слова: рТТГ, ДНК-иммунизация, мышинная модель аутоиммунного заболевания, МкАт против рТТГ, аутоантитела, иммунный ответ

THE IMMUNE RESPONSE FORMED BY THE INTRODUCTION OF A DNA VECTOR CONTAINING A cDNA FRAGMENT OF THE HUMAN THYROID-STIMULATING HORMONE RECEPTOR GENE INTO TRANSGENIC MICE

Zubkov A.V.^a, Butova L.G.^a, Kuzmina N.S.^a, Yakovleva I.V.^a,
Gavrilova N.F.^a, Kornoukhova A.A.^a, Sidorov A.V.^a, Khraim Wael B.V.^b,
Kuzmenko V.V.^b, Zubkova I.V.^c, Fadeev V.V.^c

^a I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. The number of patients with autoimmune thyroid diseases (Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis) is increasing globally. The most important part in the diagnosis of Graves' disease (GD) is the detection of autoantibodies to the thyrotropin receptor (TSHR) in Graves' patients' sera. For the differential diagnosis of antibodies to thyroid antigens, it is promising to use tests based on monoclonal antibodies to TSHR, which can be obtained not only as a result of immunization with native or recombinant TSHR protein, but also through DNA immunization with genetically engineered constructs containing fragments of the TSHR gene. Based on mRNA we isolated from the thyroid tissue in GD, a number of fragments of the thyrotropin receptor gene were cloned, suitable for DNA immunization of animals. The purpose of this work is to evaluate the immunogenic properties of one of the constructed vectors, pVAX1-TSHR (1160), in a mouse model. The successful inclusion of the extracellular domain gene fragment of the human TSHR (1160), which was transfected into CHO cells as a part of the pVAX1 vector was confirmed by immunoblotting and ELISA. The immune response formed to the injection of the pVAX1 vector into BALB/c mice, containing a fragment of the human TSHR gene, was detected in different versions of ELISA. Immunization of animals with the DNA vector pVAX1-TSHR according to an experimentally selected scheme was effective for the formation of mouse splenocytes, secreting antibodies to TSHR, which were used for successful hybridization. This was confirmed by the results of determining antibody production to TSHR in murine blood sera. The level of antibody production remained high (titer more than 1:10.000) at the 8th week of the experiment. As a result of selection of individual clones according to the criteria of proliferative activity and stability of antibody production, the most stable cultures secreting mAbs against TSHR were selected.

Keywords: TSHR, DNA immunization, mouse model of autoimmune disease, mAb against TSHR, autoantibodies, immune response

Введение

Диффузный токсический зоб (ДТЗ) — аутоиммунное заболевание, приводящее к нарушению функции щитовидной железы (ЩЖ), в форме гипертиреоза, имеет распространенность в популяции от 0,5% (у мужчин) до 2,0% (у женщин), с тенденцией к увеличению заболеваемости [7]. В

сыворотке крови больных с ДТЗ аутоантитела к рецептору ТТГ, индуцирующие развитие гипертиреоза и зоба, определяются в 89-98% случаев [10]. Аутоантитела к рецептору тиреотропина (рТТГ или TSHR) представляют преимущественно изотип IgG и, следовательно, зависят от CD4⁺T-клеток для их генерации [14].

Показано, что стимулирующие ЩЖ антитела могут генерироваться у мышей, например плазмида TSHR-ДНК, введенная разными способами мышам, индуцирует синтез тиреостимулирующих антител (TSAb) у мышей линии BALB/c, а также гипертиреоз у беспородных мышей [8]. Сообщалось о возможности разработки модели иммунного ответа, приводящей к образованию трансгенных мышей с экспрессией человеческой А-субъединицы TSHR, с помощью инъекций pVAX1-TSHR, аналогично иммунизации белком TSHR человека. Уникальный экспрессионный вектор pVAX1 часто используется для формирования иммунного ответа с помощью ДНК-вакцин [6].

В результате выделения нами мРНК из ткани ЩЖ больного ДТЗ на матрице кДНК амплифицированы ПЦР-продукты, соответствующие фрагментам гена внеклеточного домена рТТГ, и создана коллекция клонов-продуцентов рекомбинантных плазмид рAL2-Т. Участок гена рТТГ, 1160 п.н., который почти полностью кодирует фрагмент альфа-субъединицы рТТГ, был реконструирован с помощью pVAX1. Нуклеотидная последовательность фрагмента рТТГ1160 после клонирования в вектор pVAX1 была определена методом секвенирования по Сэнгеру, и оказалась полностью идентичной последовательности рТТГ, депонированной в GenBank [1]. **Целью настоящей работы** стало оценить иммуногенные свойства созданного вектора pVAX1-рТТГ 1160 на модели мыши.

Материалы и методы

Штаммы и линии

Векторы: pVAX1, pVAX1-TSHR 1160;

Штамм *Escherichia coli*: XL1 Blue;

Клеточные линии:

клетки миеломы мыши линии P3X63Ag8.653, спленоциты, макрофаги мышей линии BALB/c,

клетки яичника китайского хомячка Chinese Hamster Ovary (CHO),

Cell Line: E77.4 ATCC;

Мыши линии BALB/c.

Для создания вектора pVAX1, экспрессирующего часть модели TSHR1160, использовали фрагмент гена рТТГ, кодирующий альфа-субъединицу рТТГ.

Сыворотки, антисыворотки и конъюгаты антител

Сыворотки крови доноров и больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (АИЗ ЩЖ), содержащие различные концентрации АТ к рТТГ, предоставлены ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России.

МкАт мыши против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой из корня хрена, произведены ЛТД «Сорбент» (Москва, Россия).

Иммунизация лабораторных животных

В работе использовали мышей линии BALB/c, выращенных в питомнике: Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Исследования на животных проводили в соответствии с международными и российскими рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных. Состояние мышей (поведение, масса тела, внешний вид, дыхание) контролировали в течение периода иммунизации [2].

Для иммунизации животных в качестве антигенов использовали препараты плазмидной ДНК, реконструированной с использованием pVAX1. Для увеличения количества вектора, необходимого для иммунизации животных, плазмиды pVAX1-TSHR1160 и pVAX1 без вставки были трансформированы в компетентные клетки *Escherichia coli*, XL-1Blue, предоставленные ЗАО «Евроген» (Россия). Выделение плазмидной ДНК из ночной культуры *E. coli* XL-1Blue произведено с помощью набора Plasmid Miniprep ЗАО «Евроген» (Россия) по методике производителя. Концентрацию плазмидной ДНК в полученных препаратах измеряли на анализаторе NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Инъекции препаратами, содержащими рекомбинантные плазмиды pVAX1, pVAX1-TSHR1160, проводили 1,5-3,0-месячным мышам линии BALB/c, массой (18,0-23,0) г внутримышечно (в четырехглавую мышцу задней конечности) или внутрибрюшинным способом по 25,0 мкг в объеме (0,20±0,05) мл в расчете на одну особь. Перед инъекцией антигены разводили в стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl).

Доза и кратность введения антигена, продолжительность иммунизации и интервалы между инъекциями варьировались.

Схема для 1-го эксперимента: А. Шестинедельных мышей иммунизировали путем внутрибрюшинной инъекции pVAX1 (n = 3), pVAX1c экспрессией усеченной версии (TSHR 1160) (n = 5), по 25 мкг в объеме (0,20 ± 0,05) мл в расчете на особь: 0, 1, 3 (недели). Контрольной группе мышей (n = 3) вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме (0,20±0,05) мл. Через 7 недель после первой иммунизации эксперимент был прекращен. Б. Шестинедельных мышей иммунизировали путем внутримышечной инъекции pVAX1 (n = 3), pVAX1 с экспрессией усеченной версии (TSHR 1160) (n = 5), по 25 мкг в объеме (0,20±0,05) мл в расчете на особь: 0, 1, 3 (недели). Контрольной группе мышей (n = 3) вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме (0,20±0,05) мл. Через 7 недель после первой иммунизации эксперимент был прекращен.

Схема для 2-го эксперимента: А. Шестинедельных мышей иммунизировали путем внутрибрюшинной инъекции pVAX1 (n = 3), pVAX1

с экспрессией усеченной версии (TSHR 1160) ($n = 5$), по 25,0 мкг в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл в расчете на особь. Контрольной группе мышей ($n = 3$) вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл. Сроки введения 0, 2, 5 (недели); через 8 недель после первой иммунизации эксперимент был прекращен.

Б. Шестинедельных мышей иммунизировали путем внутримышечной инъекции рVAX1 ($n = 3$), рVAX1 с экспрессией усеченной версии (TSHR 1160) ($n = 5$), по 25,0 мкг в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл в расчете на особь. Контрольной группе мышей ($n = 3$) вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл. Сроки введения 0, 2, 5 (недели); через 8 недель после первой иммунизации эксперимент был прекращен.

В. Шестинедельных мышей иммунизировали путем внутрибрюшинной инъекции рVAX1 ($n = 3$), рVAX1 с экспрессией усеченной версии (TSHR 1160) ($n = 3$), по 25 мкг в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл в расчете на особь. Сроки введения 0, 1, 3, 6 (недели), контрольной группе мышей ($n = 3$) вводили стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) в объеме ($0,20 \pm 0,05$) мл. Через 10 недель после первой иммунизации эксперимент был прекращен.

Определение антител против рТТГ в ИФА в сыворотке крови пациентов с ДТЗ и здоровых доноров

Иммуноферментный анализ проводили с использованием набора DRG EIA3369 по протоколу производителя. В лунках 96-луночного планшета (CorningCostar; Sigma-Aldrich, Борнем, Бельгия) был сорбирован рекомбинантный рТТГ в PBS (0,5 мг/мл) в течение ночи при комнатной температуре. Далее планшеты отмывали 3 раза ФСБТ перед внесением в лунки планшета по 100 мкл образцов сыворотки крови пациентов, содержащие различные концентрации АТ к рТТГ: 1 – 24 МЕ/мл; 2 – 17,01 МЕ/мл; 3 – 14,48, МЕ/мл; 4 – 12,76 МЕ/мл; 5, 6 – < 0,300 МЕ/мл, предварительно разведенные в 10 раз ФСБТ, инкубировали планшеты при 37 °С в течение 2 ч на шейкере (700 об/мин). Планшеты отмывали 3 раза ФСБТ, добавляли МкАт мыши против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой из корня хрена. После блокирования с 1% BSA в PBS сыворотки были тестированы путем инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре. Результаты иммуноферментной реакции учитывали в течение 15-30 мин после внесения субстратно-хромогенной смеси 3,3'-5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ), определяя оптическое поглощение раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм с помощью планшетного ридера Anthos 2020 (Австрия), так же как и во всех других, представленных здесь, вариантах ИФА. Значение оптического поглощения в лунках без добавления специфических антител, со-

ответствующее неспецифическому связыванию конъюгата с иммобилизованным антигеном (отрицательный контроль), вычитали из значения оптического поглощения в экспериментальной лунке. Титром считали разведение сыворотки, при котором значение оптического поглощения в экспериментальной лунке превышало фоновое на два стандартных отклонения.

Проведение непрямого варианта ИФА в образцах сыворотки крови иммунизированных животных

Иммуноферментный анализ проводили с использованием набора DRG EIA3369 по протоколу производителя. Образцы сывороток крови мышей разводили в 10 и 100 раз и вносили в лунки планшета. Выявление иммуноглобулинов мыши в тесте проводили с использованием поликлональных антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с ферментной меткой (пероксидазой из корня хрена). Образцы сыворотки крови мышей до иммунизации использовали в качестве отрицательного контроля.

Проведение ингибиторного варианта ИФА с помощью набора фирмы DRG по методике производителя

Образцы сывороток крови мышей разводили в 10, 100 и 1000 раз и вносили в лунки планшета. К образцам добавляли биотинилированный препарат ТТГ, который связывался со свободными рТТГ. Выявление иммуноглобулинов мыши в тесте проводили с использованием стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой из корня хрена.

Проведение непрямого варианта «сэндвич» ИФА

Выделенный препарат рТТГ в количестве 10 мкг сорбировали в лунках планшета. После сорбции антигена планшеты выдерживали в течение 16 часов при +4 °С, далее отмывали трижды раствором 0,01 М ФСБР с 0,05% твин 20. Затем в лунки планшета вносили образцы сыворотки крови, культуральной жидкости и моноклональных антител, разведенные в 10, 100, 1000, 10000 в объеме 100 мкл 0,01 М ФСБ. Инкубировали в течение 60 мин при +37 °С при режиме покачивания 700 об/мин. После этого промывали трижды 0,01 М ФСБР с 0,05% твин 20. Затем вносили конъюгированные с пероксидазой из корня хрена антивидовые антитела к IgG мыши (Sigma, США) в рабочем разведении 1/10000. Инкубировали 60 мин при +37 °С при покачивании 700 об/мин. Далее промывали трижды 0,01 М ФСБР с 0,05% твин 20. Вносили в лунки планшета субстратно-хромогенную смесь, содержащую 3,3'-5,5 ТМБ, инкубировали 30 мин при +25 °С в темноте. Реакцию останавливали внесением 0,2 М раствора H₂SO₄. Интенсивность сигнала определяли при длине волны 450 нм, референтная длина волны – 620 нм.

Гибридизация. Модель рVAX1 (TSHR1160)

Иммунизацию проводили трижды (три инъекции) путем внутримышечного или внутрибрю-

шинного введения иммуногена по 25 мкг через две и три недели после предыдущей инъекции. Через три недели после последней инъекции производили забор крови для определения содержания антител к рТТГ. После анализа сыворотки крови особям, демонстрирующим наибольшее значение титра антител через 8 недель, за три дня до процедуры гибридизации проводили бустерную инъекцию рVAX1-рТТГ в стерильном физиологическом растворе (0,9% NaCl) в количестве 25 мкг, в объеме 0,2 мл на особь. Сыворотку отделяли от клеток крови центрифугированием и хранили при температуре минус 20 °С до использования. Образцы сыворотки крови мышей до иммунизации использовали в качестве отрицательного контроля.

Для получения гибридом – продуцентов МкАТ к рТТГ в качестве антигена использовали препарат в форме ДНК-вакцины рVAX1-рТТГ; в качестве источника В-лимфоцитов – спленоциты мышей линии BALB/c, сыворотки которых максимально взаимодействовали с антигеном, примененным для иммунизации, по сравнению с другими особями экспериментальной группы, использовали в составе гибридизационной смеси. В составе гибридизационной смеси также использовали клетки миеломы мыши линии Р3Х63Аg8.653, растущие в суспензионной культуре (коллекция ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова).

В качестве фидерного слоя использовали перитонеальные макрофаги.

Культивирование гибридом *in vitro* и селекция клонов-продуцентов МкАТ против рТТГ

Гибридные клоны выращивали в среде ГАТ, содержащей 20% FCS. Рост клеток контролировали с помощью инвертированного микроскопа. Эффективность гибридизации рассчитывали как отношение числа лунок с растущими гибридными культурами к числу засеянных.

В лунках, где гибридные клоны имели достаточный размер для тестирования, отбирали супернатанты, в которых проверяли содержание специфических антител против искомого антигена методом ИФА в непрямом варианте. Анализу были подвергнуты супернатанты (надосадочное содержимое лунки) в разведении фосфатным буфером 1:20. В качестве отрицательного контроля служила соответствующая среда культивирования для гибридом в разведении фосфатным буфером 1:20. Критерий отбора гибридом – оптическая плотность (ОП) супернатанта среды культивирования более 0,500 при длине волны 450 нм, при отрицательном контроле ОП среды менее 0,100. Эффективность клонирования рассчитывали как отношение числа лунок с высоким уровнем синтеза МкАТ к числу лунок с растущими гибридными культурами.

Клетки из лунок, давших положительный сигнал в ИФА, наращивали в 24-луночных культуральных планшетах, 6-луночных культуральных планшетах, а затем во флаконах, объемом 75 мл, каждый из которых содержал фидерный слой из макрофагов.

По мере роста клеток супернатанты неоднократно тестировали ИФА с целью отбора стабильных клонов-продуцентов МкАТ против рТТГ, лучшие из которых были последовательно дважды клонированы методом лимитирующих разведений. Плотность суспензий контролировали под инвертированным микроскопом.

Иммуноблоттинг проводили методом «влажного» переноса белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану в буфере для иммуноблоттинга при постоянном токе 90 мА в течение 16-18 ч при температуре +4 °С [13].

Статистический анализ

Сравнение между группами проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Критерий использовали для измерения общих различий в анти-TSHR IgG уровнях с применением программного обеспечения MS Excel в графиках ($p = 0,05$).

Результаты и обсуждение

Иммуноблоттинг рекомбинантного рецептора тиреотропного гормона (TSHR387)

На рисунке 1 представлены результаты иммуноблоттинга супернатантов лизатов клеток СНО, трансфицированных рVAX1 без вставки, 4 мкг, и рVAX1-TSHR, 4 мкг.

Взаимодействие рекомбинантных белков рТТГ с аутоАТ к рТТГ в образцах сыворотки крови пациентов с ДТЗ и здоровых доноров представлено на диаграммах (рис. 2).

Иммунизация животных

Представляем результаты 2 независимых и воспроизводимых экспериментов. Динамика массы тела мышей в процессе 1-го эксперимента отражена на рисунке 3 (А – внутрибрюшинное введение иммуногена, Б – внутримышечное введение иммуногена). Результаты ИФА образцов сыворотки крови иммунизированных животных приведены на рисунках 4-6.

ИФА образцов сыворотки крови иммунизированных животных

Результаты ИФА, непрямой вариант, образцов сыворотки иммунизированных мышей (ед. ОП), полученных в 1-м эксперименте, отражены на рисунке 4.

Ингибиторный иммуноферментный анализ полученных в 1-м эксперименте образцов сыворотки иммунизированных мышей

На рисунках 5, 6 представлены результаты определения уровня продукции антител против рТТГ через ингибирование связывания рТТГ,

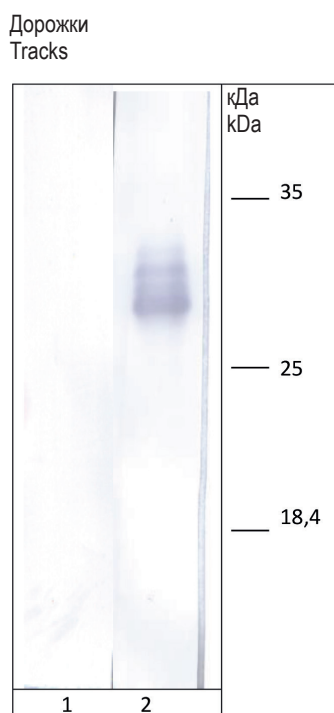


Рисунок 1. Нитроцеллюлозная мембрана, проявленная сывороткой крови с повышенным содержанием АТ к рТТГ (24,0 МЕ/мл)

Примечание. 1 – супернатант лизатов клеток CHO, трансфицированных pVAX1, 4 мкг; 2 – супернатант лизатов клеток CHO, трансфицированных pVAX1-TSHR, 4 мкг.

Figure 1. Nitrocellulose membrane, developed blood serum with an increased content of antibodies to TSHR (24.0 IU/mL)

Note. 1, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1, 4 µg; 2, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1-TSHR, 4 µg.

в процентах, в образцах сыворотки мышей, иммунизированных pVAX1-TSHR (1160) двумя способами.

В ходе 2-го эксперимента массу тела мышей контролировали в течение всего периода иммунизации, как показано на рисунке 7 (А-В).

Иммуноферментный анализ полученных во 2-м эксперименте образцов сыворотки иммунных животных

Результаты ИФА отражены на рисунке 8.

Гибридизация. Модель pVAX1 (TSHR 1160). Культивирование гибридом *in vitro* и селекция клонов-продуцентов МкАт против рТТГ

Гибридизационная смесь для шести 96-луночных планшетов, по три планшета на каждую схему иммунизации, была подготовлена для культивирования в соотношении, приблизительно, 1:8 (30 млн клеток миеломы) и 112 млн спленоцитов (введение препарата внутривентриальное) и 107 млн спленоцитов (введение препарата внутримышечное).

На 14-й день после слияния из 288 засеянных лунок в 274 наблюдался рост гибридом (внутрибрюшинное введение препарата); из 288 засеянных лунок в 268 наблюдался рост гибридом (внутримышечное способ введения препарата). Растущие гибридные клетки можно было наблюдать уже на третий день после слияния.

Первичный скрининг, проведенный на 14-й день культивирования, выявил культуры, синтезирующие антитела к рТТГ, из них 95 получены при внутрибрюшинном введении препарата, 56 – при введении препарата внутримышечно. Для дальнейшей селекции из 151 использовали 56 наиболее активных гибридом, сохранивших способность к росту и синтезу антител против рТТГ (ОП > 0,800, из них n = 34, в/б; n = 22, в/м), которые были перенесены в 24-луночные культуральные планшеты (2-й пассаж). После третьего тестирования все первичные культуры гибридом были заморожены при температуре -80 °С; (ОП > 1,000, из них (n = 18, в/б), (n = 14, в/м). Супернатанты среды культивирования гибридом отправлены для хранения при температуре (0 – +4) °С. Лучшие тринадцать гибридом (ОП > 1,500, из них n = 8, в/б, n = 5, в/м), перенесены во флаконы, объемом 75 мл (3-й пассаж). Лучшие шесть из тринадцати (5 – в/б, 1 – в/м) были отобраны для клонирования методом лимитирующих разведений. Полученные в результате клонирования культуры гибридом были заморожены при температуре -80 °С.

Методами иммуноблоттинга и ИФА подтверждено наличие фрагмента гена рецептора тиреотропного гормона, размером 1160 п.н., который был трансфицирован в составе вектора pVAX1 в клетки CHO. Полосы преципитации с антителами из сыворотки крови с повышенным содержанием АТ к рТТГ (24,0 МЕ/мл) наблюдались на нитроцеллюлозной мембране только с продуктами экспрессии вектора pVAX1-TSHR1160 в CHO (рис. 1). Полосы преципитации соответствовали белкам с молекулярной массой 40, 30, 20 кДа. Наличие нескольких продуктов экспрессии рТТГ, вероятно, вызвано деградацией исходного рекомбинантного белка или экспрессией рекомбинантных белков различной длины.

Пропорциональное увеличение содержания продуктов вектора pVAX1-TSHR (рекомбинантных белков рТТГ) приблизительно в 2 раза при увеличении количества трансфицируемого вектора с 2 мкг/мл до 4 мкг/мл продемонстрировано на рисунке 2, что свидетельствует о специфичности экспрессии полученных продуктов – рекомбинантных белков рТТГ. При этом не выявлено реакции в ИФА экспрессированного фрагмента рТТГ с образцами сыворотки крови здоровых доноров. Результаты, полученные методами ИФА и иммуноблоттинга, дали основание использовать

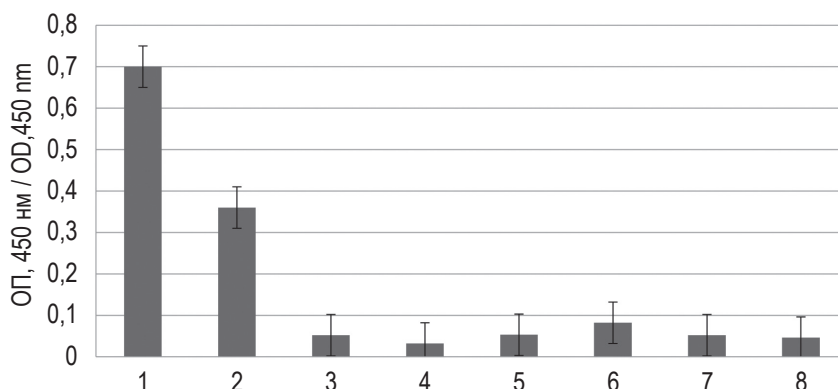


Рисунок 2. Результаты ИФА взаимодействия экспрессированного фрагмента pTTH с образцами сыворотки крови пациентов с ДТЗ (А) и здоровых доноров (Б)

Примечание. А: 1 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1-TSHR (1160), 4 мкг; 2 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1-TSHR (1160), 2 мкг; 3 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1; 4 – супернатанты лизатов клеток CHO. Б: 5 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1-TSHR (1160), 4 мкг; 6 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1-TSHR (1160), 2 мкг; 7 – супернатанты лизатов клеток CHO pVAX1; 8 – супернатанты лизатов клеток CHO.

Figure 2. ELISA results of interaction of the expressed TSHR fragment with blood serum samples of patients with GB (A) and from healthy donors (B)

Note. A: 1, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1-TSHR (1160), 4 µg; 2, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1-TSHR (1160), 2 µg; 3, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1, 4 µg; 4, supernatant of lysates of CHO cells. B: 5, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1-TSHR (1160), 4 µg; 6, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1-TSHR (1160), 2 µg; 7, supernatant of lysates of CHO cells transfected with pVAX1, 4 µg; 8, supernatant of lysates of CHO cells.

pVAX1-TSHR в качестве ДНК-вектора для иммунизации.

В наших опытах схемы иммунизации были выбраны эмпирически и с учетом литературных данных. Для оценки иммуногенности ДНК-вакцин используют в зависимости от цели исследования различные схемы иммунизации: дозировки (от 5 мкг до 500 мкг, чаще 50 мкг на мышшь); способы введения (подкожный, внутримышечный посредством метода электропорации, внутрибрюшинный, чаще внутримышечный); кратность введения (от однократного с учетом через 4 недели, двукратного или четырехкратно-

го с двух- и трехнедельным интервалом и учетом через 3 недели после последней инъекции, чаще трехкратного с двухнедельными интервалами и учетом через 2 недели после последней инъекции) [3, 4, 5, 9, 11, 12, 15, 16, 17]. Для 1-го эксперимента была выбрана доза 25 мкг/мышшь, кратность – 3 инъекции – с интервалом 0, 1, 3, 6 недель, два способа введения: внутримышечный и внутрибрюшинный. Второй эксперимент отличался от 1-го эксперимента кратностью и продолжительностью иммунизации, а также изменением интервала между инъекциями, но с сохранением дозы для одной инъекции и 2 спо-

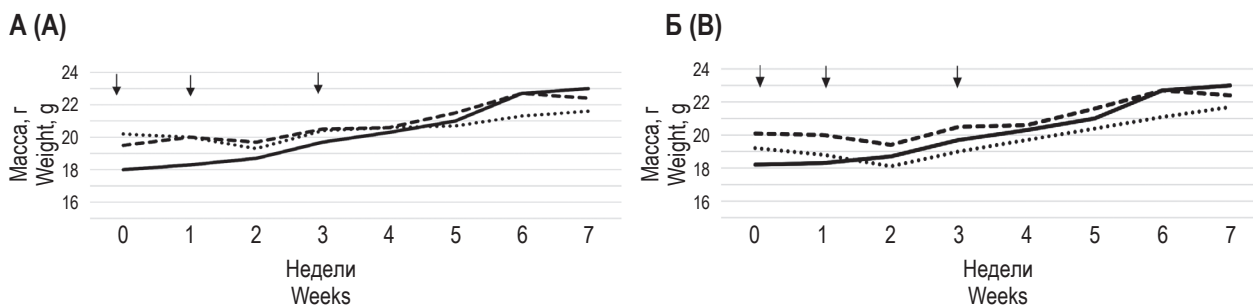


Рисунок 3. Динамика массы тела мышей в процессе 1-го эксперимента

Примечание. – pVAX1-TSHR (1160) опытная группа. ----- – pVAX1 контрольная группа. ——— – 0,9% NaCl контрольная группа. А – внутрибрюшинное введение. Б – внутримышечное введение. Время введения препаратов указано стрелками.

Figure 3. Dynamics of body weight of mice during the 1st experiment

Note., pVAX1-TSHR 1160 experimental group. -----, pVAX1 control group. ———, 0,9% NaCl control group. A, intraperitoneal injection. B, intramuscular injection. Arrows indicate the moment of drug administration.

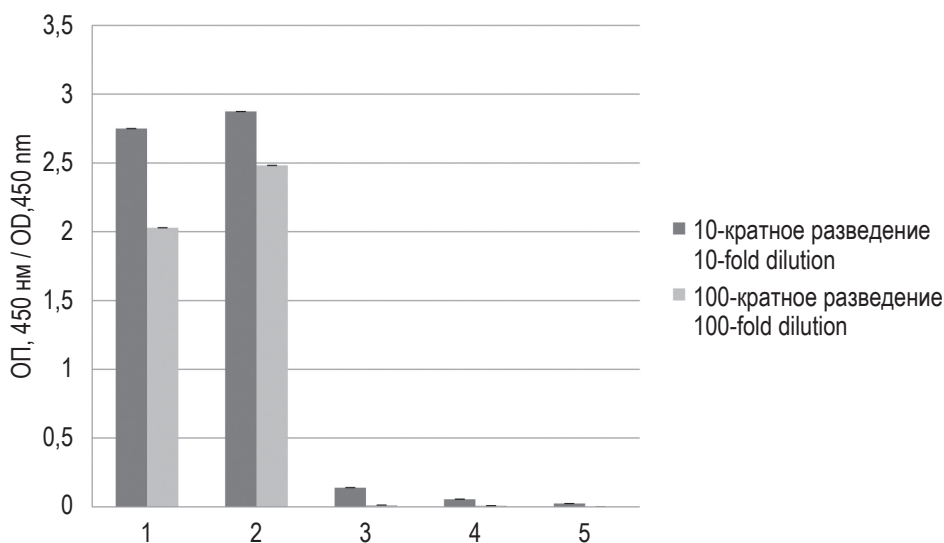


Рисунок 4. Результаты определения уровня продукции антител против рТТГ в сыворотке крови мышей, ИФА, непрямой вариант (1-й эксперимент)

Примечание. 1 – pVAX1-TSHR (1160), внутрибрюшинное введение. 2 – pVAX1-TSHR (1160), внутримышечное введение. 3 – pVAX1, внутримышечное введение. 4 – 0,9% NaCl, внутримышечное введение. 5 – отрицательный контроль.

Figure 4. Results of determining the level of production of antibodies against TSHR, ELISA, indirect variant (1st experiment)

Note. 1, pVAX1-TSHR (1160), intraperitoneal administration. 2, pVAX1-TSHR (1160), intramuscular injection. 3, pVAX1, intramuscular injection. 4, 0,9% NaCl, intramuscular injection. 5, negative control.

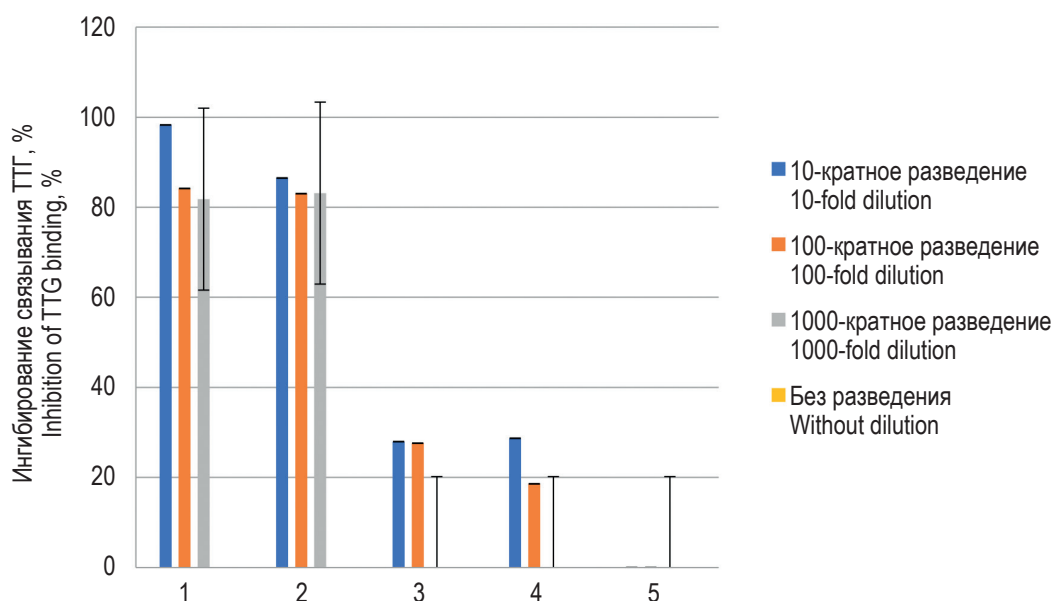


Рисунок 5. Результаты определения уровня продукции антител против рТТГ, через ингибирование связывания рТТГ, ИФА, ингибиторный вариант (1-й эксперимент)

Примечание. 1 – pVAX1-TSHR (1160) внутрибрюшинное введение. 2 – pVAX1-TSHR (1160) внутримышечное введение. 3 – pVAX1 – внутримышечное введение. 4 – 0,9% NaCl внутримышечное введение. 5 – отрицательный контроль.

Figure 5. Results of determining the level of production of antibodies to TSHR, by Inhibition of TSHR binding, ELISA inhibitory variant (1st experiment)

Note. 1, pVAX1-TSHR (1160) intraperitoneal administration. 2, pVAX1-TSHR (1160) intramuscular injection. 3, pVAX1 intramuscular injection. 4, 0,9% NaCl intramuscular injection. 5, negative control.

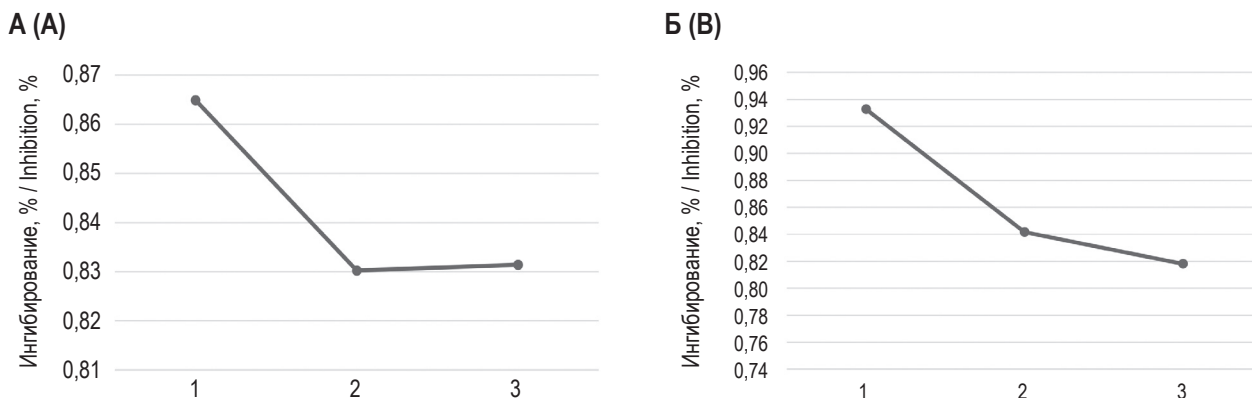


Рисунок 6. Ингибирование связывания рТТГ (дополнение к рисунку 5)

Примечание. А – внутрибрюшинное введение. Б – внутримышечное введение. 1 – 10-кратное разведение. 2 – 100-кратное разведение. 3 – 1000-кратное разведение.

Figure 6. Inhibition of TSHR binding (addition to Figure 5)

Note. A, intraperitoneal administration. B, intramuscular injection. 1, 10-fold dilution. 2, 100-fold dilution. 3, 1000-fold dilution.

способов введения внутримышечного и внутрибрюшинного. В течение всего периода наблюдений мышей взвешивали, отмечая изменения массы тела, представленные на рисунках 3, 7. Можно отметить, что в процессе обоих экспериментов масса тела животных из опытных групп, так же из контрольных групп, увеличивалась, с незначительными флуктуациями, независимо от способа введения иммуногена, что свидетельствует об отсутствии токсичности препаратов.

При определении активности антител к рТТГ в сыворотке иммунизированных мышей отмечали, что в лунках, содержащих разведенные в 10 и в 100 раз сыворотки крови мышей, иммунизированных путем внутримышечной или внутрибрюшинной инъекции вектором рVAX1-TSHR, в ИФА (непрямой вариант), был получен положительный сигнал (ОП более 2,0 О. Е.). Относительно низкое значение сигнала наблюдалось в лунках отрицательного контроля, и содержащих разведенные в 10 и 100 раз сыворотки крови преиммунных мышей и мышей, иммунизированных внутримышечно рVAX1 без вставки, и физиологическим раствором. Значение ОП сигнала в лунках отрицательного контроля не превышало 0,024 О. Е. (рис. 4).

Высокий уровень продукции АТ к рТТГ был выявлен при анализе разведенных в 1000 раз сывороток крови мышей из опытных групп, иммунизированных путем внутримышечного или внутрибрюшинного введения вектора рVAX1-рТТГ, (ингибиторный вариант ИФА, рис. 5) пропорционально разведению сывороток, как продемонстрировано на рисунке 6: для внутримышечного (А) и внутрибрюшинного (Б) введения препарата. При анализе сывороток крови мышей контрольных групп, которым вводили, соответствен-

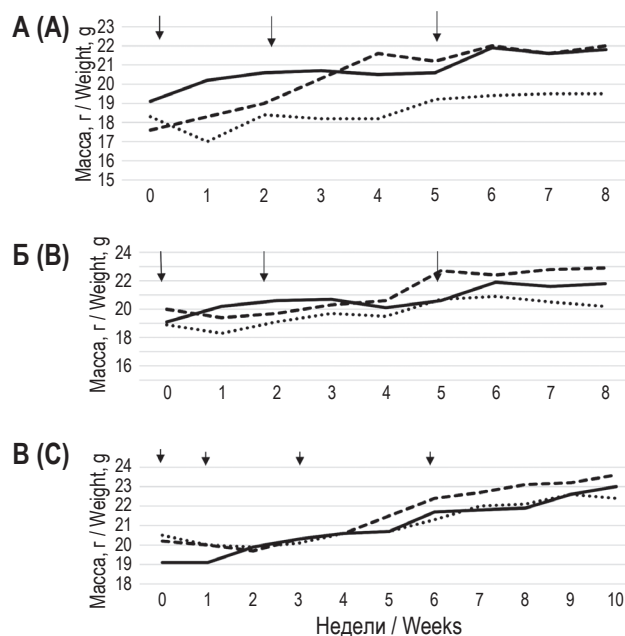


Рисунок 7. Динамика массы тела мышей в процессе 2-го эксперимента

Примечание. – опытная группа рVAX1-TSHR (1160). ---- – контрольная группа рVAX1. ——— – контрольная группа 0,9% NaCl. А – внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 8 недель. Б – внутримышечное введение, продолжительность эксперимента 8 недель. В – внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 10 недель. Стрелки указывают время введения препарата.

Figure 7. Dynamics of body weight of mice during the 2nd experiment

Note., experimental group pVAX1-TSHR (1160). ----, control group pVAX1. ———, control group 0.9% NaCl. A, intraperitoneal administration, experiment duration 8 weeks. B, intramuscular injection, experiment duration 8 weeks. C, intraperitoneal administration, experiment duration 10 weeks. Arrows indicate the moment of drug administration.

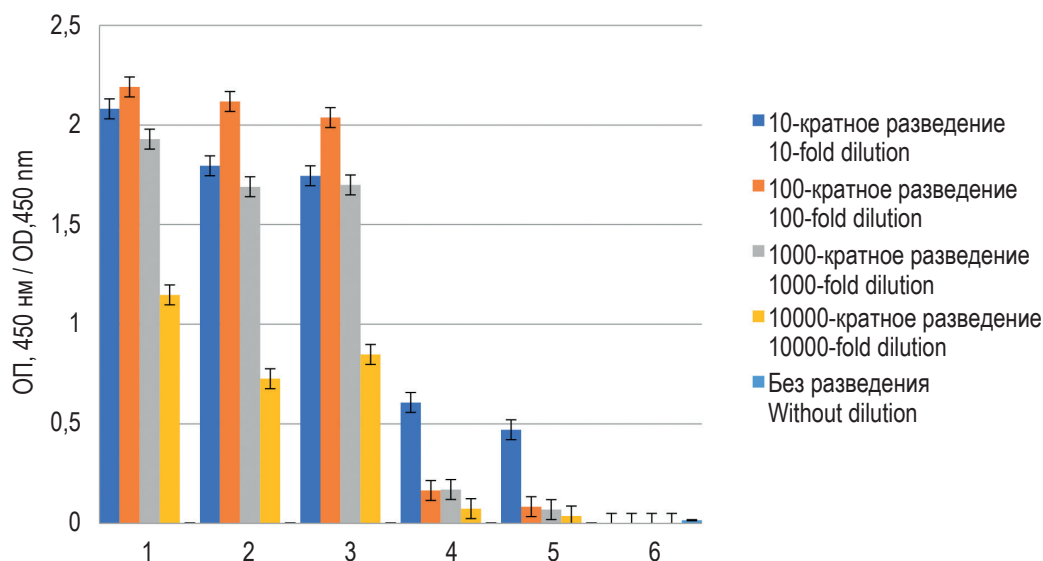


Рисунок 8. Результаты определения уровня продукции антител против рТТГ в ИФА, с использованием непрямого варианта «сэндвич» в сыворотках крови мышей

Примечание. 1 – pVAX1-TSHR (1160) внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 8 недель. 2 – pVAX1-TSHR (1160) внутримышечное введение, продолжительность эксперимента 8 недель. 3 – pVAX1-TSHR (1160) внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 10 недель. 4 – pVAX1 внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 10 недель. 5 – 0,9% NaCl внутрибрюшинное введение, продолжительность эксперимента 10 недель. 6 – отрицательный контроль.

Figure 8. Results of determining the level of production of antibodies against TSHR in ELISA, using the indirect “sandwich” option in the blood sera of mice

Note. 1, pVAX1-TSHR (1160) intraperitoneal administration, experiment duration 8 weeks. 2, pVAX1-TSHR (1160) intramuscular injection, experiment duration 8 weeks. 3, pVAX1-TSHR (1160) intraperitoneal administration, experiment duration 10 weeks. 4, pVAX1 intraperitoneal administration, experiment duration 10 weeks. 5, 0,9% NaCl intraperitoneal administration, experiment duration 10 weeks. 6, negative control.

но, вектор pVAX1 без вставки и физиологический раствор, сигнал ингибирования был невысоким.

Таким образом, вектор pVAX1-TSHR1160, содержащий фрагмент гена рецептора тиреотропного гормона человека, вызывает формирование иммунного ответа у мышей линии BALB/c, посредством внутримышечного или внутрибрюшинного введения в дозе 25 мкг в объеме (0,20±0,05) мл в расчете на особь, что было подтверждено двумя вариантами ИФА – непрямым и ингибиторным.

Во втором опыте в сыворотках крови мышей из опытных групп, иммунизированных вектором pVAX1-рТТГ, как продемонстрировано на рисунке 8 (непрямой «сэндвич»-вариант, ИФА), был выявлен высокий уровень АТ к рТТГ, с титром, значительно превышающим 1:10 000, по сравнению с отрицательным контролем. В лунках отрицательного контроля, а также содержащих разведенные в 100 раз сыворотки крови мышей, которым вводили внутримышечно pVAX1 без вставки или физиологический раствор, наблюдалось отсутствие сигнала (рис. 8).

Иммунизация мышей ДНК-вектором pVAX1-TSHR (1160) с применением схемы трехкратного введения препарата путем внутрибрюшинной

или внутримышечной инъекции, в дозе 25 мкг, с двухнедельными интервалами и учетом через 2-3 недели после последней инъекции, оказалась пригодна для успешной гибридизации. Эффективность гибридизации составила 95,0% в опыте с внутрибрюшинным введением препарата, 93,0% – при внутримышечном введении препарата. Значительная часть культур гибридом оказались нестабильными продуцентами МкАт к рТТГ. Эффективность клонирования культур составляла 19,8% (53 из 268) при внутримышечном введении иммуногена; 30,4% (95 из 274) – при внутрибрюшинном введении иммуногена. В результате дальнейшей селекции была создана коллекция культур гибридом – продуцентов МкАт к рТТГ и депо МкАт против рТТГ.

Заключение

Разработана модель иммунного ответа на введение pVAX1-рТТГ мышам как с помощью внутрибрюшинных, так и внутримышечных инъекций, о чем свидетельствует способность мышей продуцировать антитела к рТТГ, уровень продукции которых с титром более 1:10 000 остается высоким на 8-й неделе эксперимента.

Иммунный ответ на введение экспрессирующегося в векторе рVAX1 фрагмента кДНК гена рецептора тиреотропина человека рТТГ 1160 на мышинной модели подтвержден методом ИФА в трех вариантах – непрямым, ингибиторным и в непрямом «сэндвич»-варианте.

Подобрана схема иммунизации трансгенных мышей линии BALB/c посредством рекомбинантного вектора рVAX1-рТТГ 1160, эффективная для формирования у опытных животных спленоцитов, секретирующих антитела к рТТГ, которые были использованы для успешной гибридизации. Эффективность гибридизации составила 95,0% (274 из 288) в опыте с внутрибрюшинным введе-

нием препарата, 93,0% (268 из 288) – при внутримышечном введении препарата.

В результате селекции индивидуальных клонов по критериям пролиферативной активности и стабильности продукции антител удалось получить стабильные культуры гибридом, секретирующие МкАт против рТТГ.

Синтез рекомбинантных белков рТТГ в результате ДНК-иммунизации открывает перспективы получения моноклональных антител к рецептору и исследования изменений структуры рТТГ в патогенезе аутоиммунных заболеваний и создания тестов для совершенствования диагностики и лечения АИЗ ЩЖ.

Список литературы / References

1. Зубков А.В., Андреева М.А., Сидоров А.В., Милованова А.В., Бутова Л.Г. Клонирование гена рецептора тиреотропного гормона человека // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 278-280. [Zubkov A.V., Andreeva M.A., Sidorov A.V., Milovanova A.V., Butova L.G. Cloning of the human thyroid-stimulating hormone receptor gene. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 2, pp. 278-280. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210006600-5.
2. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Под ред. Н.Н. Каркищенко и С.В.Грачева. М.: ПРОФИЛЬ-2С, 2010. 358 с. [A guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technology. Ed. by Karkishchenko N.N. and Gracheva S.V.]. Moscow: PROFIL-2S, 2010. 358 p.
3. Chen C.R., Pichurin P., Nagayama J. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves' disease is the culprit as well as the victim *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 111, no. 12, pp. 1897-1904.
4. Feng K., Zheng X., Wang R. Long-Term Protection Elicited by a DNA Vaccine Candidate Expressing the prM-E Antigen of Dengue Virus Serotype 3 in Mice. *Front. Microbiol.*, 2020, Vol. 10, 87. doi: 10.3389/fcimb.2020.00087.
5. Gilbert J.A., Kalled S.L., Moorhead J. Treatment of autoimmune hyperthyroidism in murine model Graves' disease with tumor necrosis factor family ligand inhibitor suggest a key role for B cell activating factor in disease pathology. *Endocrinology*, 2006, Vol. 147, no. 10, pp. 4561-4568.
6. Jansson L., Vrolix K., Jahraus A. Immunotherapy with epitopes blocks the immune response to TSH receptor in HLA-DR transgenic mice. *Endocrinology*, 2018, Vol. 159, no. 9, pp. 3446-3457.
7. Lerner A., Jeremias P., Matthias T. The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing. *Int. J. Celiac Dis.*, 2015, Vol. 3, no. 4, pp. 151-155.
8. Moshkelgosha S., So P.W., Deasy N. Cutting edge: Retrobulbar inflammation, adipogenesis, and acute orbital congestion in a preclinical female mouse model of graves' orbitopathy induced by thyrotropin receptor plasmid-in vivo electroporation. *Endocrinology*, 2013, Vol. 154, pp. 3008-3015.
9. Rapoport B., McLachlan S.M. TSH receptor cleavage into subunits and shedding of the A-subunit; a molecular and clinical perspective. *Endocr. Rev.*, 2016, Vol. 37, no. 2, pp. 114-134.
10. Peng J., Xiao Y., Wan X. Enhancement of Immune response and anti-infection of mice by porcine antimicrobial peptides and interleukin-4/6 fusion gene encapsulated in chitosan nanoparticles. *Vaccine*, 2020, Vol. 8, 552. doi: 10.3390/vaccines8030552.
11. Schluter A., Horstmann M., Diaz-Cano S. Genetic immunization with mouse thyrotropin hormone receptor plasmid breaks self tolerance for a murine model of autoimmune thyroid disease and Graves' orbitopathy. *Clin. Exp. Immunol.*, 2017, Vol. 191, pp. 255-267.
12. Sonaimuthu P., Ching X.T., Fong M.Y. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in BALB/c mice vaccinated with toxoplasma gondii rhoptry. *Front. Microbiol.* 2016, Vol. 7, 808. doi: 10.3389/fmicb.2016.00808.
13. Towbin H., Stachelin T., Gardon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel stonitrocellulose sheets. Procedures and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1979, Vol. 76, pp. 4350-4354.
14. Weetman A.P, Jateman M.E, Ealey P.A. Thyroid stimulating antibody activity between different immunoglobulin G subclasses. *J. Clin. Invest.*, 1990, Vol. 86, no. 3, pp. 723-727.
15. Zheng B., Ding J., Chen X. Immuno efficacy of a t. Gondii secreted protein with an altered thrombospondin repeat (TgSPATR) as a novel DNA vaccine candidate against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. *Front. Microbiol.*, 2017, Vol. 8, 216. doi: 10.3389/fmicb.2017.00216.

16. Zheng X., Chen H., Wang R. Effective Protection induced by a monovalent DNA vaccine against Dengue Virus (DV) serotype 1 and a bivalent DNA vaccine against DV1 and DV2 in Mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, Vol. 7, 175. doi: 10.3389/fcimb.2017.00175.

17. Zheng X., Yu X., Wang Y. Complete protection for mice conferred by a DNA vaccine based on the Japanese encephalitis virus P3 strain used to prepare the inactivated vaccine in China. *Virology*, 2020, Vol. 17, 126. doi.org/10.1186/s12985-020-01400-3.

Авторы:

Зубков А.В. — к.м.н., заведующий лабораторией иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Бутова Л.Г. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Кузьмина Н.С. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Яковлева И.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Гаврилова Н.Ф. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных гибридов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Корноухова А.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологической диагностики эндокринных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Сидоров А.В. — к.б.н., заведующий лабораторией ДНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Хрейм Уазель Б.В. — аспирант ИБХТН ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Кузьменко В.В. — аспирант ИБХТН ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Зубкова И.В. — врач клинической лабораторной диагностики, межклиническая клинико-диагностическая лаборатория ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Фадеев В.В. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой эндокринологии ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Authors:

Zubkov A.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Butova L.G., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Kuzmina N.S., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Yakovleva I.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Hybrids, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Gavrilova N.F., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Hybrids, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Kornoukhova A.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunological Diagnostics of Endocrine Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Sidorov A.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of DNA Viruses, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera, Moscow, Russian Federation

Khraim Wael B.V., Postgraduate Student, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Kuzmenko V.V., Postgraduate Student, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Zubkova I.V., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Interclinical Clinical Diagnostic Laboratory, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Fadeev V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Endocrinology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 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

ОЦЕНКА ФАРМАКОКИНЕТИКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ ФОРМЫ $IFN\alpha$ И $IFN\gamma$ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ

Кравченко Э.В.¹, Безрукова Е.В.¹, Воробейчиков Е.В.¹,
Скворцов Н.В.²

¹ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

² ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Полипозный риносинусит является хроническим воспалительным заболеванием слизистой оболочки носа и околоносовых пазух. По отрицательному влиянию на качество жизни сравним с сахарным диабетом и гипертонической болезнью. На данный момент не существует методов, позволяющих добиться стойкой ремиссии данной патологии. В связи с этим актуальным является разработка компонентов терапии, направленной на снижение хронической воспалительной реакции. Рекомбинантный интерферон обладает антипролиферативной активностью и корригирует дефицит эндогенных регуляторных молекул, что позволяет рассматривать этот класс иммунотропных препаратов в качестве перспективного компонента консервативной иммунотерапии для полипозного риносинусита.

В качестве предлагаемого препарата была выбрана композиция, включающая: $IFN\alpha 2b$ – 1 млн МЕ, $IFN\gamma$ – 500 тыс. МЕ, хитозан, янтарная кислота и диметилсульфоксид (ДМСО). Подобная форма в виде раствора для интраназального применения позволяет обеспечить высокий комплаенс пациентов в связи с неинвазивностью терапии. Выбор подобного состава обусловлен следующим. Хитозан является биологическим полимером, способствующим повышению биодоступности белковых соединений для слизистых оболочек организм, что имеет значение для формирования локального терапевтического эффекта и снижение системных побочных реакций. Янтарная кислота – вещество с выраженным антиоксидантным эффектом, обеспечивающая естественную коррекцию клеточного метаболизма, что также важно для усиления противовоспалительного действия. ДМСО – химическое вещество, которое применяется как локальное противовоспалительное средство для доставки действующих активных веществ в ткани.

Адрес для переписки:

Кравченко Эдуард Витальевич
ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный
медицинский университет имени И.И. Мечникова»
Россия, г. Калининград, ул. Герцена, 7а, кв. 2.
Тел.: 8 (911) 864-12-00.
E-mail: edi-k007@mail.ru

Address for correspondence:

Eduard V. Kravchenko
I. Mechnikov North-Western State Medical University.
7a Herzen St, Apt 2
Kaliningrad
Russian Federation
Phone: +7 (911) 864-12-00.
E-mail: edi-k007@mail.ru

Образец цитирования:

Э.В. Кравченко, Е.В. Безрукова, Е.В. Воробейчиков,
Н.В. Скворцов «Оценка фармакокинетики
экспериментальной комбинированной формы $IFN\alpha$ и
 $IFN\gamma$ при интраназальном применении» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 953-960.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-16823

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

For citation:

E.V. Kravchenko, E.V. Bezrukova, E.V. Vorobeychikov,
N.V. Skvortsov "Evaluation of the pharmacokinetics of
an experimental combined form of $IFN\alpha$ and $IFN\gamma$ for
intranasal use", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 953-960.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-16823

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-16823

Для лабораторной оценки эффективности вспомогательных компонентов предлагаемой композиции в создании локального эффекта были выбраны крысы породы Wistar в количестве 30 животных, которым однократно интраназально вводилась предлагаемая форма препарата (IFN1). Контрольная группа включала 30 животных, которым поочередно интраназально вводились аналогичная дозировка IFN α 2b и IFN γ , растворенных в воде для инъекций (IFN2). Взятие образцов крови у животных проводили до введения препаратов и после их введения через 15, 30, 60, 120, 180, 240 и 300 мин. Количественное определение концентраций интерферонов в образцах крови проводили иммуноферментным способом при использовании тест-систем ELISA-IFN- α (Россия) на планшетном спектрофотометре Multiscan FC Thermo Scientific (Германия). Для оценки зависимости изменений концентрации в крови животных от времени, прошедшего после их введения, использовали стандартные фармакокинетические модели, обеспечивающие максимальную корреляцию между экспериментальными значениями концентраций интерферона и их расчетными значениями. Далее определяли интеграл от начального момента времени до бесконечности, что соответствовало площади под фармакокинетической кривой и позволяло провести расчет ряда фармакокинетических характеристик.

Получены следующие показатели: 1) Площадь под фармакокинетической кривой (AUCt) нг/мл/мин – IFN1 = 683,0; IFN2 = 1707,7. 2) Константа всасывания (Kr) – IFN1 = 0,13096; IFN2 = 0,03836. 3) Константа всасывания (Kel) – IFN1 = 0,00177; IFN2 = 0,00317. 4) Клиренс (Cl) мл/мин – IFN1 = 129,35; IFN2 = 51,73.

На основании различий значений фармакокинетических параметров (AUC_t) для препаратов IFN1 и IFN2 можно сделать заключение, что применение композиции на основе хитозана, янтарной кислоты и ДМСО приводит к выраженной задержке интерферона в слизистой оболочке носа, что обеспечивает выраженный локальный терапевтический эффект и позволяет добиться меньших системных побочных реакций. Данная композиция целесообразна для дальнейших клинических исследований эффективности иммунотерапии полипозного риносинусита.

Ключевые слова: полипозный риносинусит, иммуностропная терапия, консервативное лечение, IFN α 2b, IFN γ

EVALUATION OF THE PHARMACOKINETICS OF AN EXPERIMENTAL COMBINED FORM OF IFN α AND IFN γ FOR INTRANASAL USE

Kravchenko E.V.^a, Bezrukova E.V.^a, Vorobeychikov E.V.^a, Skvortsov N.V.^b

^a I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Polypous rhinosinusitis is a chronic inflammatory disease of the nasal mucosa and paranasal sinuses. Recombinant interferon has antiproliferative activity and corrects the deficiency of endogenous regulatory molecules, which allows us to consider this class of immunotropic drugs as a promising component of conservative immunotherapy for polyposis rhinosinusitis. Purpose of the study: To select the optimal composition of the experimental composition of interferons and evaluate their pharmacokinetic parameters in laboratory animals.

For laboratory evaluation of the effectiveness of the auxiliary components of the proposed composition in creating a local effect, Wistar rats in the amount of 30 animals were selected, to which the proposed form of the drug (IFN1) was administered once intranasally. The control group included 30 animals that were alternately administered intranasally with a similar dose of IFN α 2b and IFN γ dissolved in water for injection (IFN2). Quantitative determination of interferon concentration in blood samples was carried out using the enzyme immunoassay method. To assess the dependence of changes in concentrations in the blood of animals on the time elapsed after their administration, standard pharmacokinetic models were used. Next, the integral from the initial moment of time to infinity was determined, which corresponded to the area under the pharmacokinetic curve and made it possible to calculate a number of pharmacokinetic characteristics.

The following indicators were obtained: 1) Area under the pharmacokinetic curve (AUCt) ng/ml/min – IFN1 = 683.0; IFN2 = 1707.7. 2) Absorption constant (Kp) – IFN1 = 0.13096; IFN2 = 0.03836. 3) Suction constant (Kel) – IFN1 = 0.00177; IFN2 = 0.00317. 4) Clearance (Cl) ml/min – IFN1 = 129.35; IFN2 = 51.73.

Based on the differences in the values of pharmacokinetic parameters (AUCt) for the IFN1 and IFN2 preparations, it can be concluded that the use of a composition based on chitosan, succinic acid and DMSO leads to a pronounced retention of interferon in the nasal mucosa, which provides a pronounced local therapeutic effect and allows for fewer systemic adverse reactions. This composition is suitable for further clinical studies of the effectiveness of immunotherapy for polyposis rhinosinusitis.

Keywords: polypous rhinosinusitis, immunotropic therapy, conservative treatment, IFN α 2b, IFN γ

Сокращения

ПРС – полипозный риносинусит, ГКС – глюкокортикостероиды, ДМСО – диметилсульфоксид, IFN – интерферон.

Введение

Полипозный риносинусит (ПРС) – хроническое воспалительное заболевание слизистой оболочки носа и околоносовых пазух, сопровождающееся ремоделированием тканей и формированием полипозных разрастаний. Основными жалобами при этой патологии являются: постоянная заложенность носа, ринорея и снижение обоняния, оказывающие значительное влияние на качество жизни пациентов.

Современный подход к терапии ПРС заключается в консервативной тактике в связи с низкой эффективностью оперативных методов лечения. Для консервативного лечения ПРС с высоким уровнем доказанной эффективности (уровень доказательств Ia) применяют аэрозольные и системные глюкокортикостероиды [2, 3, 6, 7]. Высокий локальный терапевтический эффект гормональной терапии ПРС связывают с уменьшением системной активности гормонального препарата, т. е. с минимальным его поступлением в системный кровоток. При этом основное количество гормонального препарата остается в слизистой оболочке носа и связываются с глюкокортикостероидными (ГКС) рецепторами, что обеспечивает развитие продолжительного фармакодинамического эффекта. Однако данная терапия не позволяет добиться стойкой ремиссии заболевания. В связи с этим актуальным является разработка компонентов терапии, направленной на снижение хронической воспалительной реакции.

Проведенные исследования терапии ПРС на основе применения рекомбинантного IFN α 2b путем его инъекционного введения в полипозную ткань показали положительную эффективность иммунотерапии, которая сохранялась в течение года [1]. Рекомбинантный интерферон обладает антипролиферативной активностью и корректирует дефицит эндогенных регуляторных молекул [4, 8], что позволяет рассматривать этот

класс иммунотропных препаратов в качестве перспективного компонента консервативной иммунотерапии для ПРС. Однако инъекционное введение рекомбинантного интерферона в ткань полипа снижает комплаентность его применения и может вызвать развитие нежелательных реакций организма в виде кратковременного повышения температуры (гриппоподобный синдром), связанное, как правило, с поступлением препарата в системный кровоток. Для повышения комплаентности использования этого препарата и снижения риска возникновения нежелательных реакций актуальна разработка композиции интерферона, которая при локальном введении обеспечивает задержку максимального количества белка в слизистой оболочке полипозной ткани и его минимальное поступление в системный кровоток. Для получения такой формы рекомбинантного интерферона предлагается использовать композицию для интраназального введения, содержащую рекомбинантные IFN α 2b и IFN γ , хитозан, янтарную кислоту и диметилсульфоксид (ДМСО). Хитозан является биологическим полимером, способствующим повышению биодоступности белковых соединений для слизистых оболочек организма [5], что имеет значение для формирования локального терапевтического эффекта. Янтарная кислота – вещество с выраженным антиоксидантным эффектом, обеспечивающая естественную коррекцию клеточного метаболизма, что также важно для усиления противовоспалительного действия предлагаемой композиции. ДМСО – известное химическое вещество, которое применяется как локальное противовоспалительное средство и для доставки действующих активных веществ в ткани.

Цель исследования – подобрать оптимальный состав экспериментальной композиции интерферонов и оценить их фармакокинетические параметры на лабораторных животных.

Материалы и методы

Для выбора оптимального состава предлагаемой композиции была подготовлена серия образцов, содержащих различные соотношения ее компонентов (хитозана, янтарной кислоты,

ДМСО). Далее сухой рекомбинантный IFN α 2b предварительно растворяли в этих образцах композиций и интраназально вводили крысам породы Wistar весом 320,0 г. Через 30 мин и 60 мин после введения композиций определяли концентрацию IFN α 2b в крови животных. Для взятия образцов крови крыс подключали к системе автоматического взятия образцов крови (DiLab Accusampler, Швеция), что позволяло определять прижизненные концентрации рекомбинантного белка в крови крыс в указанные периоды времени. Взятие образцов крови проводили из предварительно катетеризированной правой яремной вены животных. Количественное определение концентраций интерферона в крови крыс проводили иммуноферментным способом, используя тест-систему ELISA-IFN- α (Россия) на планшетном спектрофотометре Multiscan FC Termo Scientific (Германия). Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Далее, аналогично IFN α 2b, происходил подбор оптимального состава композиции, включающий IFN γ . Определение концентраций интерферона в крови животных проводили аналогичным иммуноферментным способом. Ре-

зультаты эксперимента представлены в таблице 2.

Дальнейшая оценка основных фармакокинетических параметров интерферона на фоне заявляемой композиции может проводиться при использовании IFN α 2b и/или IFN γ , т. к. динамика изменений концентраций этих препаратов в крови крыс через 30 мин и 60 мин после их введения имеет сходную направленность.

Для оценки фармакокинетических параметров IFN α 2b была создана композиция, содержащая: фармакопейный лиофильный препарат рекомбинантного IFN α 2b; хитозан с молекулярной массой 73 кДа \pm 20,0% со степенью деацетилирования 75,0-90,0%; янтарную кислоту и диметилсульфоксида (ДМСО). Для получения этой композиции использовали хитозан, который предварительно растворяли в 0,1 Н растворе янтарной кислоты с добавлением ДМСО до 1,0%. Эту композицию использовали для растворения рекомбинантного IFN α 2b, которую интраназально вводили животным группы 1. В качестве вещества сравнения использовали фармакопейный лиофильный препарат рекомбинантного IFN α 2b, который растворяли в воде для инъек-

ТАБЛИЦА 1. ОПТИМИЗАЦИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ЗАЯВЛЯЕМОЙ КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ IFN α 2b

TABLE 1. OPTIMIZATION OF THE COMPONENT COMPOSITION OF A COMPOSITION INCLUDING IFN α 2b

№ к No. c	Доза IFN α 2b, нг/мл	Содержание компонентов в заявляемой композиции, мас. % The content of the components in the claimed composition, by weight. %			Концентрации IFN в крови (нг/мл) после введения через: IFN concentrations in the blood (ng/ml) after administration through:		
		Янтарная кислота Succinic acid	Хитозан Chitosan	ДМСО DMSO	Вода Water	30 мин 30 min	60 мин 60 min
1	90100	0,00	0,00	0,00	остальное other	3,60	4,40
2	89050	0,10	0,10	0,10		3,72	4,55
3	86800	0,50	0,50	0,05		2,20	1,90
4	87650	1,00	0,50	0,10		1,40	1,25
5	88200	0,10	1,00	0,05		1,25	1,20
6	89000	0,50	1,00	0,05		1,26	1,12
7	91000	1,20	1,00	0,10		1,20	1,05
8	87500	1,00	1,20	0,10		1,10	1,10
9	88100	0,10	1,00	0,05		1,12	1,07
10	87690	0,10	1,00	0,02		1,09	1,00
11	89000	0,10	1,00	0,01		1,05	1,00
12	88100	0,10	1,10	0,01		1,13	1,10

Примечание. № к – номер композиции; средняя доза IFN α 2b (M) 88515,83 нг/мл, стандартное отклонение (Sd) \pm 1178,91.

Note. No. c, number composition; average dose IFN α 2b (M) 88515.83 ng/mL, standard deviation (Sd) \pm 1178.91.

ТАБЛИЦА 2. ОПТИМИЗАЦИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ЗАЯВЛЯЕМОЙ КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ IFN γ

TABLE 2. OPTIMIZATION OF THE COMPONENT COMPOSITION OF A COMPOSITION INCLUDING IFN γ

№ к No. c	Доза IFN γ , нг/мл Dose IFN γ , ng/ml	Содержание компонентов в заявляемой композиции, мас. % The content of the components in the claimed composition, by weight. %				Концентрации IFN в крови (нг/мл) после введения через: The content of the components in the claimed composition, by weight. %	
		Янтарная кислота Succinic acid	Хитозан Chitosan	ДМСО DMSO	Вода Water	30 мин 30 min	60 мин 60 min
1	52400	0,00	0,00	0,00	остальное other	3,94	5,25
2	55000	0,10	0,00	0,00		3,57	5,10
3	54900	0,50	0,10	0,00		3,41	4,90
4	54410	1,00	0,50	0,01		2,68	2,40
5	54800	0,10	1,00	0,05		1,10	1,02
6	56700	0,50	1,00	0,01		0,75	0,81
7	57200	1,20	1,00	0,10		0,80	0,86
8	56500	1,00	1,20	0,10		0,79	0,84
9	58050	0,10	1,00	0,05		0,70	0,72
10	57300	0,10	1,00	0,02		0,62	0,70
11	56800	0,10	1,00	0,01		0,54	0,60
12	54800	0,10	1,10	0,01		0,51	0,58

Примечание. № к – номер композиции; средняя доза IFN γ (M) 55738,33 нг/мл; стандартное отклонение (Sd) \pm 1608,75.

Note. No. c, number composition; average dose IFN γ (M) 55738.33 ng/mL, standard deviation (Sd) \pm 1608.75.

ций и интраназально вводили животным группы 2.

В эксперименте использовали половозрелых самцов крыс породы Wistar весом 320,0 г. Перед интраназальным введением композиций интерферонов животным на фоне общей ингаляционной анестезией препаратом «Изофлуран», подаваемого прибором Univertor 410 Anesthesia Unit (Мальта), проводили катетеризацию яремной вены катетером SCI-cat C-2V01 (Россия). Далее животное подключали к системе автоматического взятия образцов крови (DiLab Accusampler, Швеция), что позволяло, используя одно животное определять прижизненные концентрации рекомбинантного белка в его крови в течение заданных интервалов времени. Правая яремная вена была выбрана из соображений легкой доступности для введения катетера и низкому риску кровопотери. Система забора крови представлена на рисунке 1.

Животным группы 1 интраназально и однократно вводили рекомбинантный IFN α 2b (IFN1), предварительно растворенный в заявляемой композиции. Доза IFN α 2b составляла 88345 нг/мл. Животным группы 2 интраназально и однократно вводили рекомбинантный IFN α 2b

(IFN2), предварительно растворенный в воде для инъекций в аналогичных дозировках. Взятие образцов крови у животных проводили до введения препаратов и после их введения через 15, 30, 60, 120, 180, 240 и 300 мин.

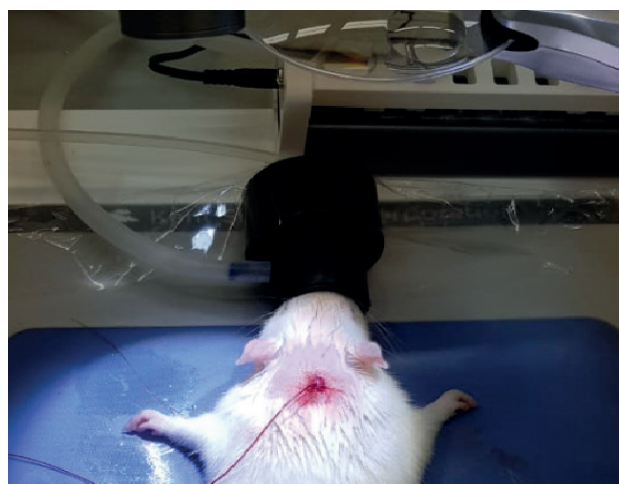


Рисунок 1. Катетеризация вены крысы, подключенной к наркозному аппарату

Figure 1. Catheterization of a rat vein connected to an anesthetic device

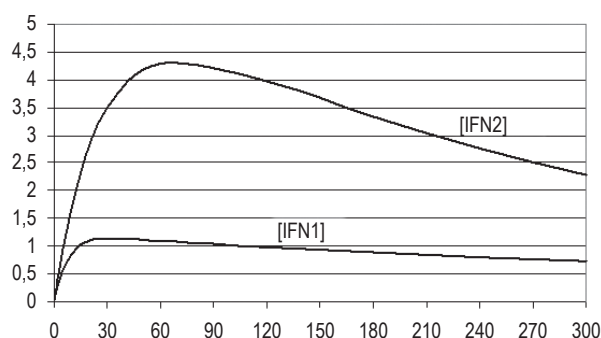


Рисунок 2. Зависимость изменений концентраций интерферона $\alpha 2b$ в крови крыс после однократного интраназального введения

Примечание. [IFN1] – опытные значения концентрации интерферона, предварительно растворенного в композиции, содержащей хитозан, янтарную кислоту и ДМСО. [IFN2] – контрольные значения концентрации интерферона, предварительно растворенного в воде для инъекций. Ось абсцисс – время, прошедшее после введения препарата, мин. Ось ординат – концентрация препарата в крови животного, нг/мл

Количественное определение концентраций интерферонов в образцах крови проводили иммуноферментным способом при использовании тест-систем ELISA-IFN- α (Россия) на планшетном спектрофотометре Multiscan FC Termo Scientific (Германия). Для оценки зависимости изменений концентраций [IFN1] и [IFN2] в крови животных от времени (t), прошедшего после их введения, использовали стандартные фармакокинетические модели, обеспечивающие максимальную корреляцию между экспериментальными значениями концентраций интерферона и их расчетными значениями. Далее определяли интеграл от начального момента времени до бесконечности, что соответствовало площади под фармакокинетической кривой (AUCt) и позволяло провести расчет основных фармакокинетических характеристик.

Для оценки изменений контрольных значений концентраций интерферона [IFN2] в крови крысы после интраназального введения использовали фармакокинетическое выражение следующего вида:

$$[IFN2] = A(\exp^{-\alpha t} - \exp^{-\beta t}) \quad (1)$$

где: [IFN2] – концентрация интерферона в крови после его введения, нг/мл; A – значения предэкспоненциального параметра (коэффициента); α , β – параметры, связанные с относительным распределением препарата; t – время, прошедшее после введения препарата, мин. В результате расчетов значений параметров (A, α , β)

для выражения (1) была получена зависимость контрольных значений [IFN2] от времени (t):

$$[IFN2] = 5,903(\exp(-0,00317t) - \exp(-0,03836t)) \quad (2)$$

Коэффициент корреляции (r) между экспериментальными и расчетными значениями [IFN2] составил 0,965 ($p < 0,01$), что демонстрирует его статистическую значимость и позволяет с приемлемой точностью использовать данное выражение для оценки контрольных изменений концентраций интерферона в крови животного.

Для оценки изменений опытных значений концентраций интерферона [IFN1] в крови крысы после интраназального введения также применяли фармакокинетическое выражение (1). После проведенных расчетов и определения значений параметров (A, α , β) была получена зависимость значений [IFN1] от времени (t) следующего вида:

$$[IFN1] = 1,224(\exp(-0,00177t) - \exp(-0,13096t)) \quad (3)$$

Коэффициент корреляции (r) между экспериментальными и расчетными значениями для [IFN1] составил 0,940 ($p < 0,01$), что также показывает его статистическую значимость и позволяет с достаточной точностью применять выражение для оценки изменений в крови животного концентрации интерферона. На рисунке 2 представлена графическая интерпретация выражений (2) и (3), а именно зависимость изменений концентраций IFN $\alpha 2b$ в крови крыс после однократного интраназального введения.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты демонстрируют, что задержка поступления препарата IFN $\alpha 2b$ в кровоток после интраназального введения композиции происходит при увеличении концентраций хитозана и снижении концентраций ДМСО. Увеличение в заявляемой композиции концентрации хитозана в интервале 0,1-0,5 (мас. %) не вызывает выраженную задержку поступления IFN $\alpha 2b$ в системный кровоток крыс. Повышение концентраций хитозана до 1,0-1,2 (мас. %) вызывает более значительную задержку поступления IFN $\alpha 2b$ после введения. Однако оптимальная концентрация хитозана в заявляемой композиции не превышает 1,00 (мас. %), т. к. дальнейшее увеличение концентрации этого ингредиента в композиции до 1,1-1,2 (мас. %) не оказывает значимого влияния на изменение концентраций IFN $\alpha 2b$ в крови крыс. Оптимальная концентрация ДМСО в заявляемой композиции не превышает 0,05 (мас. %). Оптимальная концентрация янтарной кислоты в заявляемой композиции не превышает 0,10 (мас. %)

Полученные результаты демонстрируют, что на задержку поступления препарата IFN γ в системный кровоток после интраназального введения в основном влияют концентрации хитозана и ДМСО. При повышении концентраций хитозана и снижении концентраций ДМСО отмечается оптимальный интервал концентраций указанных компонентов, обеспечивающих выраженную задержку поступления IFN γ в системный кровоток крыс после интраназального введения. Так, оптимальная концентрация хитозана в заявляемой композиции не превышает 1,00 (мас. %). Оптимальная концентрация ДМСО в заявляемой композиции не превышает 0,05 (мас. %). Оптимальная концентрация янтарной кислоты в заявляемой композиции не превышает 0,10 (мас. %).

Получены следующие фармакокинетические показатели концентраций интерферона в крови крысы после интраназального введения IFN α 2b, растворенного в экспериментальной композиции (IFN1) и контрольной группой (IFN2):

1) Площадь под фармакокинетической кривой (AUCt) нг/мл/мин – IFN1 = 683,0; IFN2 = 1707,7.

2) Константа всасывания (Kr) – IFN1 = 0,13096; IFN2 = 0,03836.

3) Константа всасывания (Kel) – IFN1 = 0,00177; IFN2 = 0,00317.

4) Клиренс (Cl) мл/мин – IFN1 = 129,35; IFN2 = 51,73.

Различия в значениях параметра (AUS_t) в ~2,5 раза подтверждает наличие задержки в слизистой оболочке носа [IFN1] после его введения, т. к. его выраженного поступления в кровоток не происходит. Значения параметра (Kel) сопоставимы между IFN1 и IFN2, значения параметра (Cl) демонстрируют отсутствие эффекта кумуляции препаратов.

Анализ изменений концентраций в крови [IFN2] демонстрирует, что максимальная концентрация препарата фиксируется в интервале 4,3-4,4 нг/мл и определяется через 60-70 мин после его введения. Анализ изменений концен-

траций в крови [IFN1] показывает, что его максимальная концентрация находится в интервале 1,13-1,14 нг/мл и определяется через 30-35 мин после его введения. Это означает, что динамика повышения концентраций контрольных и опытных значений интерферона в крови крыс имеет различия.

Интраназальное введение интерферона, который предварительно растворяли в композиции, содержащей хитозан, янтарную кислоту и ДМСО, обеспечивает более быструю динамику увеличения концентрации препарата в крови, чем введение его после растворения в воде для инъекций. Значения максимальных концентраций интерферонов в крови животных также различаются, что свидетельствует о наличии эффекта задержки препарата в слизистой оболочке носа и ограничения его дальнейшего проникновения в кровоток. По-видимому, этот эффект происходит за счет специфических свойств хитозана, увеличивающего время контакта интерферона со слизистой оболочкой носа. Снижение максимальных значений [IFN2] и [IFN1] после введения наблюдали в течение 60-300 мин и 30-300 мин соответственно. Однако при растворении интерферона в заявляемой композиции отмечается более медленная динамика снижения концентрации препарата в крови крысы.

Выводы

На основании различий значений фармакокинетических параметров (AUC_t) для препаратов IFN1 и IFN2 можно сделать заключение, что применение композиции на основе хитозана, янтарной кислоты и ДМСО приводит к выраженной задержке интерферона в слизистой оболочке носа, что обеспечивает выраженный локальный терапевтический эффект и позволяет добиться меньших системных побочных реакций. Данная композиция целесообразна для дальнейших клинических исследований эффективности иммунотерапии полипозного риносинусита.

Список литературы / References

1. Безрукова Е.В., Конусова В.Г., Воробейчиков Е.В., Симбирцев А.С. Применение рекомбинантного интерферона α 2b (Интерфераль) и γ -D-глутамил-L-триптофана (Бестим) для консервативного лечения хронического полипозного риносинусита // Цитокины и воспаление, 2019. Т. 18, № 1-4. С. 97-101. [Bezrukova E.V. Konusova V.G., Vorobeychikov E.V., Simbirtsev A.S. Use of recombinant interferon α 2b (Interferal) and γ -D-glutamyl-L-tryptophan (Bestim) for the conservative treatment of chronic polypous rhinosinusitis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*. 2019, Vol. 18, no. 1-4, pp. 97-101. (In Russ.)]
2. 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. Analysis of treatment regimens for polypous

rhinosinusitis in the Russian Federation . *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2019, Vol. 18, no. 1 (98), pp. 124-135. (In Russ.)]

3. de Greve G., Hellings P.W., Fokkens W.J., Pugin B., Steelant B., Seys S.F. Endotype-driven treatment in chronic upper airway diseases. *Clin. Transl. Allergy*, 2017, Vol. 7, 22. doi: 10.1186/s13601-017-0157-8.

4. Gonzales-van Horn S.R., Farrar J.D. Interferon at the crossroads of allergy and viral infections. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 98, no. 2, pp. 185-194.

5. Khutoryanskiy V.V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromol. Biosci.*, 2011. Vol. 11, no. 6, 748-764.

6. Stevens W.W., Lee R.J., Schleimer R.P., Cohen N.A. Chronic rhinosinusitis pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, pp. 1442-1453,

7. Stevens W.W., Schleimer R.P., Kern R.C. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2016, Vol. 4, no. 4, pp. 565-572.

8. Teijaro J.R. Type I interferons in viral control and immune regulation. *Curr. Opin. Virol.*, 2016, Vol. 16, pp. 31-40.

Авторы:

Кравченко Э.В. — аспирант кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Безрукова Е.В. — к.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Воробейчиков Е.В. — к.м.н., ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Скворцов Н.В. — младший научный сотрудник ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kravchenko E.V., Postgraduate Student, Department of Otorhinolaryngology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Bezrukova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Vorobeychikov E.V., PhD (Medicine), I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Skvortsov N.V., Junior Research Associate, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 31.03.2024
Отправлена на доработку 08.04.2024
Принята к печати 10.04.2024

Received 31.03.2024
Revision received 08.04.2024
Accepted 10.04.2024

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ И МИКРОБИОМА НА УРОВНЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ СТАРЕНИИ

Бурмакина В.В.¹, Вартанова Н.О.², Хорева М.В.¹,
Городищенская С.В.¹, Авагян А.С.², Свитич О.А.²

¹ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Резюме. На сегодняшний день во всем мире неуклонно растет доля лиц пожилого и старческого возраста. Важнейшими факторами первой линии иммунной защиты слизистых оболочек верхних дыхательных путей являются β-дефензины, представляющие группу секреторных белков с противомикробной активностью. Целью настоящего исследования явилось изучение экспрессии генов противомикробных пептидов β-дефензинов и состава микробиома слизистых оболочек верхних дыхательных путей у лиц старческого возраста и долгожителей при различных фенотипах старения. В основную группу исследования вошло 67 долгожителей и 49 человек старческого возраста, которые в дальнейшем были поделены на две подгруппы в зависимости от протекания старения (патологическое и успешное старение). Из соскобов носоглотки выделяли нуклеиновые кислоты и методом полимеразной цепной реакции в реальном времени определяли уровни экспрессии генов *DEFB1* и *DEFB4*. Состав микробиоты в мазках носоглотки определяли методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

При анализе экспрессии гена *DEFB1* у лиц старческого возраста и долгожителей с успешным и патологическим фенотипом старения не выявлено разницы между группами. Экспрессия гена *DEFB4* была увеличена у долгожителей с патологическим старением по сравнению с долгожителями с успешным старением и с группой старческого возраста. Избыточная продукция противомикробных пептидов носит двойственный характер: с одной стороны, они обеспечивают первую линию защиты от микроорганизмов, а с другой – обладают цитотоксичностью в отношении собственных клеток. Повышение экспрессии гена *DEFB4* при старении может быть обусловлено увеличением количества патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, в качестве которых может выступать собственная микробиота и/или компоненты метаболизма микроорганизмов. При анализе состава микробиоты показано увеличение биоразнообразия у лиц с успешным фенотипом старения по сравнению с патологическим фенотипом. Особое внимание обращает на себя *Staphylococcus* spp., видовой состав которого зависит от фенотипа старения. В группе патологического старения частота высевания *St. aureus* достоверно выше, чем в группе успешного старения.

Адрес для переписки:

Бурмакина Валерия Владиславовна
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ
117513, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 6.
Тел.: 8 (999) 962-13-14.
E-mail: burmakina_vv@rsmu.ru

Address for correspondence:

Valeria V. Burmakina
N. Pirogov Russian National Research Medical University
1 Ostrovityanov St, Bldg 6
Moscow
117513 Russian Federation
Phone: +7 (999) 962-13-14.
E-mail: burmakina_vv@rsmu.ru

Образец цитирования:

В.В. Бурмакина, Н.О. Вартанова, М.В. Хорева,
С.В. Городищенская, А.С. Авагян, О.А. Свитич
«Особенности экспрессии генов противомикробных
пептидов и микробиома на уровне слизистой
оболочки верхних дыхательных путей при старении»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5.
С. 961-966. doi: 10.15789/1563-0625-FOT-16727

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

For citation:

V.V. Burmakina, N.O. Vartanova, M.V. Khoreva,
S.V. Gorodishchenskaya, A.S. Avagyan, O.A. Svitich
“Features of the expression of genes of antimicrobial peptides and the
microbiome at the level of the mucous membrane of the
upper respiratory tract during aging”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5,
pp. 961-966. doi: 10.15789/1563-0625-FOT-16727

© Burmakina V.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-FOT-16727

Таким образом, гиперэкспрессия гена *DEFB4* и изменение состава микробиоты слизистых оболочек верхних дыхательных путей могут являться одними из механизмов, объясняющих повышение восприимчивости к инфекциям при различных фенотипах старения.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, мукозальный иммунитет, противомикробные пептиды *HBD1*, противомикробные пептиды *HBD2*, экспрессия генов, микробиом, долгожители, патологическое старение

FEATURES OF THE EXPRESSION OF GENES OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AND THE MICROBIOME AT THE LEVEL OF THE MUCOUS MEMBRANE OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT DURING AGING

Burmakina V.V.^a, Vartanova N.O.^b, Khoreva M.V.^a,
Gorodishchenskaya S.V.^a, Avagyan A.S.^b, Svitich O.A.^b

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

^b I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. Today, the proportion of elderly and senile people is steadily growing throughout the world. The most important factors in the first line of immune defense of the mucous membranes of the upper respiratory tract are β -defensins, which are a group of secretory proteins with antimicrobial activity. The aim of this study was to study the expression of genes for antimicrobial peptides β -defensins and the composition of the microbiome of the mucous membranes of the upper respiratory tract in elderly people and long-livers with various aging phenotypes.

The main study group included 67 centenarians and 49 elderly people, who were further divided into two subgroups depending on the course of aging (pathological and successful aging). Nucleic acids were isolated from nasopharyngeal scrapings and the expression levels of the *DEFB1* and *DEFB4* genes were determined using real-time polymerase chain reaction. The composition of the microbiota in nasopharyngeal swabs was determined by MALDI-TOF mass spectrometry.

In analyzing the expression of the *DEFB1* gene in elderly people and centenarians with successful and pathological aging phenotypes, no difference was revealed between the groups. Expression of the *DEFB4* gene was increased in centenarians with pathological aging compared to centenarians with successful aging and in the elderly group. Excessive production of antimicrobial peptides is dual in nature; on the one hand, they provide the first line of defense against microorganisms, and on the other, they are cytotoxic to their own cells. An increase in the expression of the *DEFB4* gene during aging may be due to an increase in the number of pathogen-associated molecular patterns, which can be one's own microbiota and/or components of microbial metabolism. Analysis of the microbiota composition showed an increase in biodiversity in individuals with a successful aging phenotype compared to a pathological phenotype. Particular attention is paid to *Staphylococcus* spp., the species composition of which depends on the aging phenotype. In the pathological aging group, the frequency of *St. aureus* colonization is significantly higher than in the successful aging group.

Thus, overexpression of the *DEFB4* gene and changes in the composition of the microbiota of the mucous membranes of the upper respiratory tract may be one of the mechanisms explaining the increased susceptibility to infections in various aging phenotypes.

Keywords: innate immunity, mucosal immunity, antimicrobial peptides *HBD1*, antimicrobial peptides *HBD2*, gene expression, microbiome, longevity, pathological aging

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда №23-15-00137, <http://rscf.ru/project/23-15-00137/>.

Введение

Начиная со второй половины XX века, во всем мире неуклонно увеличивается доля лиц

пожилого и старческого возраста. В структуре заболеваемости лиц старше 70 лет особое место занимают болезни органов дыхания и инфекционные заболевания верхних дыхательных путей (ВДП), такие как ринит, ринофарингит, фарингит и др. [3]. Возрастные морфофункциональные изменения слизистой оболочки ВДП приводят

к снижению иммунной защиты и повышению восприимчивости к различным инфекционным патогенам.

Важнейшими факторами первой линии иммунной защиты слизистых оболочек ВДП являются β -дефензины, представляющие группу секреторных белков с противомикробной активностью. Известно, что β -дефензины, в частности HBD-1 и HBD-2 (Human beta-defensin – человеческий β -дефензин), секретируются эпителиальными клетками слизистой оболочки ВДП и некоторыми комменсалами [6]. На сегодняшний день имеются неоднозначные данные об изменении экспрессии и содержании данных дефензинов при старении [10]. Проводится множество исследований, демонстрирующих большое влияние микробиоты на формирование механизмов врожденного иммунитета в защите слизистых оболочек, однако в основном оценивается только кишечная микробиота [13]. **Целью работы** явилось изучение экспрессии генов β -дефензинов и состава микробиома слизистых оболочек ВДП у лиц старческого возраста и долгожителей при различных фенотипах старения.

Материалы и методы

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ заседание № 24 от 20.11.2023. Пациенты подписывали информированное согласие и согласие на обработку персональных данных.

Основную группу составили 116 пациентов которые проходили обследование в ГБУЗ ГВВ №2 ДЗ г. Москвы и ГБУ Геронтологический центр. Пациенты были разделены на две возрастные группы:

Группа 1 – 49 человек старческого возраста (78±2 года);

Группа 2 – 67 долгожителей (95±3 года).

Для определения фенотипа старения была проведена комплексная гериатрическая оценка, которая включала в себя измерение индекса коморбидности Чарльсон, краткую батарею тестов физического функционирования (SPPB) и краткую шкалу оценки психического статуса (MMSE) [4, 7, 12]. Данные индексы позволяют комплексно оценить уровни соматического, физического и психического состояния пациентов.

На основании выбранных критериев пациенты внутри возрастных групп были разделены на 2 подгруппы в зависимости от типа протекания старения:

Подгруппа а – успешное старение;

Подгруппа б – патологическое старение (табл. 1).

Критерии исключения из обеих подгрупп: наличие острых и хронических инфекционных заболеваний, наличие злокачественных новообразований, отказ от участия в исследовании.

В рамках настоящего исследования проводили взятие соскобов и мазков со слизистой оболочки ВДП. Из клеток выделяли нуклеиновые кислоты методом аффинной сорбции на частицах силикагеля «АмплиПРАЙМ Рибо-сорб» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Далее осуществлялась постановка реакции обратной транскрипции для получения кДНК с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» (ООО «Синтол», Россия). Для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) использовали полученную кДНК и «Набор для проведения ПЦР-РВ SYBR Green I» (ООО «Синтол», Россия). ПЦР-РВ проводили в амплификаторе Rotor-Gene Q (QIAGEN Hiden, Германия). Необходимые для работы праймеры для изучения экспрессии генов *DEFB1* и *DEFB4* синтезированы фирмой ООО «Синтол». Уровень экспрессии генов оценивался по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ от-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUPS

	Группа 1. Старческий возраст Group 1. Elderly age 78±2		Группа 2. Долгожители Group 2. Centenarians 95±3	
	а Успешное старение b Successful aging	б Патологическое старение b Pathologica l aging	а Успешное старение a Successful aging	б Патологическое старение b Pathological aging
n	17	32	30	37
Индекс Чарльсон Charlson index	1-2	≥ 3	3-4	≥ 3
Индекс SPPB SPPB index	> 7	≥ 3	> 7	≤ 7
Индекс MMSE MMSE index	> 27	≤ 27	> 27	≤ 27

носителем уровня экспрессии гена домашнего хозяйства β -актина [1]. Состав микробиома определяли в мазках, взятых с задней поверхности слизистой оболочки носоглотки. Проводили посевы на чашки Петри с селективными средами: Эндо, Сабуро, желточно-солевым агаром, кровяным и уроселективным агаром. Идентификацию чистых культур микроорганизмов осуществляли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии (MALDI Biotyper Sirius RUO System фирмы BRUKER, Германия) [5]. Исследование состава микробиоты проводили на базе «НИИ ВС им. И.И. Мечникова» – на безвозмездной основе.

Статистическая обработка данных проведена с использованием программ Microsoft Excel 2022, STATISTICA 10.0 и GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, США). Полученные данные об экспрессии генов были проанализированы с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни и представлены в виде Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Различие частот статистически значимым считали при $p < 0,05$; при значениях p выше 0,05. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для анализа микробиоты был выбран точный критерий Фишера. При анализе видового разнообразия использовали индекс Шеннона (H), чем выше значение H, тем выше видовое разнообразие в конкретном сообществе.

Результаты и обсуждение

Известно, что противомикробные пептиды экспрессируются в барьерных тканях и осуществ-

ляют первую линию иммунной защиты от патогенов. HBD-1 вырабатывается конститутивно в отличие от HBD-2, который секретируется в ответ на воспаление и/или инфекцию [6]. На первом этапе работы был оценен уровень экспрессии гена *DEFB1*, в исследуемых группах и подгруппах. При анализе экспрессии гена *DEFB1* у лиц старческого возраста и долгожителей с успешным и патологическим фенотипом старения не выявлено статистически значимой разницы между группами (рис. 1А).

У долгожителей с патологическим фенотипом старения экспрессия гена *DEFB4* увеличена в 2,5 раза ($p < 0,01$), по сравнению с подгруппой долгожителей с успешным фенотипом старения. Аналогичные результаты были получены при сравнении лиц старческого возраста с успешным и патологическим старением. В подгруппе лиц старческого возраста с патологическим старением, экспрессия гена *DEFB4* превышала данный показатель в подгруппе успешного фенотипа старения в 11 раз ($p < 0,001$).

При сравнении двух возрастных групп было показано, что у долгожителей с патологическим старением экспрессия гена *DEFB4* была выше в 4 раза ($p < 0,01$) по сравнению с подгруппой патологического старения лиц старческого возраста. У долгожителей с успешным старением уровень экспрессии гена *DEFB4* был значительно увеличен в 53 раза ($p < 0,01$) относительно лиц старческого возраста с успешным старением (рис. 1Б).

Увеличение экспрессии гена *DEFB4* можно объяснить повышенной проницаемостью кле-

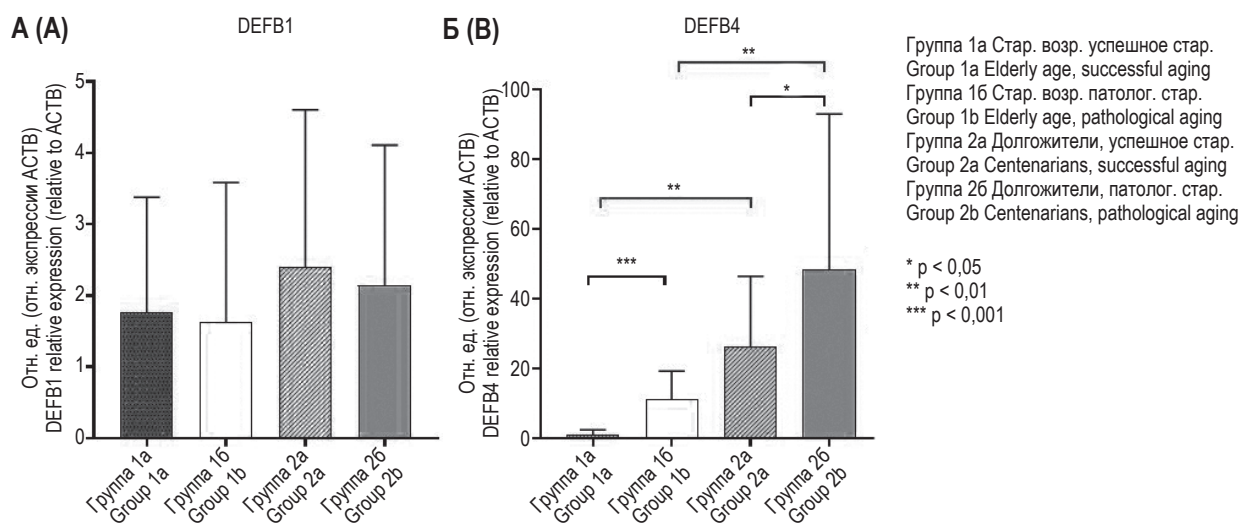


Рисунок 1. Экспрессия генов противомикробных пептидов *DEFB1* (А) и *DEFB4* (Б) на уровне слизистой верхних дыхательных путей у долгожителей и лиц старческого возраста

Примечание. Данные представлены в виде Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$.

Figure 1. Expression of the genes of antimicrobial peptides *DEFB1* (A) and *DEFB4* (B) at the level of the mucous membrane of the upper respiratory tract in centenarians and elderly people

Note. Data presented as Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$.

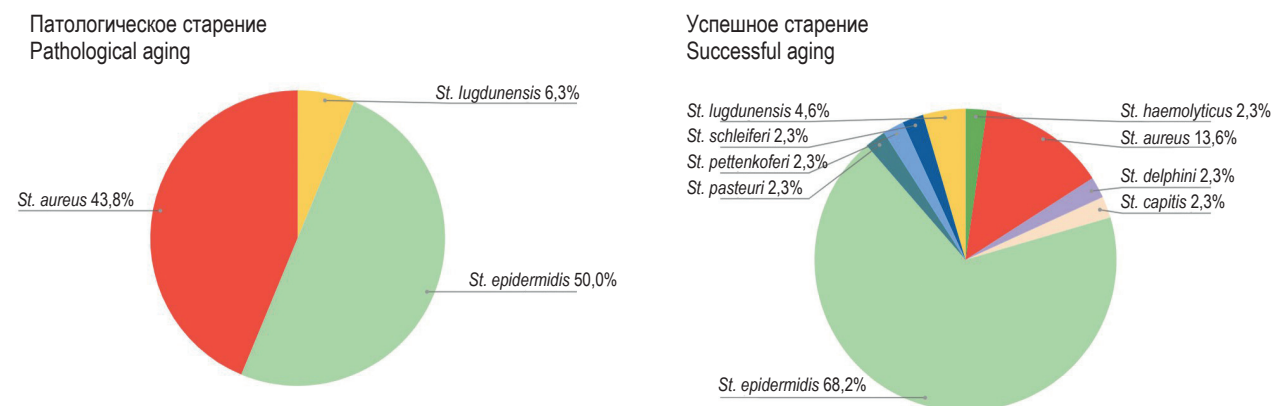


Рисунок 2. Изменение видового состава *Staphylococcus* spp. на уровне слизистой носоглотки ВДП в подгруппах с различными фенотипами старения

Примечание. Данные представлены в виде частоты встречаемости каждого вида в % от общей популяции *Staphylococcus* spp.

Figure 2. Change in species composition of *Staphylococcus* spp. at the level of the nasopharyngeal mucosa of the upper respiratory tract in subgroups with different aging phenotypes

Note. Data are presented as the frequency of occurrence of each species as a % of the total population of *Staphylococcus* spp.

точных барьеров и увеличением количества патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), активирующих систему врожденного иммунитета. Избыточная продукция противомикробных пептидов носит двойственный характер: с одной стороны, они обеспечивают первую линию защиты от микроорганизмов, а с другой — обладают цитотоксичностью в отношении собственных клеток [2].

В качестве ПАМП, стимулирующих выработку противомикробных пептидов, может выступать собственная микробиота и/или компоненты метаболизма микроорганизмов. В связи с этим на следующем этапе работы был проведен анализ состава микробиоты на уровне слизистой оболочки ВДП. В ходе исследования было выявлено увеличение биоразнообразия у лиц с успешным фенотипом старения (Индекс Шеннона (H) — 38) по сравнению с патологическим фенотипом (H — 14). При анализе двух возрастных групп показано большее видовое разнообразие микробиоты (H — 36) у лиц старческого возраста по сравнению с долгожителями (H — 16).

Особое внимание обращает на себя *Staphylococcus* spp., видовой состав которого зависит от фенотипа старения. В подгруппе успешного старения выявлено 9 видов *Staphylococcus* spp., а в подгруппе патологического старения — всего

3. При этом *St. aureus* «вытесняет» нормальную флору (в частности — *St. epidermidis*): частота высеваения *St. aureus* в подгруппе с патологическим старением достоверно выше, чем в подгруппе успешного старения ($p = 0,01$) (рис. 2). При исследовании видового разнообразия *Staphylococcus* spp., в разных возрастных группах у долгожителей наблюдается низкое видовое разнообразие по сравнению с группой старческого возраста. Однако частота встречаемости *St. aureus* от возраста не зависит.

Как было сказано ранее, при увеличении роста патогенной и условно-патогенной микрофлоры происходит активация паттерн-распознающих рецепторов, которая приводит к повышению количества противомикробных пептидов [9]. Известно, что *St. aureus* активирует TLR2, что влечет за собой гиперэкспрессию гена противомикробного пептида *DEFB4*, которая была продемонстрирована в ходе исследования [8, 11].

Заключение

Таким образом, гиперэкспрессия гена *DEFB4* и изменение состава микробиоты слизистых оболочек верхних дыхательных путей могут являться одними из механизмов, объясняющих повышение восприимчивости к инфекциям при различных фенотипах старения.

Список литературы / References

1. Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю. ПЦР в реальном времени: обзор подходов к анализу данных // Прикладная биохимия и микробиология, 2006. Т. 42, № 5. С. 455-463. [[Rebrikov D.V., Trofimov D.Yu. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, Vol. 42, no. 5, pp. 455-463. (In Russ.)]
2. Шамова О.В., Жаркова М.С., Чернов А.Н., Владимирова Е.В., Сухарева М.С., Комлев А.С., Коченда О.Л., Орлов Д.С. Антимикробные пептиды врожденного иммунитета как прототипы новых средств борьбы с антибиотикорезистентными бактериями // Российский журнал персонализированной медици-

- ны, 2021. Т. 1, № 1. С. 146-172. [Shamova O.V., Zharkova M.S., Chernov A.N., Vladimirova E.V., Sukhareva M.S., Komlev A.S., Kochenda O.L., Orlov D.S. Antimicrobial peptides of innate immunity as prototypes of new agents to fight antibiotic-resistant bacteria. *Rossiyskiy zhurnal personalizirovannoy meditsiny = Russian Journal for Personalized Medicine*, 2021, Vol. 1, no. 1, pp. 146-172. (In Russ.)]
3. Alan P. Baptist, Sharmilee Nyenhuis. Rhinitis in the elderly. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2016, Vol. 36, no. 2, pp. 343-357.
 4. Arevalo-Rodriguez I., Smailagic N., Roqué-Figuls M., Ciapponi A., Sanchez-Perez E., Giannakou A., Pedraza O.L., Cosp X.B., Cullum S. Mini-Mental State Examination (MMSE) for the early detection of dementia in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database Syst Rev.*, 2021, Vol. 7, no. 7, pp. 345-367.
 5. Bright J., Claydon M., Soufian M., Gordon D. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *J. Microbiol. Methods*, 2002, Vol. 48, no. 2-3, pp. 127-138.
 6. Castañeda-Delgado J.E., Frausto-Lujan I., González-Curiel I., Montoya-Rosales A., Serrano C.J., Torres-Juarez F., Enciso-Moreno J.A., Rivas-Santiago B. Differences in cytokine production during aging and its relationship with antimicrobial peptides production. *Immunol. Investig.*, 2017, Vol. 46, no. 1, pp. 48-58.
 7. Charlson M., Carrozzino D., Gudi J., Chiara Patierno C. Charlson comorbidity index: a critical review of clinimetric properties. *Psychother. Psychosom.*, 2022, Vol. 91, no. 1, pp. 8-35.
 8. Hertz C.J., Wu Q., Porter E.M., Zhang Y.J., Weismüller K., Godowski P.J., Ganz T., Randell S.H., Modlin R.L. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human β defensin-2. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 12, pp. 6820-6826.
 9. Ji S., Shin J.E., Kim Y.S., Oh J.E., Min B.M., Choi Y. Toll-like receptor 2 and NALP2 mediate induction of human beta-defensins by fusobacterium nucleatum in gingival epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2009, Vol. 77, no. 3, pp. 1044-1052.
 10. Kohtaro F., Hiroshi K. Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases. *Trends Immunol.*, 2009, Vol. 30, no. 7, pp. 334-343.
 11. Kumar A., Zhang J., Yu F.S. Toll-like receptor 2-mediated expression of beta-defensin-2 in human corneal epithelial cells. *Microbes Infect.*, 2006, Vol. 8, no. 2, pp. 380-389.
 12. Ramírez-Vélez R., de Asteasu M.L.S., Morley J., Cano-Gutierrez C., Izquierdo M. Performance of the short physical performance battery in identifying the frailty phenotype and predicting geriatric syndromes in community-dwelling elderly. *J. Nutr. Health Aging*, 2020, Vol. 25, no. 2, pp. 209-217.
 13. Takiishi T., Fenero C.I.M., Câmara N.O.S. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*, 2017, Vol. 5, no. 4, pp. 234-245.

Авторы:

Бурмакина В.В. — аспирант, старший лаборант кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Вартанова Н.О. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории условно-патогенных бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

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

Городищенская С.В. — лаборант кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Авагян А.С. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Burmakina V.V., Postgraduate Student, Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, MBF, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Vartanova N.O., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Microbiology of Opportunistic Bacteria, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

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

Gorodishchenskaya S.V., Laboratory Assistant, Department of Immunology, MBF, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Avagyan A.S., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.03.2024
Отправлена на доработку 08.04.2024
Принята к печати 10.04.2024

Received 29.03.2024
Revision received 08.04.2024
Accepted 10.04.2024

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ КАК ИНДИКАТОРЫ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ЧУЖЕРОДНЫХ ЧАСТИЦ

**Арташян О.С., Храмова Ю.С., Власова А.А.,
Тюменцева Н.В., Юшков Б.Г.**

*ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия*

Резюме. Одной из ключевых проблем внедрения наночастиц в клиническую практику с диагностической и терапевтической целью является проблема их безопасности. В ответ на попадание в организм чужеродных частиц активно реагирует соединительная ткань, важным компонентом которой являются тучные клетки. Реакция тучных клеток может являться показателем биосовместимости чужеродных частиц. Исследование проводили на крысах-самцах линии Wistar. Для изучения реакции тучных клеток использовали железоуглеродные наночастицы в модификации FeC, стабилизированные в водной среде с использованием вспомогательного вещества. Раствор наночастиц животным вводили внутривенно однократно. Исследование тканей (печень, легкие, сердце, тимус, почки) проводили через 1, 7 и 30 суток после введения. Проводили анализ органов относительно содержания и характера распределения наночастиц в них. Исследуемые ткани оценивали на предмет структурных изменений и морфофункционального состояния тучных клеток в них. После введения наночастиц наибольшее их количество обнаруживается в печени и легких, меньшее – в сердце, почках и тимусе. Печень и легкие являются основными органами выведения наночастиц за счет высокого содержания фагоцитирующих клеток. Накопление наночастиц в печени приводит к развитию как деструктивных процессов, так и к активации компенсаторно-приспособительных механизмов, которые проявляются в виде клеточной и внутриклеточной регенерации гепатоцитов. В других органах, где наночастиц меньше, структурные перестройки выражены слабо, касаются изменений со стороны микроциркуляторного русла. На введение наночастиц тучные клетки исследуемых органов реагируют по-разному. Первыми реагируют тучные клетки печени уменьшением числа и усилением дегрануляции. Одновременно реагирует популяция тучных клеток легких, резкой активацией дегрануляции без изменения количества. Повышение секреторной активности тучных клеток в легких и печени – органах, через которые наночастицы выводятся из организма, указывает на участие тучных клеток в регуляции элиминации частиц через межклеточные сигнальные пути взаимодействия с системой фагоцитирующих мононуклеаров. В сердце тучные клетки принимают участие в поддержании воспалительного процесса на раннем сроке, способствуют возвращению показателей миокарда к гомеостатической норме на поздних сроках эксперимента. Тучные клетки можно рассматривать в качестве индикато-

Адрес для переписки:

*Арташян Ольга Сергеевна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (343) 374-00-70, 8 (922) 222-21-07.
E-mail: artashyan@inbox.ru*

Address for correspondence:

*Olga S. Artashyan
Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
106 Pervomayskaya St
Ekaterinburg
620049 Russian Federation
Phones: +7 (343) 374-00-70, +7 (922) 222-21-07.
E-mail: artashyan@inbox.ru*

Образец цитирования:

*О.С. Арташян, Ю.С. Храмова, А.А. Власова,
Н.В. Тюменцева, Б.Г. Юшков «Тучные клетки как
индикаторы биосовместимости чужеродных частиц»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5.
С. 967-974.
doi: 10.15789/1563-0625-MCA-16745*

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

For citation:

*O.S. Artashyan, Yu.S. Khramtsova, A.A. Vlasova,
N.V. Tyumentseva, B.G. Yushkov “Mast cells as indicators
of foreign particle biocompatibility”, Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5,
pp. 967-974.
doi: 10.15789/1563-0625-MCA-16745*

*© Artashyan O.S. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License*

DOI: 10.15789/1563-0625-MCA-16745

ров биосовместимости наночастиц. Тучные клетки, являясь инициаторами воспаления, совместно с макрофагами выступают в качестве компонентов первой линии защиты организма от чужеродных частиц. Отсутствие воспалительного процесса и сохранение структурно-функциональных характеристик тканей, где аккумулируются наночастицы, а также реакция тучных клеток в них свидетельствуют об относительной безопасности исследуемых частиц.

Ключевые слова: тучные клетки, дегрануляция, наночастицы, биосовместимость, иммунная защита, воспаление

MAST CELLS AS INDICATORS OF FOREIGN PARTICLE BIOCOMPATIBILITY

Artashyan O.S., Khramtsova Yu.S., Vlasova A.A., Tyumentseva N.V.,
Yushkov B.G.

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The key problem of introducing nanoparticles into clinical practice for diagnostic and therapeutic purposes is their safety. Connective tissue, an important component of which are mast cells, reacts actively in response to foreign particles. The reaction of mast cells can be an indicator of the biocompatibility of foreign particles. The study was conducted on male Wistar rats. Iron-carbon nanoparticles in the FeC modification stabilized in an aqueous medium using an auxiliary substance were used. Tissue examination (liver, lungs, heart, thymus, kidneys) was performed 1, 7 and 30 days after injection. After the injection of nanoparticles, the largest quantity of them is found in the liver and lungs, a smaller quantity is found in the heart, kidneys and thymus. The liver and lungs are the main organs of excretion of nanoparticles due to phagocytes. The accumulation of nanoparticles in the liver leads to the development of destructive processes and to the activation of compensatory and adaptive mechanisms in the form of cellular and intracellular regeneration of hepatocytes. In organs with a low content of nanoparticles, structural changes are poorly expressed. The mast cells of the studied organs react differently to the introduction of nanoparticles. The first to react are the mast cells of the liver by reducing the quantity and increasing degranulation. The population of lung mast cells reacts unidirectionally by sharply activating degranulation without changing the amount. An increase in the secretory activity of mast cells in the lungs and liver indicates the participation of mast cells in the regulation of particle elimination through intercellular signaling pathways of interaction with the system of phagocytic mononuclear cells. Heart mast cells are involved in maintaining the inflammatory process in the early period of the experiment, contribute to the return of myocardial parameters to homeostatic norm in the late period of the experiment. Mast cells can be considered as indicators of biocompatibility nanoparticles. The absence of an inflammatory process and the preservation of the structural and functional characteristics of the tissues where nanoparticles accumulate, as well as the reaction of mast cells in them, indicate the relative safety of the particles under study.

Keywords: mast cells, degranulation, nanoparticles, biocompatibility, immune defense, inflammation

Работа выполнена в рамках государственного задания ИИФ УрО РАН (Регистрационный номер НИОКТР № 122020900136-4) с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

Введение

Известно, что в ответ на попадание в организм чужеродных частиц активно реагирует соединительная ткань, важным компонентом которой практически во всех органах являются тучные клетки (ТК) — тканевые клетки миелоидного ряда костномозгового происхождения, являю-

щиеся частью иммунной системы [6, 10, 12]. ТК имеют на своей поверхности различные рецепторы, благодаря этому они способны обнаруживать потенциально опасные сигналы и посредством высвобождения медиаторов запускать соответствующие иммунные реакции [13, 14]. Основная функция тучных клеток — обеспечение гомеостаза различных тканей и органов, контроль отдельных параметров функциональных систем организма (свертываемость крови, проницаемость сосудов), иницирование острого и поддержание хронического воспаления. ТК выступают в качестве ключевых эффекторов при аллергических

процессах [1]. Функции ТК осуществляются за счет синтеза, накопления и выделения ими медиаторов, в том числе острого воспаления (гистамин, простагландины, лейкотриены), факторов поддержания и хронизации воспаления (цитокины и хемокины) и факторов ремоделирования тканей (протеазы и факторы роста) [3]. Соответственно, ТК можно рассматривать в качестве индикаторов физиологического состояния соединительной ткани, имеющей свои особенности в различных органах и тканях и определяющих чувствительность последних к различным воздействиям. Именно поэтому реакция ТК может являться отличным показателем биосовместимости чужеродных частиц.

В последние годы наноразмерные частицы – наночастицы (НЧ) широко исследуются, их применение связано с решением разнообразных задач фармакологии и медицины [8].

В связи с этим целью данной работы явилось изучение реакции ТК различных органов на введение потенциально-биосовместимых железоуглеродных наночастиц.

Материалы и методы

Исследование проводили на 33 крысах-самцах линии Wistar 4-месячного возраста. Условия содержания и обращение с животными соответствовали Директиве Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. На проведение данного исследования получено разрешение локального этического комитета ИИФ УрО РАН (протокол № 8 от 27.02.2017 года).

Железоуглеродные НЧ в модификации FeC (со структурой «ядро-(Fe) углеродная оболочка») стабилизировали в водной среде с использованием вспомогательного вещества – дистеарилол-фосфатидилэтаноламин-полиэтиленгликоль 2000 (DSPE-PEG-2000). НЧ были синтезированы в ИФМ УрО РАН (г. Екатеринбург). Суспензию НЧ FeC-DSPE-PEG-2000 готовили путем ультразвуковой обработки смеси, содержащей металлуглеродные частицы (2,5 г/л) и вспомогательное вещество (75 г/л) в физиологическом растворе. Раствор НЧ (5 мг/мл) животным вводили внутривенно в хвостовую вену в количестве 0,7 мл однократно. Животных выводили из эксперимента путем передозировки диэтилового эфира на 1-е (n = 9), 7-е (n = 10) и 30-е (n = 9) сутки после введения НЧ. Контролем служили интактные крысы (n = 5). Концентрацию НЧ в тканях определяли с помощью магнитных измерений на весах Фарадея (лаборатория прикладного магнетизма ИФМ УрО РАН), обеспечивающих чувствительность при концентрации до 0,002 мг/г.

Для гистологического исследования производили забор органов (тимус, печень, сердце, кожа,

почки, легкие, селезенка), которые фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина. По стандартной схеме изготавливали препараты для дальнейшего микроскопирования (проводка на автомате закрытого типа Shandon Excelsior (MICROM International GmbH), заливка тканей парафином EG 1160 (Leica), резка блоков на микротоме Thermo Scientific Microm HM 450 (MICROM International GmbH), толщина срезов органов составляла 4 мкм). Для выявления ТК препараты окрашивали толуидиновым синим. Подсчет ТК в органах проводили на единицу площади с пересчетом на 1 мм². ТК типировали по содержанию гранул в цитоплазме, характеру их распределения и дегрануляции. Определяли синтетическую активность, вычисляя средний гистохимический коэффициент (СГК), и секреторную (дегрануляционную) активность, вычисляя индекс дегрануляции (ИД, %) [5].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Past 3.15 и Statistica 8.0. Данные представляли в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – ошибка среднего. Сравнение групп выполняли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия между показателями в разных группах считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

ТК у интактных животных являются гетерогенной популяцией, которая располагается в рыхлой соединительной ткани вблизи кровеносных сосудов и распространена повсеместно. В каждом отдельном органе ТК имеют свои морфофункциональные особенности. В печени ТК, как правило, мелкие, неправильной формы, располагаются исключительно в портальной зоне и вдоль синусоидов. В сердце ТК локализируются в периваскулярной ткани, адвентиции сосудов, в сердечных клапанах. В легких ТК в наибольшем количестве присутствуют в соединительной ткани легочной плевры, в интерстициальной ткани, между альвеолами, вокруг капилляров и более крупных кровеносных сосудов. Главным образом, это клетки округлой формы, реже веретеновидной и разветвленной амебоидной формы. Сравнительно высокое содержание ТК отмечается в тимусе, где они крупные, от округлой до вытянутой веретенообразной формы, располагаются в капсуле и междольковых перегородках железы. В коже ТК крупные, располагаются: в дерме, в подкожной жировой клетчатке, особенно много их вблизи кровеносных сосудов. В почках ТК встречаются в извитых и прямых проксимальных канальцах нефронов. Большинство этих

клеток имеет овальную форму. В селезенке ТК отсутствуют.

Несмотря на различия в количестве, ТК интактных органов характеризуются одинаковой синтетической активностью, за исключением сердца (низкий СГК), и секреторной (дегрануляционной) активностью, за исключением легких, где она минимальная (см. табл. 1).

Магнитометрические исследования показали, что основное количество НЧ после их внутривенного введения аккумулируется печенью, чуть меньше их содержится в селезенке, в остальных исследуемых органах (легкие, почки, миокард) находится минимальное количество частиц, в коже они не обнаруживаются (см. табл. 1).

Кожа и селезенка были исключены из дальнейшего анализа, т. к. в коже не были зафиксированы НЧ, а в паренхиме селезенки отсутствуют ТК.

На введение НЧ исследуемые органы реагируют по-разному в отношении как структурных изменений, так и морфофункционального состояния ТК в них.

В печени на ранних сроках выявляются гепатоциты с признаками диффузной зернистой дистрофии, анизоцитоза и анизонуклеоза (см. рис. 1А, см. 3-ю стр. обложки). Наблюдается значительное количество двуядерных гепатоцитов, что свидетельствует о том, что запускаются компенсаторные внутриклеточные процессы. НЧ обнаруживаются в просвете сосудов, единичные их включения отмечаются в клетках Купфера. На поздних сроках наблюдается тотальное накопление НЧ в клетках Купфера. В синусоидальных пространствах собираются конгломераты НЧ. Вблизи таких скоплений НЧ из-за плохой циркуляции крови отмечаются единичные очаговые глобулярные некрозы гепатоцитов с отсутствием инфильтрации и воспалительной реакции. По всей видимости макрофагальные клетки берут на себя основную функцию по «очищению» ткани печени от НЧ. ТК в печени реагируют сразу на изменение гомеостаза, вызванного большим количеством чужеродных частиц. Уже на первые сутки число ТК уменьшается. Функциональная активность ТК усиливается на 7-е сутки, о чем свидетельствует значительное повышение индекса дегрануляции (см. табл. 1).

В легких на раннем сроке после введения НЧ в большом количестве определяются в эндотелии сосудов, частично в альвеолярных макрофагах и в эпителии бронхов. На поздние сроки – в просвете сосудов, в эпителии бронхиол и в эпителии альвеолярных перегородок, в виде конгломератов в альвеолярных макрофагах. При этом структурные изменения в легких не выявляются (см. рис. 1Б, см. 3-ю стр. обложки). Количество

ТК в легких не меняется, но происходит усиление дегрануляционной активности ТК на 7-е и 30-е сутки (см. табл. 1). Соответственно, реакция легочных ТК подобна ответу популяции ТК в печени, вероятно, из-за активации макрофагов в этих органах в ответ на введение НЧ.

В сердце на раннем сроке наблюдается интерстициальный отек, расширение просвета сосудов. НЧ определяются в эндотелии сосудов эндомизия, сами кардиомиоциты без выраженных структурных изменений. Через 30 суток в миокарде нет структурных изменений. Количество ТК здесь не меняется на протяжении всего срока эксперимента (рис. 1В, см. 3-ю стр. обложки). Происходит увеличение синтетической активности ТК и снижение дегрануляционной на 7-е сутки с дальнейшим восстановлением этих показателей на 30-е сутки до интактных значений (см. табл. 1).

В почках НЧ локализуются в большом количестве в корковом веществе: в мезонгиальных клетках сосудов клубочков, цитоплазме нефроэпителия как проксимальных, так и дистальных канальцев, в просвете синусоидальных сосудов и клетках эпителия в виде мелких включений темно-коричневого и черного цвета. Изменений в структуре органа и в морфофункциональном состоянии ТК при этом не обнаруживается.

В тимусе НЧ фиксируются в незначительных количествах, структурных изменений не происходит. На 30-е сутки после введения в тимусе резко увеличивается число ТК без изменения их активности (см. табл. 1, рис. 1Г, см. 3-ю стр. обложки).

Ранее нами было показано, что при введении железоуглеродных НЧ в организм одни органы практически не задерживают их, а другие являются наиболее аккумулятивными для них [4]. На 1-е сутки после введения НЧ наибольшее их количество ожидаемо обнаруживается в печени и легких, меньшее – в сердце, почках и тимусе. Это объясняется тем, что печень и легкие являются основными органами выведения НЧ за счет высокого содержания фагоцитирующих клеток. Накопление НЧ в печени приводит к развитию двоякого рода изменений: происходит и развитие деструктивных процессов, и активация компенсаторно-приспособительных механизмов, которые проявляются в виде клеточной и внутриклеточной регенерации гепатоцитов. В других органах, где НЧ меньше, структурные перестройки выражены слабо и в основном касаются изменений со стороны микроциркуляторного русла. Через месяц общее содержание НЧ во всех тканях достоверно уменьшается за счет выведения их из организма, структура органов восстанавливается.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ТК ОРГАНОВ НА РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ НЧ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF MCS FOR DIFFERENT PERIODS AFTER THE INTRODUCTION OF NP

ТК органов после введения НЧ MCS of organs after the introduction of NP	Интактные Intact	1-е сутки 1 st day	7-е сутки 7 th day	30-е сутки 30 th day
Печень Liver				
Содержание НЧ, мг/г NP content, mg/g	–	0,270±0,044	0,178±0,024	0,0471±0,013*
Кол-во ТК, 1 мм ² Number of MCS in 1 mm ² of the organ	10,60±2,11	3,10±0,26*	4,50±0,34* ^	4,47±0,23* ^
СГК ТК Average histochemical coefficient of MCS	2,39±0,07	2,28±0,14	1,99±0,15	2,24±0,07#
ИД ТК, % Degranulation index of MCS, %	15,29±4,10	15,46±6,02	25,52±4,30* ^	13,12±1,55* ^ #
Легкие Lungs				
Содержание НЧ, мг/г NP content, mg/g	–	0,115±0,097	0,008±0,007*	0,001±0,001*
Кол-во ТК, 1 мм ² Number of MCS in 1 mm ² of the organ	27,20±5,82	17,54±4,11	27,40±6,71	19,22±3,88
СГК ТК Average histochemical coefficient of MCS	2,28±0,12	2,52±0,08	2,08±0,11^	2,05±0,11^
ИД ТК, % Degranulation index of MCS, %	0,580±0,003	0,840±0,006	4,11±1,98* ^	6,71±2,12* ^
Сердце Heart				
Содержание НЧ, мг/г NP content, mg/g	–	0,005±0,003	0,002±0,001	0
Кол-во ТК, 1 мм ² Number of MCS in 1 mm ² of the organ	11,00±3,00	13,75±1,66	14,00±2,58	11,22±1,65
СГК ТК Average histochemical coefficient of MCS	1,65±0,27	2,22±0,08	2,48±0,09*	1,98±0,15#
ИД ТК, % Degranulation index of MCS, %	24,68±11,00	14,42±2,84	5,37±2,29* ^	11,95±3,79#
Тимус Thymus				
Содержание НЧ, мг/г NP content, mg/g	–	0,003±0,001	0,001±0,001	0
Кол-во ТК, 1 мм ² Number of MCS in 1 mm ² of the organ	31,20±3,37	34,36±5,08	39,90±3,60	75,44±7,83* ^ #
СГК ТК Average histochemical coefficient of MCS	2,12±0,17	2,15±0,08	2,26±0,09	2,14±0,06
ИД ТК, % Degranulation index of MCS, %	15,00±5,58	10,86±2,77	10,78±2,18	12,24±1,87

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

ТК органов после введения НЧ MCs of organs after the introduction of NP	Интактные Intact	1-е сутки 1 st day	7-е сутки 7 th day	30-е сутки 30 th day
Почки Kidneys				
Содержание НЧ, мг/г NP content, mg/g	–	0,002±0,001	0,001±0,001	0,001±0,001
Кол-во ТК, 1 мм² Number of MCs in 1 mm ² of the organ	7,00±1,14	4,20±0,62	4,30±0,56	4,66±0,85
СГК ТК Average histochemical coefficient of MCs	2,52±0,12	2,21±0,20	2,55±0,15	1,93±0,20
ИД ТК, % Degranulation index of MCs, %	9,08±3,97	7,14±3,97	5,10±2,63	16,20±8,96

Примечание. Различия достоверны по сравнению с: * – интактными, ^ – 1-ми сутками, # – 7-ми сутками (p < 0,05, U-критерий Манна–Уитни).

Note. Differences are reliable compared with a groups: *, intact; ^, 1st day; #, 7th day (p < 0.05, The Mann–Whitney criterion).

Тучноклеточные популяции исследуемых органов включаются в реакцию организма на разные сроки после введения НЧ. Первыми на попадание НЧ реагируют ТК печени (рис. 1А, см. 3-ю стр. обложки), где происходит уменьшение их числа на 1-е сутки и усиление дегрануляции на 7-е сутки. Однонаправленно реагирует популяция ТК легких (рис. 1Б, см. 3-ю стр. обложки), где на 7-е сутки после введения происходит их резкая активация в виде значительного повышения дегрануляции без изменения количества.

Поскольку НЧ в печени и легких в большинстве своем аккумулируются макрофагальными клетками, есть основание полагать, что ТК включаются с ними в совместную регуляцию данного процесса (нейтрализации чужеродных агентов), так как их основная функция – способность через многочисленные рецепторы воспринимать сигналы окружающей среды и реагировать на них, поддерживая тканевой гомеостаз. Количество ТК в печени и легких не увеличивается при введении НЧ на все сроки эксперимента и не развивается вполне ожидаемый воспалительный процесс из-за аккумуляции чужеродных частиц. Так, ТК могут контролировать интенсивность и продолжительность иммунного ответа, регулируя активацию иммунных клеток, их выживание, дифференцировку, фенотип, и, в конечном итоге, их функцию посредством многочисленных продуцируемых цитокинов (IL-10, IL-6, IL-1, TNF α , VEGF и др.) [9]. Результаты данного исследования указывают на то, что ключевым моментом в активации макрофагов со стороны ТК является срок 7 суток, поскольку именно в это время от-

мечается повышенная секреторная деятельность тучноклеточной популяции печени и легких.

Повышение секреторной активности ТК в легких и печени – органах, через которые НЧ выводятся из организма, дает основание предположить участие ТК в регуляции элиминации НЧ через межклеточные сигнальные пути взаимодействия с системой фагоцитирующих мононуклеаров [10].

Все вышесказанное свидетельствует об относительной биосовместимости использованных в эксперименте железоуглеродных НЧ. Так как в случае их высокой токсичности, реакция со стороны иммунной системы была бы более выраженной, поскольку ТК, взаимодействуя с резидентными в тканях макрофагами, способствуют проявлению и развитию воспалительной реакции, обеспечивают инфильтрацию пораженной ткани нейтрофилами и их последующему распределению по ней [7].

Попадание через активный кровоток в сердце некоторого количества НЧ не приводит к их поглощению макрофагами, которые в норме присутствуют в органе [15]. НЧ локализируются в эндотелии сосудов, патологические процессы миокарда также касаются микроциркуляторного русла. ТК сердца сохраняют здесь на протяжении всего времени высокую численность. При этом они принимают участие в поддержании воспалительного процесса на раннем сроке, в том числе как источники ангиогенных факторов, и способствуют возвращению показателей миокарда к гомеостатической норме на поздние сроки экспе-

римента за счет снижения своей дегрануляции на 7-е сутки.

На поздние сроки помимо вышеперечисленных тучноклеточных популяций интересным образом реагируют ТК тимуса (рис. 1Г, см. 3-ю стр. обложки). Несмотря на отсутствие структурных изменений в этой железе, на позднем сроке после введения НЧ здесь происходит резкое увеличение числа ТК (см. табл. 1). Данное увеличение может быть связано с миграцией в тимус клеток из костного мозга для дальнейшего их созревания, что подтверждают другие авторы [2]. Мукозные ТК, располагающиеся в основном в барьерных тканях (слизистые, эндотелий сосудов), являются короткоживущими относительно соединительнотканых (серозных) ТК, и, принимая гомеостатическое участие в реагировании на введение чужеродных НЧ, их популяция могла значительно обеднеть. Соответственно, организму требуется восполнить этот пул клеток для дальнейшей слаженной работы, что и объясняет

резкое повышение их количества в тимусе через 30 дней после введения НЧ.

На протяжении всего эксперимента отсутствует реакция со стороны ТК почек, несмотря на локализацию НЧ в некотором количестве в их корковом веществе.

Заключение

Проведенное исследование дает основание предположить, что ТК могут выступать в качестве индикаторов биосовместимости НЧ. Воспалительные реакции имеют решающее значение для защиты организма при введении чужеродных агентов практически любой природы. ТК, являясь инициаторами воспаления, совместно с макрофагами выступают в качестве компонентов первой линии защиты организма от чужеродных частиц [11]. Отсутствие воспалительного процесса, сохранение структурно-функциональных характеристик тканей, где аккумулируются НЧ, реакция ТК в них свидетельствуют об относительной безопасности исследуемых частиц.

Список литературы / References

1. Баглай Е.О., Дубиков А.И. Тучные клетки – ключевые участники патогенеза иммуновоспалительных заболеваний // Научно-практическая ревматология, 2015. Т. 53, № 2. С. 182-189. [Baglay E.O., Dubikov A.I. Mast cells are key participants in the pathogenesis of immunoinflammatory diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2015, Vol. 53, no. 2, pp. 182-189. (In Russ.)]
2. Гусельникова В.В., Полевщиков А.В. Тучные клетки тимуса: на перекрестке трех дорог // Иммунология, 2021. Т. 42, № 4. С. 327-336. [Guselnikova V.V., Polevshchikov A.V. Exact thymus cells: at the crossroads of three roads. *Immunologiya = Immunologiya*, 2021, Vol. 42, no. 4, pp. 327-336. (In Russ.)]
3. Цибулькина В.Н., Цибулькин Н.А. Тучная клетка как полифункциональный элемент иммунной системы // Аллергология и иммунология в педиатрии, 2017. Т. 49, № 2. С. 4-11. [Tsibulkin V.N., Tsibulkin N.A. Mast cell as a multifunctional element of the immune system. *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Pediatrics*, 2017, Vol. 49, no. 2, pp. 4-11. (In Russ.)]
4. Юшков Б.Г., Арташян О.С., Медведова С.Ю., Бызов И.В., Уймин М.А., Ермаков А.Е., Быкова М.Ю., Петрова И.М. Оценка биораспределения функционализированных наночастиц со структурой «магнитное ядро – углеродная оболочка» при системном способе введения // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015. Т. 159, № 4. С. 495-499. [Yushkov B.G., Artashyan O.S., Medvedeva S.Yu., Byzov I.V., Ujmin M.A., Ermakov A.E., Bykova M.Yu., Petrova I.M. Evaluation of biodistribution of functionalized magnetic core/carbon-shell nanoparticles in systemic method of administration. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015. Vol. 159, no. 4, pp. 498-501. (In Russ.)]
5. Юшков Б.Г., Черешнев В.А., Климин В.Г., Арташян О.С. Тучные клетки. Физиология и патофизиология. М.: Медицина, 2011. 237 с. [Yushkov B.G., Chereshev V.A., Klimin V.G., Artashyan O.S. Mast cells. *Physiology and pathophysiology*]. Moscow: Meditsina, 2011. 237 p.
6. Collington S.J., Williams T.J., Weller C.L. Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. *J. Trends Immunol.*, 2011, Vol. 32, no. 10, pp. 478-485.
7. De Filippo K., Dudeck A., Hasenberg M., Nye E., van Rooijen N., Hartmann K., Gunzer M., Roers A., Hogg N. Mast cell and Macrophage Chemokines CXCL1/CXCL2 Control the Early Stage of Neutrophil Recruitment during Tissue Inflammation. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 24, pp. 4930-4937.
8. Hui Y., Yi X., Hou F., Wibowo D., Zhang F., Zhao D., Gao H., Zhao C.X. Role of nanoparticle mechanical properties in cancer drug delivery. *ACS Nano*, 2019. Vol. 13, no. 7, pp. 7410-7424.
9. Kalesnikoff J., Galli S.J. New Developments in Mast Cell Biology. *Nat. Immunol.*, 2008, Vol. 9, pp. 1215-1223.
10. Krystal-Whittemore M., Dileepan K.N., Wood J.G. Mast cell: a multifunctional master cell. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 6, 620. doi: 10.3389/fimmu.2015.00620.
11. Lampiasi N. Interactions between Macrophages and Mast Cells in the Female Reproductive System. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 10, pp. 5414-5439.

12. Mittal A., Sagi V., Gupta M., Gupta K. Mast cell neural interactions in health and disease. *Front. Cell. Neurosci.*, 2019, Vol. 13, 110. doi: 10.3389/fncel.2019.00110.
13. Olivera A., Beaven M. A., Metcalfe D. D. Mast cells signal their importance in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 142, no. 2, pp. 381-393.
14. Siebenhaar F., Redegeld F. A., Bischoff S. C., Gibbs B.F., Maurer M. Mast cells as drivers of disease and therapeutic targets. *J. Trends Immunol.*, 2018, Vol. 39, no. 2, pp. 151-162.
15. Zaman R., Hamidzada H., Kantores C., Wong A., Dick S., Wang Y., Momen A., Aronoff L., Lin J., Razani B., Mital S., Billia F., Lavine K., Nejat S., Epelman S. Selective loss of resident macrophage-derived insulin-like growth factor-1 abolishes adaptive cardiac growth to stress crystal. *J. Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 14, pp. 2057-2071.

Авторы:

Арташян О.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Храмцова Ю.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Власова А.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Тюменцева Н.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Юшков Б.Г. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Artashyan O.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Khramtsova Yu.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Vlasova A.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Tyumentseva N.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Yushkov B.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 02.04.2024

Отправлена на доработку 06.04.2024

Принята к печати 18.04.2024

Received 02.04.2024

Revision received 06.04.2024

Accepted 18.04.2024

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУННОГО ОТВЕТА ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЖЕНЩИН С ФИБРОАДЕНОМОЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Курмышкина О.В., Куликовская Т.М., Волкова Т.О.

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Россия

Резюме. Изменения иммунного статуса при фиброаденоме (ФА) и других доброкачественных патологиях молочной железы — малоисследованный вопрос, равно как и участие регуляторов контрольных точек иммунного ответа (КИТ) в патогенезе данной группы заболеваний. Целью работы являлось сравнение уровня экспрессии маркеров КИТ CD279/PD-1, CD274/PD-L1, CD366/TIM3 и CD223/LAG3 в общей популяции лимфоцитов, ее Т-клеточного звена и, в отдельности, CD4 и CD8 субпопуляций в периферической крови женщин с ФА и здоровых доноров. Образцы периферической крови были получены от 12 женщин с диагнозом фиброаденома молочной железы (23-54 лет) и 15 здоровых женщин (22-52 лет), составивших группу контроля. Забор крови в группе больных производился непосредственно перед хирургической операцией, далее образцы анализировались методом мультипараметрической проточной цитометрии с использованием моноклональных антител: CD3-VioBlue, CD4/CD8-FITC, PD1-PE, PD-L1-PerCP-Cy5.5, TIM3/LAG3-APC. Каждый образец инкубировался с 4 комбинациями антител: CD3/CD4/PD1/PD-L1/TIM3, CD3/CD4/PD1/PD-L1/LAG3, CD3/CD8/PD1/PD-L1/TIM3, CD3/CD8/PD1/PD-L1/LAG3. Была проведена оценка моноэкспрессии каждого из 4-х маркеров контрольных иммунных точек (КИТ) в лимфоцитарном гейте обеих групп. В образцах крови группы ФА получено значимое увеличение экспрессии PD-L1, выраженной в % окрашенных клеток и приросте интенсивности флуоресценции. При анализе моноэкспрессии КИТ в популяции CD3⁺Т-лимфоцитов, кроме достоверного увеличения % PD-L1⁺, также обнаружено повышение доли PD1⁺Т-клеток в группе ФА. В отношении различий между изменениями моноэкспрессии КИТ в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточном звене, в группе ФА наблюдалось более выраженное увеличение доли CD8⁺PD1⁺Т-клеток, по сравнению с CD4. Характер изменений PD-L1 был сопоставим для CD4 и CD8 субпопуляций (в обоих случаях достоверное увеличение в группе ФА). Были проанализированы изменения профиля коэкспрессии двух КИТ в CD4⁺ и CD8⁺ звене Т-клеток. Наиболее заметным оказалось увеличение частоты фенотипа PD1⁺PD-L1⁺ в обеих субпопуляциях Т-клеток при сравнении ФА и группы контроля. В отношении совместной экспрессии трех маркеров КИТ в CD4 и CD8 субпопуляциях, было получено достоверное увеличение %-доли PD1⁺PD-L1⁺TIM3⁺ клеток среди CD4

Адрес для переписки:

Курмышкина Ольга Вадимовна
ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный
университет»
185910, Россия, г. Петрозаводск,
пр. Ленина, 33.
Тел.: 8 (8142) 78-46-97.
E-mail: VolkovaTO@yandex.ru

Address for correspondence:

Olga V. Kurmyshkina
Petrozavodsk State University
33 Lenin St
Petrozavodsk
185910 Russian Federation
Phone: +7 (8142) 78-46-97.
E-mail: VolkovaTO@yandex.ru

Образец цитирования:

О.В. Курмышкина, Т.М. Куликовская, Т.О. Волкова
«Экспрессия маркеров контрольных точек иммунного
ответа лимфоцитами периферической крови у женщин
с фиброаденомой молочной железы» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 975-982.
doi: 10.15789/1563-0625-EOI-16894

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

For citation:

O.V. Kurmyshkina, T.M. Kulikovskaya, T.O. Volkova
“Expression of immune checkpoint markers in peripheral
blood lymphocytes of women with fibroadenoma of the breast”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 5, pp. 975-982.
doi: 10.15789/1563-0625-EOI-16894

© Kurmyshkina O.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOI-16894

Т-хелперов. Таким образом, в системной циркуляции женщин с диагнозом ФА могут наблюдаться специфические изменения фенотипа Т-клеток, связанные с (ко-)экспрессией регуляторов КИТ.

Ключевые слова: фиброаденома молочной железы, контрольные точки иммунного ответа, лимфоциты периферической крови, проточная цитометрия, коэкспрессия, иммунорегуляция

EXPRESSION OF IMMUNE CHECKPOINT MARKERS IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF WOMEN WITH FIBROADENOMA OF THE BREAST

Kurmyshkina O.V., Kulikovskaya T.M., Volkova T.O.

Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation

Abstract. Changes of the immune state in patients with fibroadenoma (FA) or other benign lesions of the breast, as well as the involvement of immune checkpoints in pathogenesis of these lesions, remain underexplored. The aim of this study was to compare the expression level of the key immune checkpoint markers CD279/PD-1, CD274/PD-L1, CD366/TIM3, and CD223/LAG3 in total circulating lymphocytes, T cell population as well as in its CD4 and CD8 subsets in peripheral blood from women with breast FA and healthy controls. Blood samples were taken from 12 women diagnosed with FA of the breast (aged 23-54 years, FA group) and 15 healthy women (aged 22-52 years, control group). Sample uptake was performed immediately before surgery, and samples were further analyzed by multicolor flow cytometry using monoclonal antibodies CD3-VioBlue, CD4/CD8-FITC, PD1-PE, PD-L1-PerCP-Cy5.5, and TIM3/LAG3-APC. Each sample was incubated with 4 antibody combinations: CD3/CD4/PD1/PD-L1/TIM3, CD3/CD4/PD1/PD-L1/LAG3, CD3/CD8/PD1/PD-L1/TIM3, and CD3/CD8/PD1/PD-L1/LAG3. First, mono-expression of each of the 4 immune checkpoint markers was evaluated in the lymphocyte gate from both investigated groups. In FA samples, a significant increase in PD-L1 expression (assessed as percent of positive cells and fluorescence intensity change) was observed. Regarding expression of immune checkpoints in CD3⁺ T cells, along with significantly increased %PD-L1⁺, elevated numbers of PD1⁺T cells were detected. As for the differences in immune checkpoint expression changes between CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets, FA patient group demonstrated a more prominent increase in the amount of CD8⁺PD1⁺T cells relative to CD4 subset. The profiles of PD-L1 changes in CD4 and CD8 subpopulations were comparable showing, in both cases, a significant increase in FA sample group. We also analyzed changes in co-expression of any two immune checkpoint markers in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. The most noticeable was an increase in the prevalence of PD1⁺PD-L1⁺ phenotype in both T cell subpopulations from FA patients compared to the controls. With respect to co-expression of 3 checkpoint markers in CD4⁺ and CD8⁺ T cells, a significant increase in the percentage of PD1⁺PD-L1⁺TIM3⁺ cells among CD4 T helpers was found in FA. Thus, specific changes of T cell phenotype related to (co-)expression of immune checkpoint regulators may occur in systemic circulation of women with breast FA.

Keywords: fibroadenoma of the breast, immune checkpoints, peripheral blood lymphocytes, flow cytometry, co-expression, immune regulation

Введение

Изменения иммунного статуса при фиброаденоме (ФА) и других доброкачественных патологиях молочной железы – малоисследованный вопрос. Как правило, фиброаденома служит контролем в исследованиях различных аспектов молекулярного патогенеза рака молочной железы, включая особенности иммунного микроокружения опухоли или циркулирующих маркеров иммунного ответа, но не рассматривается как

самостоятельная проблема ввиду доминирующей концепции о гормональной этиологии фиброэпителиальных заболеваний. Однако многие авторы отмечают, что патогенетические механизмы ФА остаются в целом неясны [2], что в ряде случаев осложняет дифференциальную диагностику и прогнозирование рисков. В то же время, исходя из представлений об иммуно-эндокринных взаимодействиях, можно допустить вовлечение иммунной системы в развитие ФА. Кроме того, для фиброэпителиальных опухолей установлен

профиль рекуррентных aberrаций в генах важных протоонкогенов и опухолевых супрессоров [6], что предполагает появление неоантигенов и наличие контроля со стороны иммунитета [9].

Ряд недавних работ указывает на наличие локальных и системных изменений показателей иммунного ответа у больных с ФА. Например, обнаружены отклонения в %-ном содержании инфильтрирующих CD4/CD8 Т-лимфоцитов и антиген-презентирующих клеток по сравнению с нормальной тканью молочной железы, вероятно свидетельствующие о нарушениях в системе иммунологического надзора [1, 7]. Немногочисленные транскриптомные исследования доброкачественных опухолей сообщают об участии иммуно-ассоциированных сигнальных путей [5, 10]. Локальные отклонения могут находить отражение и в изменении фенотипических характеристик циркулирующих лимфоцитов, а также иммунологических показателей плазмы крови. В частности, протеомный анализ плазмы больных с ФА и другими доброкачественными поражениями выявил изменения, связанные с сигнальными путями врожденного звена иммунного ответа [8]. Описаны также данные об изменениях транскриптома клеток периферической крови при различных патологиях молочной железы высокого риска (в том числе, фиброаденоме), часть которых затрагивает иммунные регуляторные механизмы [4].

В настоящее время особый интерес связан с маркерами контрольных точек иммунного ответа, их экспрессией в различных популяциях лимфоцитов и возможностями их клинического применения, поскольку они могут отражать статус как активации клеточного иммунитета, так и его истощения (иммуносупрессии), что может влиять на прогноз заболевания. Для ФА молочной железы было показано существенное увеличение экспрессии PD-1 в популяции циркулирующих Т-регуляторных клеток (при отсутствии значимых изменений их численности) [3], однако, в отношении других иммунных «чекпойнтов» какие-либо экспериментальные данные отсутствуют. **Целью данной работы** являлось сравнение уровня экспрессии маркеров CD279/PD-1, CD274/PD-L1, CD366/TIM3 и CD223/LAG3 в общей популяции лимфоцитов, ее Т-клеточного звена и, в отдельности, CD4 и CD8 субпопуляций в периферической крови женщин с ФА и здоровых доноров методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

Образцы периферической крови были получены от 12 женщин с диагнозом фиброаденома молочной железы (23–54 лет, средний возраст 35,8

лет), проходивших лечение в ЧУЗ «КБ «РЖД-Медицина» г. Петрозаводска, а также от 15 здоровых женщин (22–52 лет, средний возраст 38,6 лет), составивших группу контроля. Забор крови в группе больных производился непосредственно перед хирургической операцией в пробирки с цитратом натрия, далее образцы анализировались методом проточной цитометрии (MACS Quant Analyzer) с использованием моноклональных антител к лимфоцитарным маркерам и контрольным иммунным точкам: CD3-VioBlue, CD4/CD8-FITC, PD1-PE, PD-L1-PerCP-Cy5.5, TIM3/LAG3-APC (BioLegend). Каждый образец инкубировался с 4 комбинациями антител: CD3/CD4/PD1/PD-L1/TIM3, CD3/CD4/PD1/PD-L1/LAG3, CD3/CD8/PD1/PD-L1/TIM3, CD3/CD8/PD1/PD-L1/LAG3 (общая схема гейтинга показана на рисунке 1). Границы гейтов для негативно окрашенных клеточных популяций устанавливали по Fluorescence Minus One (FMO) контролю. Статистическая значимость наблюдаемых изменений оценивалась с помощью непараметрического W-критерия Уилкоксона–Манна–Уитни (различия между сравниваемыми группами полагали достоверными при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

На первом этапе анализа была проведена оценка моноэкспрессии каждого из 4-х маркеров контрольных иммунных точек (КИТ) в лимфоцитарном гейте обеих групп. Как показано на рисунке 2А, в образцах крови группы ФА получено значимое увеличение доли PD-L1 позитивных лимфоцитов; однако, необходимо отметить, что несмотря на высокий % PD-L1⁺ клеток в группе ФА, уровень флуоресцентного сигнала характеризовался не дискретным, а слабым непрерывным изменением, поэтому различие между двумя группами по уровню экспрессии PD-L1 было оценено по приросту интенсивности флуоресценции, для которого также получено значимое увеличение. Заметная тенденция к увеличению относительной численности PD1⁺ и TIM3⁺ лимфоцитов также наблюдалась в группе ФА, но достоверность этих изменений не подтвердилась.

При анализе моноэкспрессии КИТ в популяции CD3⁺ Т-лимфоцитов, кроме достоверного увеличения % PD-L1⁺, также обнаружено повышение доли PD1⁺ Т-клеток в группе ФА (рис. 2Б). Наблюдаемое увеличение относительной численности TIM3⁺ и LAG3⁺ Т-клеток не было статистически значимым, и также можно отметить, что в CD3⁺-гейте частота TIM3⁺ клеток резко снижалась по сравнению с суммарной популяцией лимфоцитов (т.е. значительная часть связыва-

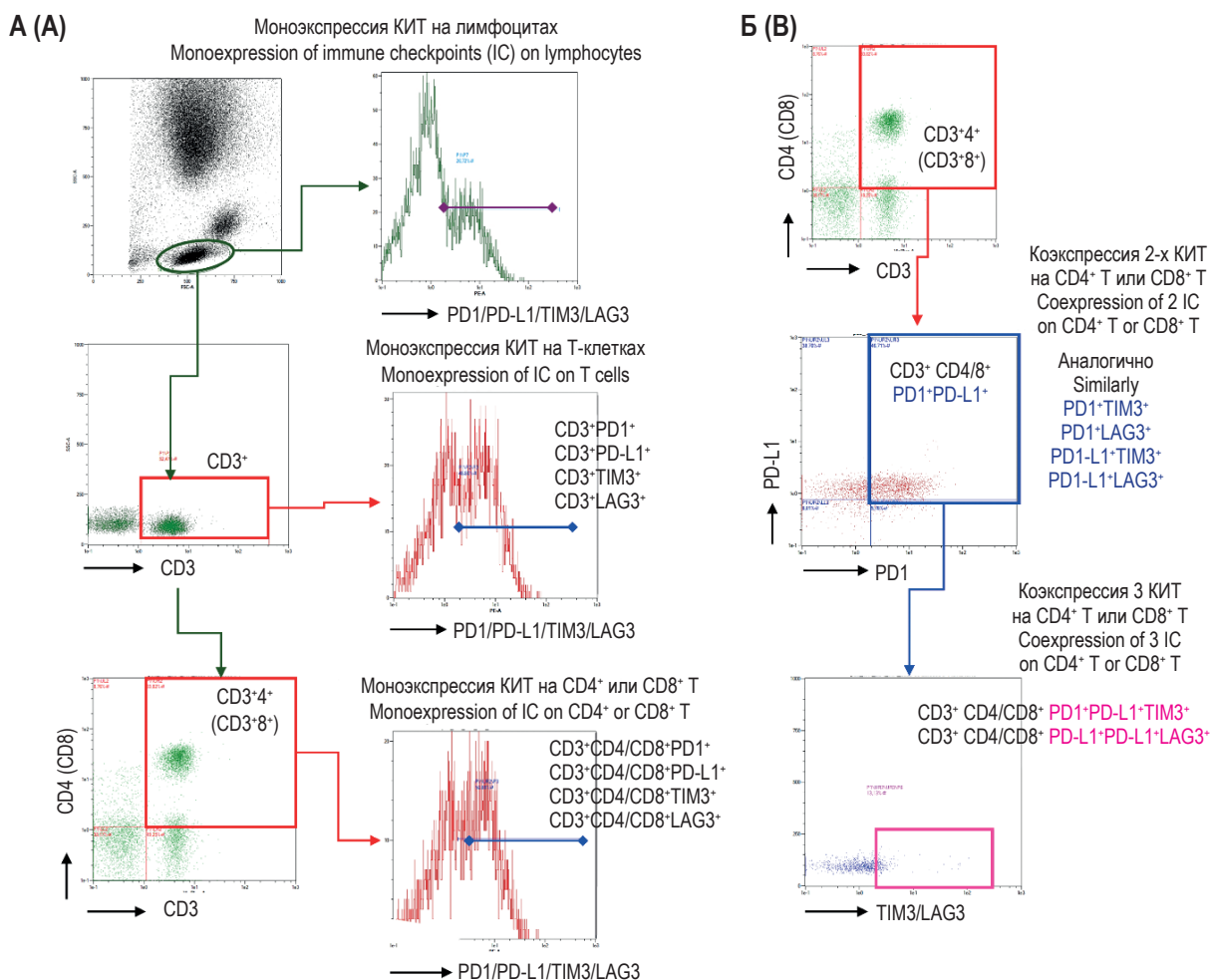


Рисунок 1. Схема анализа моноэкспрессии (А) и коэкспрессии (Б) маркеров контрольных иммунных точек (КИТ) на суммарной популяции лимфоцитов, Т-лимфоцитах и их CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляциях

Figure 1. The gating strategy used to analyze mono-expression (A) and co-expression (B) of immune checkpoint markers in total lymphocytes, T cell population, and its CD4⁺ and CD8⁺ subsets

ния анти-TIM3 антител была обусловлена CD3-негативными не-Т-клетками).

В отношении различий между изменениями моноэкспрессии КИТ в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточном звене, в группе ФА наблюдалось более выраженное увеличение доли CD8⁺PD1⁺Т-клеток, по сравнению с CD4, однако, оно не достигло порогового уровня значимости. Характер изменений PD-L1 был сопоставим для CD4 и CD8 субпопуляций (в обоих случаях достоверное увеличение в группе ФА при $p < 0,05$). Тенденции к увеличению % LAG3 и TIM3 сохранялись и были сопоставимы для CD4 и CD8, но не были статистически значимыми. Содержание самих CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток не различалось между группами, хотя отмечалось общее снижение количества Т-лимфоцитов в группе ФА.

Важным в функциональном отношении является не столько экспрессия какого-либо маркера КИТ сама по себе, сколько совместная экспрессия двух или более маркеров. В связи с этим, были проанализированы изменения профиля коэкспрессии двух КИТ (во всех возможных комбинациях) в CD4⁺ и CD8⁺ звене Т-клеток. Наиболее выраженное изменение при сравнении ФА и группы контроля было получено для фенотипа PD1⁺PD-L1⁺ (рис. 3А). Оно было достоверным для обеих популяций Т-клеток (и в случае CD8 оказалось даже более выраженным), причем количество CD4/8 Т-клеток с фенотипом PD1⁺PD-L1⁻ снижалось в группе ФА фактически до нулевых значений (в особенности в случае CD8), т.е. экспрессия PD1 становилась полностью ассоциированной с PD-L1 (рис. 3А). Заметным было также увеличение частоты CD4

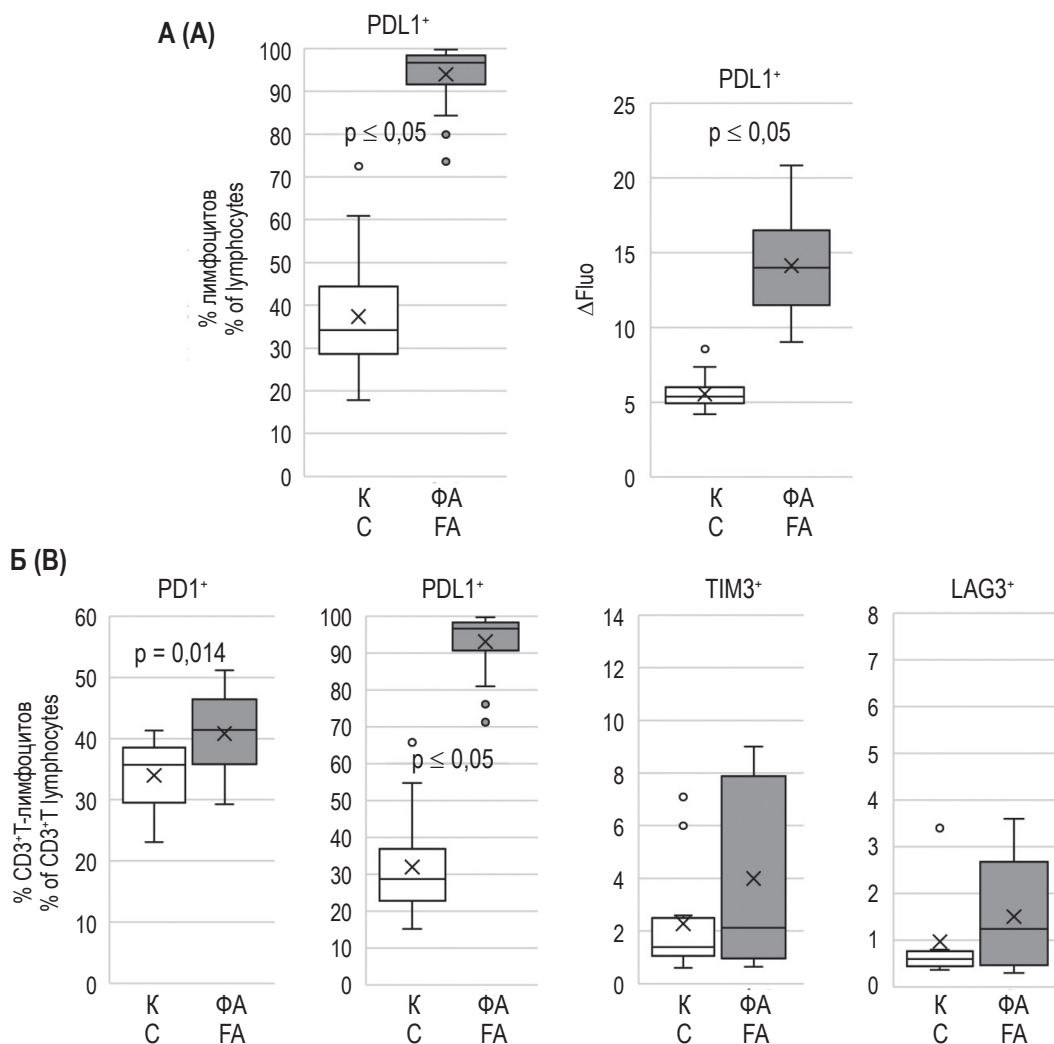


Рисунок 2. Моноэкспрессия маркеров КИТ в общей популяции циркулирующих лимфоцитов (А) и Т-клеток (Б) в периферической крови здоровых доноров (К) и больных с фиброаденомой (ФА)

Примечание. Значения p на гистограммах приведены в соответствии с двусторонним W -тестом. Прирост интенсивности флуоресценции (Δ Fluo) определялся по формуле $[\text{MeanFluo}(\text{PD-L1}) - \text{MeanFluo}(\text{auto})] / \text{MeanFluo}(\text{auto})$, где $\text{MeanFluo}(\text{PD-L1})$ – средняя интенсивность флуоресцентного сигнала окрашенных клеток, $\text{MeanFluo}(\text{auto})$ – интенсивность автофлуоресценции клеток.

Figure 2. Expression of immune checkpoint markers in total population of circulating lymphocytes (A) and T cells (B) in peripheral blood of healthy controls and patients with fibroadenoma (FA)

Note. In histograms, p -values correspond to the two-sided W -test. Fluorescence intensity increase (Δ Fluo) was calculated as $[\text{MeanFluo}(\text{PD-L1}) - \text{MeanFluo}(\text{auto})] / \text{MeanFluo}(\text{auto})$, where $\text{MeanFluo}(\text{PD-L1})$ is mean fluorescence intensity of stained cells, and $\text{MeanFluo}(\text{auto})$ is cell autofluorescence intensity.

и CD8 Т-клеток с фенотипом PD1⁺TIM3⁺ и PD-L1⁺TIM3⁺ при ФА, однако достоверность различий подтверждена только для CD4⁺PD-L1⁺TIM3⁺ Т-лимфоцитов (рис. 3Б, В). Межгрупповые различия в коэкспрессии PD1⁺LAG3⁺ и PD-L1⁺LAG3⁺ не достигли порогового уровня значимости как в случае CD4 Т-клеток, так и CD8 (рис. 3В). Также можно отметить, что экспрессия TIM3 и LAG3 была полностью ассоциирована с PD-L1, и в то же время эта ассоциация была не полной в случае PD-1 (т.е. в группе ФА выявлял-

ся определенный % Т-клеток с фенотипами PD1⁺TIM3⁺ и PD1⁺LAG3⁺). В целом характер изменений коэкспрессии был сопоставимым для CD4 и CD8 популяций Т-клеток.

Мы оценили возможность совместного обнаружения трех маркеров КИТ в CD4 и CD8 субпопуляциях, т.е. изменения численности клеток с фенотипами PD1⁺PD-L1⁺TIM3⁺ и PD1⁺PD-L1⁺LAG3⁺. Было получено достоверное увеличение %-доли PD1⁺PD-L1⁺TIM3⁺ клеток среди CD4 Т-хелперов, аналогичное увеличение в зве-

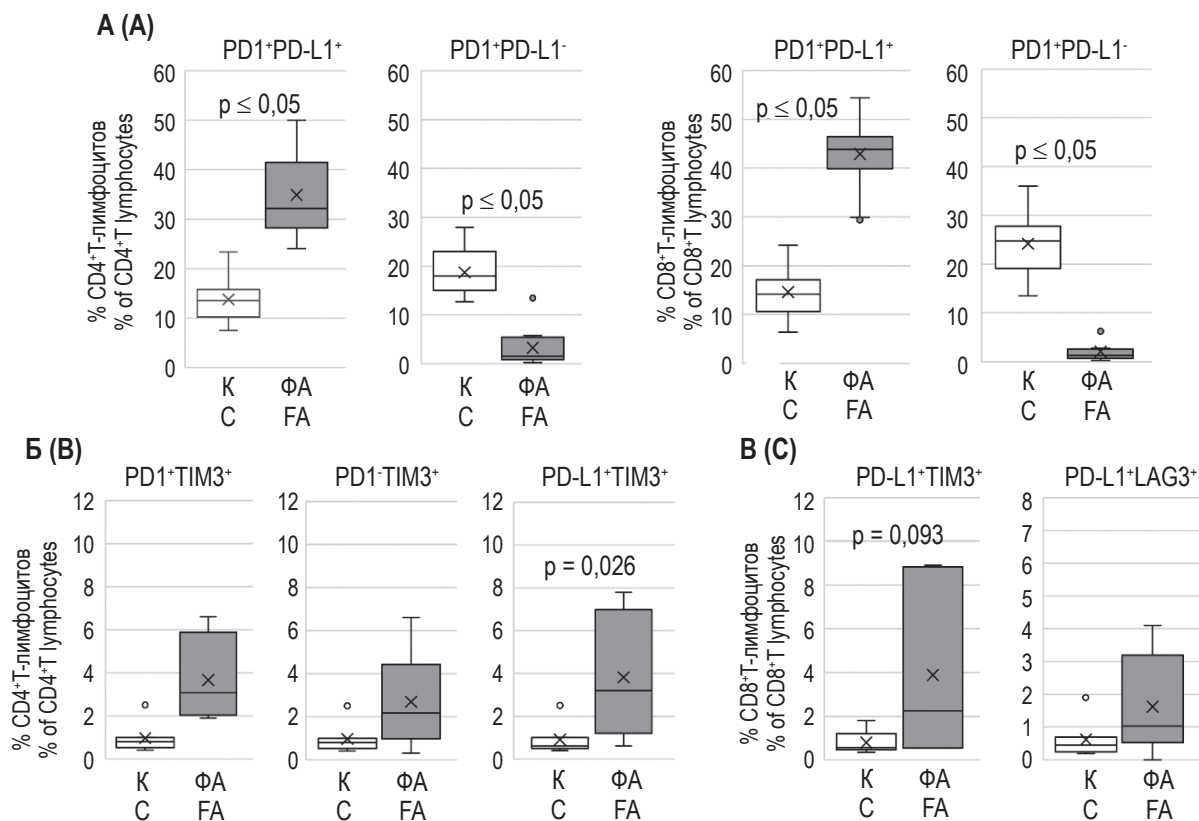


Рисунок 3. Изменения коэкспрессии пар маркеров КИТ в популяциях CD4 и CD8 Т-клеток в периферической крови здоровых доноров (К) и больных с фибroadеномой (ФА)

Примечание. Значения p на гистограммах приведены в соответствии с двусторонним W -тестом.

Figure 3. Changes in co-expression of pairs of immune checkpoint markers in CD4 and CD8 T cell subsets from peripheral blood of healthy controls and fibroadenoma (FA) patients

Note. In histograms, p -values correspond to the two-sided W -test.

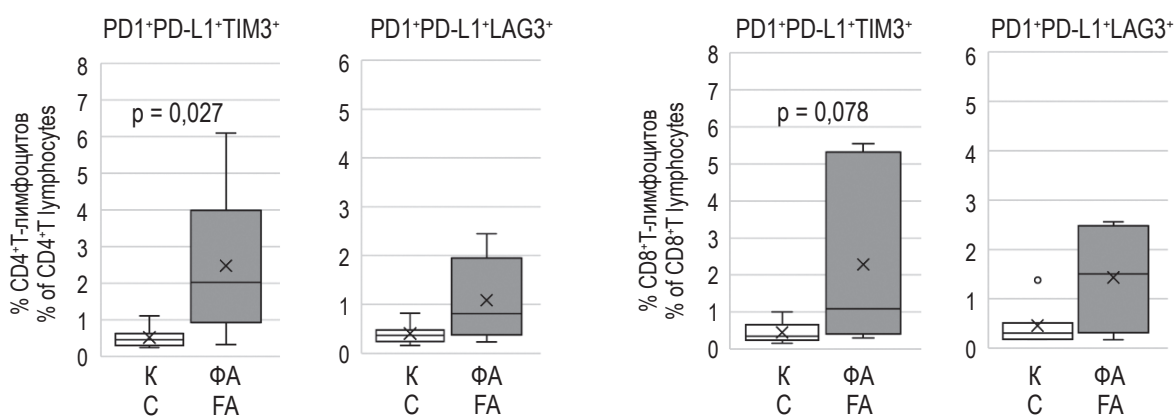


Рисунок 4. Изменения коэкспрессии трех маркеров КИТ в популяциях CD4 и CD8 Т-клеток в периферической крови здоровых доноров (К) и больных с фибroadеномой (ФА)

Примечание. Значения p на гистограммах приведены в соответствии с двусторонним W -тестом.

Figure 4. Changes in co-expression of three immune checkpoint markers in CD4 and CD8 T-cell subsets from peripheral blood of healthy controls and fibroadenoma (FA) patients

Note. In histograms, p -values correspond to the two-sided W -test.

не цитотоксических Т-клеток не достигло уровня значимости (рис. 4). Также можно отметить, что если в группе контроля CD4 или CD8 Т-клетки с фенотипом PD1⁺PD-L1⁺LAG3⁺ фактически отсутствовали (их доля не превышала 1% от численности соответствующей субпопуляции), то в группе ФА они фиксировались в системной циркуляции в более заметном количестве, однако, эти значения не достигли уровня достоверности.

Мы также обратили внимание на то, что % связывания анти-PD-L1 антител в пробе различается в зависимости от присутствия анти-TIM3/анти-LAG3 антител: в случае совместного инкубирования с анти-TIM3, % PD-L1⁺ клеток был заметно ниже, чем в случае анти-LAG3 (данные не показаны), что может указывать на колокализацию PD-L1 и TIM3 на клеточной поверхности (и, соответственно, возникающие при этом стерические затруднения) и дополнительно подтверждает ассоциированность экспрессии этих

двух маркеров, усиливающуюся при развитии патологии.

Заключение

Из результатов проведенного цитометрического анализа следует, что в системной циркуляции женщин с диагнозом ФА могут наблюдаться специфические изменения фенотипа Т-клеток, связанные с (ко-)экспрессией регуляторов КИТ. Более того, возможно увеличение представленности CD4 и CD8 Т-клеток, позитивных одновременно по трем КИТ. Изменения, фиксируемые в составе циркулирующих лимфоцитов, могут являться отражением более существенных отклонений на локальном уровне, и понимание функциональной значимости этих изменений в отношении иммунного статуса и патогенеза ФА нуждается в дальнейших молекулярно-генетических и иммунологических исследованиях.

Список литературы / References

1. Adhikary S., Hoskin T.L., Stallings-Mann M.L., Arshad M., Frost M.H., Winham S.J., Peña A., Lee D.J., Murphy L.M., Rakoff M. Cytotoxic T cell depletion with increasing epithelial abnormality in women with benign breast disease. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2020, Vol. 180, no. 1, pp. 55-61.
2. Chen Z., Zhang Y., Li W., Gao C., Huang F., Cheng L., Jin M., Xu X., Huang J. Single cell profiling of female breast fibroadenoma reveals distinct epithelial cell compositions and therapeutic targets. *Nat. Commun.*, 2023, Vol. 14, no. 1, 3469. doi: 10.1038/s41467-023-39059-3.
3. Guan H., Wan Y., Lan J., Wang Q., Wang Z., Li Y., Zheng J., Zhang X., Wang Z., Shen Y., Xie F. PD-L1 is a critical mediator of regulatory B cells and T cells in invasive breast cancer. *Sci. Rep.*, 2016, no. 6, 35651. doi: 10.1038/srep35651.
4. Hou H., Lyu Y., Jiang J., Wang M., Zhang R., Liew C.C., Wang B., Cheng C. Peripheral blood transcriptome identifies high-risk benign and malignant breast lesions. *PLoS One*, 2020, Vol. 15, no. 6, e0233713. doi: 10.1371/journal.pone.0233713.
5. Li X., Vail E., Maluf H., Chaum M., Leong M., Lownik J., Che M., Giuliano A., Cao D., Dadmanesh F. Gene Expression Profiling of Fibroepithelial Lesions of the Breast. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 10, 9041. doi: 10.3390/ijms24109041.
6. Md Nasir N.D., Ng C.C.Y., Rajasegaran V., Wong S.F., Liu W., Ng G.X.P. International Fibroepithelial Consortium; Tan P., Teh B.T., Tan P.H. Genomic characterisation of breast fibroepithelial lesions in an international cohort. *J. Pathol.*, 2019, Vol. 249, no. 4, pp. 447-460.
7. Ogony J., Hoskin T.L., Stallings-Mann M., Winham S., Brahmabhatt R., Arshad M.A., Kannan N., Peña A., Allers T., Brown A. Immune cells are increased in normal breast tissues of BRCA1/2 mutation carriers. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2023, Vol. 197, no. 2, pp. 277-285.
8. Sinha I., Fogle R.L., Gulfidan G., Stanley A.E., Walter V., Hollenbeak C.S., Arga K.Y., Sinha R. Potential Early Markers for Breast Cancer: A Proteomic Approach Comparing Saliva and Serum Samples in a Pilot Study. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 4, 4164. doi: 10.3390/ijms24044164.

9. Winham S.J., Wang C., Heinzen E.P., Bhagwate A., Liu Y., McDonough S.J., Stallings-Mann M.L., Frost M.H., Vierkant R.A., Denison L.A. Somatic mutations in benign breast disease tissues and association with breast cancer risk. *BMC Med. Genomics.*, 2021, Vol. 14, no. 1, 185. doi: 10.1186/s12920-021-01032-8.

10. Yin Lee J.P., Thomas A.J., Lum S.K., Shamsudin N.H., Hii L.W., Mai C.W., Wong S.F., Leong C.O. Gene expression profiling of giant fibroadenomas of the breast. *Surg. Oncol.*, 2021, no. 37, 101536. doi: 10.1016/j.suronc.2021.101536.

Авторы:

Курмышкина О.В. — к.б.н., доцент кафедры биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Россия

Куликовская Т.М. — к.м.н., доцент кафедры общей и факультетской хирургии ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Россия

Волкова Т.О. — д.б.н., доцент, заведующая кафедрой биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Россия

Authors:

Kurmyshkina O.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biomedical Chemistry, Immunology, and Laboratory Diagnostics, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation

Kulikovskaya T.M., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Faculty Surgery, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation

Volkova T.O., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Biomedical Chemistry, Immunology, and Laboratory Diagnostics, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation

Поступила 02.04.2024
Отправлена на доработку 04.04.2024
Принята к печати 23.04.2024

Received 02.04.2024
Revision received 04.04.2024
Accepted 23.04.2024

ЭКСПРЕССИЯ CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, CD14⁺CD11b⁺ РЕЦЕПТОРОВ И УРОВЕНЬ sIgA, У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ, С *K. PNEUMONIAE*

**Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Устюжанин А.В., Маханёк А.А.,
Кадочникова П.А., Абакарова Д.А.**

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества»
Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. *K. pneumoniae* является одним из лидирующих микроорганизмов, вызывающих госпитальную инфекцию среди недоношенных новорожденных. Неэффективность иммунной защиты, связанной с морфофункциональной незрелостью детей, рожденных преждевременно, длительность госпитализации и инвазивные процедуры создают предпосылки для реализации инфекционного процесса в условиях стационара. Вопрос о причинах развития инфекции, этиологический агент которых колонизирует кишечник, остается открытым. Цель исследования: оценить экспрессию рецепторов CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, CD14⁺CD11b⁺ на моноцитах крови и уровень sIgA в копрофильтрах у недоношенных детей, при колонизации кишечника *K. pneumoniae* с различным генетическим профилем. Обследовано 11 детей с геном *uce* (1-я группа), 20 новорожденных с генами *uce* + *fim* (2-я группа) и 12 детей с комбинацией генов *kfu* + *uce* + *fim*. Микробиологическое исследование фекалий, включало идентификацию выделенных микроорганизмов, определение их антибиотикочувствительности. Детекция генов *uce*, *fim* и *kfu* в штаммах *K. pneumoniae* проводилась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Методом проточной цитометрии определяли процентное и абсолютное количество моноцитов с оценкой уровня экспрессии рецепторов активации. Гестационный возраст у недоношенных детей с *K. pneumoniae* не отличался, антропометрические показатели были сопоставимы. Установлено, что дети, с идентификацией гена *fim* в сочетании с другими генами чаще всего выписывались домой с *K. pneumoniae*, чем с изолированным геном *uce*. В этих же группах детей, регистрировалось снижение уровня экспрессии рецепторов CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺CD11b⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, как при рождении, так и по достижении постконцептуального возраста 37-40 недель и низкое содержание sIgA в копрофильтрах на протяжении 24 суток жизни. Таким образом, снижение экспрессии рецепторов CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺CD282⁺ и CD14⁺HLA-DR⁺ моноцитами крови и недостаточность продук-

Адрес для переписки:

Ремизова Ирина Ивановна
ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт
охраны материнства и младенчества» Министерства
здравоохранения РФ
620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 1.
Тел.: 8 (982) 627-95-36.
E-mail: RemizovaII@yandex.ru

Address for correspondence:

Irina I. Remizova
Ural Research Institute for Maternal and Child Care
1 Repin St
Yekaterinburg
620028 Russian Federation
Phone: +7 (982) 627-95-36.
E-mail: RemizovaII@yandex.ru

Образец цитирования:

Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, А.В. Устюжанин,
А.А. Маханёк, П.А. Кадочникова, Д.А. Абакарова
«Экспрессия CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺,
CD14⁺HLA-DR⁺, CD14⁺CD11b⁺ рецепторов и уровень
sIgA, у недоношенных детей, с *K. pneumoniae*»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5.
С. 983-992. doi: 10.15789/1563-0625-EOC-16944

© Чистякова Г.Н. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

G.N. Chistyakova, I.I. Remizova, A.V. Ustyuzhanin,
A.A. Makhanyok, P.A. Kadochnikova, D.A. Abakarova
“Expression of CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺,
CD14⁺HLA-DR⁺, CD14⁺CD11b⁺ receptors and sIgA level in
premature infants with *K. pneumoniae*”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5,
pp. 983-992.
doi: 10.15789/1563-0625-EOC-16944

© Chistyakova G.N. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EOC-16944

ции sIgA в толстом кишечнике обуславливают продолжительный период колонизации штаммов *K. pneumoniae* с наличием гена *fim* в комбинации с другими генами (от 15 до 180 суток), а также возможность реализации клебсилезной инфекции в последующие периоды жизни ребенка. Значительно чаще дети с комбинацией генов *uge + fim* и *kfu + uge + fim* выписывались из стационара с диагнозом «анемия», только в этих группах детей регистрировалось развитие бронхо-легочной дисплазии.

Ключевые слова: недоношенные новорожденные, структура заболеваемости, гены вирулентности *K. pneumoniae*, колонизация кишечника, функциональная активность моноцитов, sIgA

EXPRESSION OF CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, CD14⁺CD11b⁺ RECEPTORS AND sIgA LEVEL IN PREMATURE INFANTS WITH *K. PNEUMONIAE*

Chistyakova G.N., Remizova I.I., Ustyuzhanin A.V., Makhanyok A.A., Kadochnikova P.A., Abakarova D.A.

Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. *K. pneumoniae* is one of the leading microorganisms causing nosocomial infections among premature newborns. The ineffectiveness of immune defense, morphofunctional immaturity, length of hospitalization and invasive procedures create the prerequisites for the implementation of the infectious process in a hospital setting. The question of the reasons for the development of infection, the etiological agent of which colonizes the intestines, remains open. Purpose of the study: to evaluate the expression of CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, and CD14⁺CD11b⁺ receptors on blood monocytes and the level of sIgA in coprofiltrates in premature infants with intestinal colonization by *K. pneumoniae* with different genetic profiles. We examined 11 children with the *uge* gene (group 1), 20 newborns with the *uge + fim* genes (group 2), and 12 children with the *kfu + uge + fim* genes. Microbiological examination of feces included identification and antibiotic sensitivity of microorganisms. Detection of the *uge*, *fim* and *kfu* genes in *K. pneumoniae* strains was carried out by PCR. The expression level of monocyte activation markers was determined by flow cytometry. Gestational age and anthropometric parameters did not differ between newborns. Children identified with the *fim* gene in combination with other genes were more often discharged home with *K. pneumoniae* than with the *uge* gene. In these children, a decrease in the level of expression of CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺CD11b⁺, CD14⁺HLA-DR⁺ receptors at birth and upon reaching postconceptional age, and a low sIgA content in coprofiltrates during 24 days of life were recorded. Thus, a decrease in the expression of CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺CD282⁺ and CD14⁺HLA-DR⁺ receptors by blood monocytes and insufficiency of sIgA production in the large intestine determine a long period of colonization of *K. pneumoniae* strains with the presence of the *fim* gene in combination with other genes (from 15 to 180 days), as well as the possibility of Klebsiella infection occurring in subsequent periods of the child's life. Much more often, children with the combination of genes *uge + fim* and *kfu + uge + fim* were discharged from the hospital with a diagnosis of anemia; only in these groups of children was the development of bronchopulmonary dysplasia recorded.

Keywords: premature newborns, morbidity structure, *K. pneumoniae* virulence genes, intestinal colonization, functional activity of monocytes, sIgA

Введение

В неонатологической службе осложнения инфекционного генеза у новорожденных является актуальной проблемой системы здравоохранения стран всего мира.

В неонатальном периоде формируется микробиота кишечного биотопа новорожденных детей, которая в результате динамических изменений

из-за воздействия факторов внутрибольничных среды может быть представлена не только такими комменсальными бактериями как *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., с выраженными антагонистическими свойствами, но и условно — патогенными микроорганизмами [5]. Типичным примером данной группы бактерий являются энтеробактерии, колонизация кишечника кото-

рыми ассоциирована с высоким развития генерализованной инфекции из-за транслокации через морфо-функционально не зрелой кишечной стенки и развития инфекционно-токсического шока, основным фактором патогенности которого является эндотоксин, компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

Klebsiella pneumoniae как представитель семейства *Enterobacteriaceae* является одним из лидирующих микроорганизмов, вызывающих госпитальную инфекцию среди детей, рожденных преждевременно. Широкое распространение во внутрибольничной среде штаммов с устойчивостью к нескольким группам антибактериальных препаратов, появление гипервирулентных изолятов с высокими инвазивными способностями, подтверждает актуальность изучения указанного микроорганизма [8].

В патогенезе инфекции, вызванной штаммами *K. pneumoniae*, следует отметить наличие различных генетических детерминант. Согласно литературным данным, среди обширного спектра факторов патогенности одним из распространенных является липополисахарид (ЛПС), который участвует в стабилизации внешней мембраны, ингибирует систему комплемента макроорганизма. Ген *uge* отвечает за участие в синтезе ЛПС (кодирует фермент уридин-дифосфат-галактуронат-4-эмпипазу). При лизисе бактериальной клеточной стенки происходит высвобождение эндотоксина, поступающий в системный кровоток и обуславливающий развитие инфекционно-токсического шока [11]. Органеллами прикрепления к слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта *K. pneumoniae* использует пили, что обеспечивает колонизацию микроорганизма. Выделяют 1-й (кодируется геном *fim*) и 3-й (кодируется геном кластером *mrk*) типы фимбрий. Для активного размножения, жизнедеятельности и метаболизма *K. pneumoniae* поглощает трехвалентное железо из окружающей среды. Сидерофоры (энтеробактин, сальмохелин, аэробактин, иерсиниобактин), как еще один фактор вирулентности, абсорбируют ионы железа и обладают большей способностью к его связыванию, чем собственные белки хозяина [9]. Ключевая роль в системе обеспечения связывания и поглощения трехвалентного железа, отводится гену *kfu* [1].

По литературным данным, некоторые исследователи считают, что при выявлении *K. pneumoniae* в пробе фекалий у новорожденных детей следует использовать антибактериальные препараты или бактериофаги для эрадикации данного микроорганизма и коррекции микробиоценоза кишечника [3].

В других работах указано, что колонизация кишечника *K. pneumoniae* осложняется инфекци-

онными заболеваниями в 30% случаев в неонатальном периоде у иммунокомпрометированных лиц. 60% детей, колонизированных *K. pneumoniae*, не проявляют клинических проявлений после выписки, хотя данный микроорганизм сохраняется в структуре их кишечного микробиоценоза на протяжении 1,5-2 лет [10, 14].

Патогенез осложнений инфекционного характера в неонатальном периоде имеет отличительные особенности. Морфофункциональная незрелость недоношенных детей, сниженная иммунологическая реактивность в сочетании с продолжительным периодом пребывания во внутрибольничной среде, множественными инвазивными манипуляциями формирует условия для течения воспалительного процесса инфекционного характера этиологическим агентами, колонизирующими слизистые оболочки нестерильных локусов условно-патогенными бактериями в стационаре [2].

K. pneumoniae, как типичный представитель условно-патогенных микроорганизмов, обладает патогенным потенциалом, однако причины развития инфекционных осложнений клебсиеллезной этиологии и патогенетические этапы остаются не до конца изученными.

Цель исследования – оценить экспрессию рецепторов CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, CD14⁺CD11b⁺ на моноцитах крови и уровень sIgA в копрофильтратах у недоношенных детей, при колонизации кишечника *K. pneumoniae* с различным генетическим профилем.

Материалы и методы

В исследование включено 43 недоношенных ребенка, рожденных в сроке 28-36 недель гестации, кишечник которых колонизирован *K. pneumoniae* с различными генами вирулентности.

Проведено проспективное сравнительное когортное обследование. Наблюдали 3 группы новорожденных, подразделенных по наличию генов, или их комбинаций, выделенных в штаммах *K. pneumoniae*. В 1-ю группу включены дети, кишечник которых колонизирован *K. pneumoniae* с геном *uge* (n = 11); 2-ю группу составили новорожденные, кишечник которых колонизирован *K. pneumoniae* с генами *uge* + *fim* (n = 20) и 3-ю группу – новорожденные, кишечник с комбинацией генов *uge* + *fim* + *kfu* (n = 12).

У всех матерей было получено добровольное информированное согласие на обработку персональных данных и медицинское вмешательство, необходимое для проведения исследования.

Микробиологическое исследование фекалий, включающее идентификацию выделенных ми-

кроорганизмов, и определение их антибиотико-чувствительности осуществляли в возрасте 7-10-х, 14-17-х, 21-24-х, 28-31-х суток жизни и перед выпиской. Иммунологический анализ включал исследование пуповинной и периферической крови по достижении постконцептуального возраста (ПКВ) 37-40 недели, копрофильтратов на 7-10-е, 14-17-е, 21-24-е сутки.

Уровень экспрессии рецепторов активации CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺HLA-DR⁺, CD14⁺CD11b⁺ оценивали методом проточной цитометрии с использованием анализатора FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (Германия) и наборов того же производителя. В копрофильтратов определяли количественное содержание sIgA методом иммуноферментного анализа при использовании тест-систем Immundiagnostik (Германия).

Статистические методы

При статистической обработке данных использовали пакет прикладных программ Statistica 6.0, IBM SPSS Statistics 22, Microsoft Excel 7.0 для Windows 98. Результаты исследования представляли в абсолютных и относительных значениях для качественных признаков; для количественных непараметрических – медианы (Me) и квартилей (Q_{0,25}-Q_{0,75}), параметрических – среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD). Уровень статистической значимости (p) принимали равным, или менее 0,05 (критерий Манна–Уитни).

Результаты и обсуждение

Колонизация кишечника *K. pneumoniae* в периоде новорожденности зависит от перинатальных факторов риска, рождения ребенка в срок, наличия сопутствующей патологии, ассоциированной с недоношенностью, характера вскармливания, патогенетических свойств возбудителя.

При использовании метода ПЦР в выделенных штаммах *K. pneumoniae* были определены

гены, ассоциированные с вирулентностью микроорганизма: *uge* – обеспечивает синтез липополисахарида, *fim* – способствует микробной адгезии, *kfu* – реализует связывание и поглощение железа (Fe³⁺) (табл. 1).

В большинстве случаев в штаммах *K. pneumoniae* у недоношенных детей различного гестационного возраста идентифицировано сочетание генов *uge* + *fim*, значительно реже изолированные гены *uge* и *fim*. В соответствии с выделенными генами, новорожденные были распределены на группы.

Анализ результатов микробиологического анализа показал, что *K. pneumoniae* с геном *uge* колонизирует кишечник новорожденного ребенка на 12,45±1,15 день, достоверно позднее на 15,65±1,39 и 22,18±3,27 день выявлялись штаммы с генами *uge* + *fim* и *kfu*+ *uge* + *fim* (p_{1-3, 2-3} < 0,05). В 93,02% случаев количество *K. pneumoniae* превышало 10⁵ КОЕ/г. В 53,5% случаев *K. pneumoniae* колонизировала кишечник, микробиоценоз которого не содержал бактерий, выявляемых бактериологическим методом исследования. В 81,4% случаев новорожденные были выписаны домой с продолжающейся кишечной колонизацией *K. pneumoniae*. Необходимо отметить, что дети, в штаммах которых был детектирован ген *fim* в сочетании с другими генами, чаще выписывались домой с колонизацией кишечника *K. pneumoniae*, чем с изолированным геном *uge* (*uge* – 27,3%, *uge* + *fim* и *kfu* + *uge* + *fim* – 100,0% (p_{1-2, 1-3} < 0,05). Это вероятно обусловлено способностью бактериальных клеток с геном *fim* обеспечивающих прикрепление к энтероцитам за счет образования фимбрий. Эрадикация *K. pneumoniae* с геном *uge* происходила на фоне вытеснения другой микрофлорой (энтеробактерий или энтерококков). Длительность колонизации кишечника *K. pneumoniae* с геном *fim* в сочетании с другими генами колебалась от 15 до 180 суток жизни.

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ В ШТАММАХ *K.PNEUMONIAE* У НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ

TABLE 1. DISTRIBUTION OF VIRULENCE GENES IN *K. PNEUMONIAE* STRAINS IN PREMATURE INFANTS

Гены Genes	Новорожденные, родившиеся в сроке гестации от 28 до 36 недель, кишечник которых колонизирован <i>K. pneumoniae</i> (n = 43) Newborns born between 28 and 36 weeks' gestation whose intestines are colonized with <i>K. pneumoniae</i> (n = 43)	
	абс. abs.	%
<i>uge</i>	11	25,6
<i>uge</i> + <i>fim</i>	20	46,5
<i>kfu</i> + <i>uge</i> + <i>fim</i>	12	27,9

ТАБЛИЦА 2. НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ ПРИ ВЫПИСКЕ ИЗ СТАЦИОНАРА

TABLE 2. NOSOLOGICAL FORMS OF DISEASES IN CHILDREN AT DISCHARGE FROM THE HOSPITAL

Нозологическая форма Nosological form	1-я группа 1 st group (n = 11)		2-я группа 2 st group (n = 20)		3-я группа 3 st group (n = 12)	
	абс. abs.	%	абс. abs	%	абс. abs	%
Бактериальный сепсис новорожденного (поздний) (вызванный <i>K. pneumoniae</i>) Bacterial sepsis of the newborn (late) (caused by <i>K. pneumoniae</i>)	2	8,0	0	0	0	0
Анемия недоношенных новорожденных Anemia of premature newborns	1	9,1	13	65*	7	58,3*
Неонатальная желтуха Jaundice of the newborn	5	45,5	15	75	5	41,7
Инфекция специфичная для перинатального периода Infection specific to the perinatal period	5	45,5	8	40,0	4	25
Пневмония Pneumonia	0	0	5	25	2	16,7
Ишемически-геморрагическое поражение ЦНС различной степени тяжести Ischemic-hemorrhagic damage to the central nervous system of varying severity	0	0	5	25	3	25
Ишемически-гипоксическое поражение ЦНС различной степени тяжести Ischemic-hypoxic damage to the central nervous system of varying severity	11	100	18	90	10	83,3
Бронхолегочная дисплазия, возникшая в перинатальном периоде Bronchopulmonary dysplasia arising in the perinatal period	0	0	5	25	1	8,3
Пролиферативная ретинопатия различной стадии Proliferative retinopathy of various stages	6	54,5	8	40,0	7	58,3
Синдром нарушения микрофлоры кишечника Intestinal microflora disorder syndrome	7	63,6	16	80	8	66,7

Примечание. Общее количество наблюдений не соответствует 100% вследствие выявления нескольких патологических признаков у одного и того же ребенка, * $p < 0,05$.

Note. The total number of observations does not correspond to 100% due to the detection of several pathological signs in the same child, * $p < 0.05$.

Гестационный возраст у недоношенных детей с *K. pneumoniae* не отличался и составлял $32,73 \pm 0,36$, $32,81 \pm 0,50$ и $32,57 \pm 0,55$ недель в 1-й, 2-й, 3-й группах соответственно. Масса тела также была сопоставима $1718,6 \pm 88,41$, $1717,5 \pm 123,4$ г и $1626,4 \pm 12,3,8$ г ($p_{1-2,1-3,2-3} > 0,05$ во всех случаях соответственно).

Большинство недоношенных детей всех групп родились в состоянии умеренной асфиксии, тяжелая асфиксия регистрировалась у 5,0% и 16,7% новорожденных 2-й и 3-й групп. Значения по шкале Апгар в группах не отличались и составляли у новорожденных на 1-й минуте – $5,36 \pm 0,28$, $5,34 \pm 0,25$ и $4,93 \pm 0,40$ баллов, на 5-й минуте –

ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ НА МОНОЦИТАХ ПУПОВИННОЙ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. EXPRESSIONS OF ACTIVATION MARKERS ON MONOCYTES IN THE CORD BLOOD OF PREMATURE NEWBORNS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Новорожденные с <i>K. pneumoniae</i> и геном <i>uge</i> Newborns with <i>K. pneumoniae</i> and <i>uge</i> gene	Новорожденные с <i>K. pneumoniae</i> и генами <i>uge + fim</i> Newborns with <i>K. pneumoniae</i> and <i>uge + fim</i> genes	Новорожденные с <i>K. pneumoniae</i> и генами <i>kfu + uge + fim</i> Newborns with <i>K. pneumoniae</i> and <i>kfu + uge + fim</i> genes	p
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /L	6,0 (5,0-6,1)	5,5 (3,6-7,3)	5,0 (4,7-6,4)	
Моноциты, % Monocytes, %	12,0 (10,0-14,0)	13,5 (12,0-15,0)	11,8 (10,0-15,0)	
CD14 ⁺ CD282 ⁺ , %	54,0 (52,0-62,0)	48,0 (38,0-54,0)	49,0 (44,0-52,0)	p ₁₋₂ = 0,014 p ₁₋₃ = 0,024
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , %	55,0 (45,0-57,0)	44,0 (36,0-48,0)	44,0 (34,0-46,0)	p ₁₋₂ = 0,013 p ₁₋₃ = 0,007
CD14 ⁺ CD11b ⁺ , %	56,0 (51,0-63,0)	45,0 (41,0-55,0)	44,0 (35,0-57,0)	p ₁₋₂ = 0,023 p ₁₋₃ = 0,012
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	57,0 (50,0-61,0)	48,0 (45,0-51,0)	49,0 (44,0-54,0)	p ₁₋₂ < 0,000 p ₁₋₃ = 0,008

Примечание. p₁₋₂, p₁₋₃, p₂₋₃ – уровень статистической значимости между группами, группа 1 – новорожденные с *K. pneumoniae* и геном *uge*, группа 2 – новорожденные с *K. pneumoniae* и генами *uge + fim*, группа 3 – новорожденные с *K. pneumoniae* и генами *kfu + uge + fim*.

Note. p₁₋₂, p₁₋₃, p₂₋₃, level of statistical significance between groups; group 1, newborns with *K. pneumoniae* and the *uge* gene; group 2, newborns with *K. pneumoniae* and the *uge + fim* genes; group 3, newborns with *K. pneumoniae* and *kfu + uge + fim* genes.

6,73±0,14, 6,85±0,11 и 6,36±0,31 баллов жизни, p > 0,05 во всех случаях. Тяжелое состояние при рождении отмечалось в 90,9%, 100% и 83,3% в 1-й-, 2-й – и 3-й группах соответственно. Очень тяжелое состояние наблюдалось у одного ребенка в 1-й группе и двух детей во 2-й группе. Ведущими причинами тяжести состояния новорожденных детей явились: перенесенная гипоксия, синдром дыхательных расстройств, гипоксически-ишемическое поражение (ГИП) ЦНС, внутриутробная инфекция. При выписке из отделения патологии недоношенных новорожденных у детей в большинстве случаев сохранялось ГИП ЦНС (табл. 2).

Гипоксически-геморрагическое поражение ЦНС, пневмония, бронхо-легочная дисплазия наблюдалась только у детей 2-й и 3-й групп, в этих же группах детей статистически значимо чаще регистрировалась анемия новорожденных (уровень гемоглобина < 150 г/л в капиллярной крови, количество эритроцитов < 5 × 10¹²/л, гематокрит < 40%). Снижение уровня гемоглобина, у детей с *K. pneumoniae* в сочетании генов которого входит ген *kfu*, возможно, связано с его патогенным потенциалом – способностью утилизиро-

вать железо, тем самым усугубляя течение патологического процесса.

Синдром нарушения микрофлоры кишечника регистрировался, более чем у половины новорожденных. Воспалительные изменения, в стенке тонкого и толстого кишечника, вызванные условно-патогенной микрофлорой, сопровождалась усилением газообразование в полости кишки. Метеоризм у детей 1-й-, 2-й- и 3-й групп наблюдался в 72,7%, 95,0% и 83,3% случаев, срыгивания у 27,3%, 30,0% и 16,7% соответственно.

Решающее значение для первоначальной защиты от инфекции у новорожденных имеют механизмы врожденного иммунитета.

Результаты исследований представлены в таблице 3.

Одной из основных функций моноцитов является распознавание молекулярных паттернов, связанных с патогеном или повреждением (PAMPs или DAMP соответственно) с помощью различных Toll-подобных рецепторов (TLR). Проведение активационного сигнала, индуцированного TLR, происходит с участием нескольких вспомогательных молекул, одной из которых является трансмембранный белок (sCD14), который взаимодействуя с TLR, связывается с липо-

ТАБЛИЦА 4. ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ НА МОНОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ ПО ДОСТИЖЕНИИ ПОСТКОНЦЕПТУАЛЬНОГО ВОЗРАСТА, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 4. EXPRESSIONS OF ACTIVATION MARKERS ON PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES OF PREMATURE INFANTS ON REACHING POSTCONCEPTUAL AGE, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Новорожденные с <i>K. pneumoniae</i> и геном <i>uge</i> Newborns with <i>K. pneumoniae</i> and <i>uge</i> gene	Новорожденные с <i>K. pneumoniae</i> и генами <i>uge + fim</i> Newborns with <i>K. pneumoniae</i> and <i>uge + fim</i> genes	Новорожденные с <i>K. pneumoniae</i> и генами <i>kfu + uge + fim</i> Newborns with <i>K. pneumoniae</i> and <i>kfu + uge + fim</i> genes	p
Лейкоциты, 10 ⁹ /л Leukocytes, 10 ⁹ /L	6,6 (5,0-7,1)	7,0 (6,2-8,0)	6,0 (5,5-7,4)	
Моноциты, % Monocytes, %	10,0 (9-13,0)	13,0 (12,0-14,0)	12,0 (10,0-15,0)	
CD14 ⁺ CD282 ⁺ , %	69,0 (65,0-77,0)	56,0 (32,0-66,0)	58,0 (42,0-63,0)	p ₁₋₂ < 0,000 p ₁₋₃ < 0,000
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , %	51,0 (49,0-52,0)	45,0 (35,0-55,0)	44,0 (36,0-55,0)	p ₁₋₂ = 0,015 p ₁₋₃ = 0,014
CD14 ⁺ CD11b ⁺ , %	63,0 (57,0-70,0)	56,0 (47,0-59,0)	55,0 (47,0-59,0)	p ₁₋₂ = 0,02 p ₁₋₃ = 0,010
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	64,0 (63,0-65,0)	55,0 (53,0-63,0)	55,0 (53,0-54,0)	p _{1-2, 1-3} = 0,010

Примечание. p_{1-2, 1-3, 2-3} – уровень статистической значимости между группами, группа 1 – новорожденные с *K. pneumoniae* и геном *uge*, группа 2 – новорожденные с *K. pneumoniae* и генами *uge + fim*, группа 3 – новорожденные с *K. pneumoniae* и генами *kfu + uge + fim*.

Note. p_{1-2, 1-3, 2-3}, level of statistical significance between groups; group 1, newborns with *K. pneumoniae* and the *uge* gene; group 2, newborns with *K. pneumoniae* and the *uge + fim* genes; group 3, newborns with *K. pneumoniae* and *kfu + uge + fim* genes.

полисахаридами и пептидогликанами бактерий, активируя клеточный иммунный ответ [11].

В статье, опубликованной нами ранее [6], было продемонстрировано снижение экспрессии маркеров активации моноцитов CD14⁺CD282⁺ и CD14⁺CD284⁺ у недоношенных детей с колонизацией кишечника *K. pneumoniae* в сравнении с новорожденными без колонизации данного микроорганизма. Аналогичные данные были получены в настоящем исследовании у детей, имеющих штаммы *K. pneumoniae* с комбинациями генов (*uge + fim* и *kfu + uge + fim*), в сравнении с изолированным геном *uge*, что свидетельствовало об отсутствии адекватной реакции на проникновение чужеродных патогенов при рождении.

Молекула CD11b является рецептором для C3-компонента комплемента. В результате комплексной гуморальной активации моноцитов через эту группу рецепторов происходят распознавание корпускулярных частиц, опсонизированных соответствующими иммуноглобулинами или комплементом, а далее их поглощение, кислородный взрыв, дегрануляция с образованием фаголизосомы, процессы киллинга, элиминации антигенов [4]. У новорожденных, колонизированных штаммами *K. pneumoniae* с геном *fim*,

отмечалось сокращение количества клеток экспрессирующих рецептор CD14⁺CD11b⁺, что указывало на нарушение адгезивной способности моноцитов к межклеточному взаимодействию. Также в этих группах детей наблюдалось снижение молекул HLA-DR на клеточной поверхности моноцитов, основная функция которых заключается в представлении антигена иммунокомпетентным клеткам адаптивного иммунитета, и снижение его уровня свидетельствует о нарушении антигенпрезентирующей функции, а также способности к продукции медиаторов воспаления, что увеличивает риск развития инфекционно-воспалительных заболеваний [7]. Не выявлены статистически значимые различия в количестве лейкоцитов и моноцитов.

По достижении постконцептуального возраста, выявленные изменения в показателях функциональной активности моноцитов при рождении, сохранялись (табл. 4).

В динамике периода обследования экспрессия маркеров активации моноцитов возрастала, за исключением рецепторов CD14⁺CD284⁺. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что снижение функциональной активности клеток моноцитарного ряда, снижает способность к

ТАБЛИЦА 5. УРОВЕНЬ sIgA В КОПРОФИЛЬТАХ У НОВОРОЖДЕННЫХ С *K. PNEUMONIAE* В ДИНАМИКЕ ПЕРИОДА ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 5. LEVEL OF sIgA IN COPROPHYLES IN NEWBORNS WITH *K. PNEUMONIAE* DURING THE STUDY PERIOD

Сутки жизни Day of life	Новорожденные с <i>K. pneumoniae</i> и геном <i>uge</i> Newborns with <i>K. pneumoniae</i> and <i>uge</i> gene	Новорожденные с <i>K. pneumoniae</i> и генами <i>uge + fim</i> Newborns with <i>K. pneumoniae</i> and <i>uge + fim</i> genes	Новорожденные с <i>K. pneumoniae</i> и генами <i>kfu + uge + fim</i> Newborns with <i>K. pneumoniae</i> and <i>kfu + uge + fim</i> genes	p
	sIgA, г/л sIgA, g/L			
1	0,93 (0,45-1,61)	0,29 (0,22-0,89)	0,73 (0,44-0,95)	p ₁₋₂ = 0,005 p _{1-3, 2-3} = 0,02
14-17	7,18 (5,67-9,13)	5,21 (3,34-5,69)	5,43 (1,87-6,9)	p ₁₋₂ = 0,004 p ₁₋₃ = 0,018
21-24	10,6 (8,94-16,38)	8,55 (4,05-10,65)	9,15 (7,19-12,26)	p ₁₋₂ < 0,000 p ₁₋₃ = 0,025

Примечание. p_{1-2, 1-3, 2-3} – уровень статистической значимости между группами, группа 1 – новорожденные с *K. pneumoniae* и геном *uge*, группа 2 – новорожденные с *K. pneumoniae* и генами *uge + fim*, группа 3 – новорожденные с *K. pneumoniae* и генами *kfu + uge + fim*.

Note. p_{1-2, 1-3, 2-3}, level of statistical significance between groups; group 1, newborns with *K. pneumoniae* and the *uge* gene; group 2, newborns with *K. pneumoniae* and the *uge + fim* genes; group 3, newborns with *K. pneumoniae* and *kfu + uge + fim* genes.

элиминации *K. pneumoniae* при наличии в штаммах гена *fim*.

Элиминация патогенов является основным механизмом, с помощью которого sIgA блокирует прикрепление микроорганизмов к эпителиальным клеткам-мишеням слизистой оболочки, предотвращая тем самым повреждение поверхности, колонизацию и последующую массивную инвазию. Функции sIgA заключаются в распознавании множества антигенных эпитопов на поверхности вирусов и бактерий, а также белков, задерживать или отменять их внутреннюю способность прилипать к эпителию и /или проникать в него [13].

Проведенные исследования показали, что уровень sIgA в копрофильтатах у всех детей с *K. pneumoniae* в динамике периода обследования статистически значимо повышался (табл. 5).

При этом, у детей с *K. pneumoniae* и комбинацией генов (*uge + fim* и *kfu + uge + fim*) содержание sIgA сохранялось на низком уровне, в срав-

нении с наличием только гена (*uge*) в условиях нахождения в стационаре, что по-видимому объясняет эрадикацию данного патогена в 1-й группе детей и бактерионосительство *K. pneumoniae* у детей 2-й и 3-й групп при выписке из стационара.

Заключение

Таким образом, снижение экспрессии рецепторов CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺CD282⁺ и CD14⁺HLA-DR⁺ моноцитами крови и недостаточность продукции sIgA в толстом кишечнике обуславливают продолжительный период колонизации штаммов *K. pneumoniae* гена *fim* в сочетании с другими генами (от 15 до 180 суток), а также возможность реализации клебсилезной инфекции в последующие периоды жизни ребенка. Значительно чаще дети с комбинацией генов *uge + fim* и *kfu + uge + fim* выписывались из стационара с диагнозом «анемия», только в этих группах детей регистрировалось развитие анемии и бронхо-легочной дисплазии.

Список литературы / References

1. Краева Л.А., Кунилова Е.С., Бургасова О.А., Хамдулаева Г.Н., Данилова Е.М., Беспалова Г.И. Значение факторов патогенности некоторых видов стрептококков и клебсиелл при определении их этиологической роли в развитии воспалительных процессов респираторного тракта // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 1. С. 121-128. [Kraeva L.A., Kunilova E.S., Burgasova O.A., Xamdulaeva G.N., Danilova E.M., Bepalova G.I. The importance of pathogenicity factors of some Streptococcus spp. and Klebsiella spp. in determining their Etiological

role in the inflammatory processes of the respiratory tract. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 1, pp. 121-128. (In Russ.) doi: 10/15789/2220-7619-ТИО-1339.

2. Никитина И.В., Герасимова А.В., Иванова Л.А., Крөг-Йенсен О.А., Исаева И.Л., Ленюшкина А.А., Припутневич Т.В., Дегтярев Д.Н. Инфекции, ассоциированные с оказанием медицинской помощи, у критически больных недоношенных новорожденных: эпидемиология, клиническая картина и диагностика в современных условиях // Неонатология: новости, мнения, обучение, 2020. Т. 8, № 3. С.7-17. [Nikitina I.V., Gerasimova A.V., Ivanova L.A., Krog-Jensen O.A., Isaeva I.L., Lenyushkina A.A., Priputnevich T.V., Degtyarev D.N. Health care-associated infections in critically ill premature newborns: epidemiology, clinical picture and diagnosis in modern conditions. *Neonatologiya: novosti, mneniya, obuchenie = Neonatology: News, Opinions, Training*, 2020, Vol. 8, no. 3, pp. 7-17. (In Russ.)]

3. Николаева И.В., Шайхиева Г.С., Григорьева Т.В., Васильев И.Ю., Герасимова Е.С., Леонтьева Н.С. Антибиотикорезистентность кишечных штаммов *Kl. pneumoniae*, выделенных у новорожденных детей в родильном доме // Практическая медицина, 2020. Т. 18, № 6. С.128-132. [Nikolaeva I.V., Shaikhieva G.S., Grigorieva T.V., Vasilyev I.Yu., Gerasimova E.S., Leontyeva N.S. Antibiotic resistance of intestinal strains of *Kl. Pneumoniae* in newborns in a maternity hospital. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2020, Vol. 18, no. 6, pp. 128-132. (In Russ.)]

4. Нестерова И.В., Митропанова М.Н., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В. Дисрегуляция системы цитокинов на уровне мукозального и системного иммунитета, ассоциированная с нарушениями микробиоценоза верхних дыхательных путей у детей с врожденной расщелиной губы и нёба // Иммунология, 2019. Т. 40, № 5. С. 62-71. [Nesterova I.V., Mitropanova M.N., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Kovaleva S.V. Dysregulation of the cytokine system at the level of mucosal and systemic immunity associated with impaired microbiocenosis of the upper respiratory tract in children with congenital cleft lip and palate. *Immunologiya = Immunologiya*, 2019, Vol. 40, no. 5, pp. 62-71. (In Russ.)]

5. Ткаченко А.К., Марочкина Е.М. К понятию «Внутриутробное инфицирование и внутриутробная инфекция» // Гродненский государственный медицинский университет, 2017, № 1. С.103-107. [Tkachenko A.K., Romanova O.N., Marochkina E.M. To the concept "Intrauterine infection and fetal infection. *Grodiyenskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet = Grodien State Medical University*, 2017, no. 1, pp. 103-107. (In Russ.)]

6. Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Маханек А.А., Устюжанин А.В. Клиническая характеристика и функциональная активность моноцитов крови и sIgA у недоношенных новорожденных, кишечник которых колонизирован *K. pneumoniae* // Современные проблемы науки и образования, 2023, № 5. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32927>. [Chistiakova G.N., Remizova I.I., Makhaneck A.A., Ustyuzhanin A.V. Clinical characteristics and functional activity of blood monocytes and sIgA in premature newborns whose intestines are colonized by *K. pneumoniae*. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2023, no. 5. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32927>. (In Russ.)]

7. Чистякова Г.Н., Устьянцева Л.С., Ремизова И.И., Рюмин В.Е. Клинико-иммунологические факторы риска формирования бронхолегочной дисплазии тяжелой степени у детей с экстремально низкой массой тела // Проблемы репродукции, 2022. Т. 28, № 1. С. 106-114. [Chistyakova G.N., Ustyantseva L.S., Remizova I.I., Ryumin V.E. Clinical and immunological risk factors for the formation of severe broncho-pulmonary dysplasia in children with extremely low body weight. *Problemy reproduktivnoy = Russian Journal of Immunology of Reproduction*, 2022, Vol. 28, no. 1, pp. 106-114. (In Russ.)]

8. Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Филогенетический анализ родства штаммов *Klebsiella pneumoniae* по генам *uge* и *fim* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2020, № 6. С. 556-563. [Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I. The relatedness of *Klebsiella pneumoniae* strains based on phylogenetic analysis of *uge* and *fim* genes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2020, no. 6. pp. 556-563. (In Russ.)]

9. Шамина О.В., Самойлова Е.А., Новикова И.Е., Лазарева А.В. *Klebsiella pneumoniae*: микробиологическая характеристика, антибиотикорезистентность и вирулентность // Российский педиатрический журнал, 2020. № 3. С. 191-197. [Shamina O.V., Samoilovala E.A., Novikova I.E., Lazareva A.V. *Klebsiella pneumoniae*: microbiological characteristics, antimicrobial resistance, and virulence. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal = Russian Pediatric Journal*, 2020, no. 3. pp. 191-197. (In Russ.)]

10. Akturk H., Sutcu M., Somer A., Aydin D., Cihan R., Ozdemir A., Coban A., Ince Z., Citak A., Salman A. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factors for progression to infection. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2016, Vol. 20, Iss. 2, pp. 134-140.

11. Corthésy B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 185. doi: 10.3389/fimmu.2013.00185.
12. De Biasi S., Neroni A., Nasi M., Lo Tartaro D., Borella R., Gibellini L., Lucaccioni L., Bertucci E., Lugli L., Miselli F., Bedetti L., Neri I., Ferrari F., Facchinetti F., Berardi A., Cossarizza A. Healthy preterm newborns: Altered innate immunity and impaired monocyte function. *Eur. J. Immunol.*, 2023, Vol. 53, no. 5, e2250224. doi: 10.1002/eji.202250224.
13. Gómez M., Valverde A., Del Campo R., Rodríguez J.M., Maldonado-Barragán A. Phenotypic and Molecular Characterization of Commensal, Community-Acquired and Nosocomial *Klebsiella* spp. *Microorganisms*, 2021, Vol. 9, no. 11, 2344. doi: 10.3390/microorganisms9112344.
14. Nordberg V., Jonsson K., Giske C.G., Iversen A., Aspevall O., Jonsson B., Camporeale A., Norman M., Navér L. Neonatal intestinal colonization with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae—a 5-year follow-up study. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2018, Vol. 24, Iss. 9, pp. 1004-1009.

Авторы:

Чистякова Г.Н. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель научного отделения микробиологии, иммунологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Ремизова И.И. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и клинической микробиологии ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Устюжанин А.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Маханёк А.А. — младший научный сотрудник отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Кадочникова П.А. — очный аспирант, врач — анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Абакарова Д.А. — младший научный сотрудник, врач-неонатолог 2 блока отделения реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Chistyakova G.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head, Scientific Department of Immunology, Microbiology of Pathomorphology and Cytodiagnostics, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Yekaterinburg, Russian Federation

Remizova I.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Microbiology of Pathomorphology and Cytodiagnostics, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Yekaterinburg, Russian Federation

Ustyuzhanin A.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Yekaterinburg, Russian Federation

Makhanyok A.A., Junior Research Associate, Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Yekaterinburg, Russian Federation

Kadochnikova P.A., Full-time Graduate Student, Anesthesiologist-Resuscitator, Intensive Care Unit, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Yekaterinburg, Russian Federation

Abakarova D.A., Junior Research Associate, Neonatologist, Block 2 of the Intensive Care Unit, Ural Research Institute for Maternal and Child Care, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 08.04.2024

Отправлена на доработку 08.04.2024

Принята к печати 12.04.2024

Received 08.04.2024

Revision received 08.04.2024

Accepted 12.04.2024

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ТРЕС И КРЕС У ДЕТЕЙ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА (ЧБД – ЧАСТО БОЛЕЮЩИЕ ДЕТИ, ОПЕРИРОВАННЫЕ ДЕТИ ПО ПОВОДУ ВРОЖДЕННОГО ПОРОКА СЕРДЦА С СОЧЕТАННОЙ ТИМЭКТОМИЕЙ, ДЕТИ – БЕЗ ТАКОВОЙ) И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ

**Ровда Ю.И.¹, Ведерникова А.В.¹, Шабалдин А.В.^{1,2},
Филипенко М.Л.³, Синицкая А.А.², Халивопуло И.К.²,
Гришачева Е.О.², Отставнов Г.А.⁴, Шкитин Я.В.¹, Миняйлова Н.Н.¹,
Хоботкова Т.С.¹, Дадонов В.В.¹**

¹ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

³ ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Кемерово, Россия

⁴ АО «Клиническая медико-санитарная часть “Энергетик”», г. Кемерово, Россия

Резюме. Целью изучения было сравнение и анализ показателей уровней KREC (каппа-deleting recombination excision circle) и TREC (T-cell receptor excision circle) косвенно отражающих нарушение созревания Т и/или В лимфоцитов, у детей группы медико-биологического риска и группы сравнения (пациентов, считающихся условно здоровыми, относительно популяции).

Группа медико-биологического риска составляла:

1) 15 детей с оперированными врожденными пороками сердца с сочетанной тимэктомией и 9 – без таковой; средний возраст 5 месяцев \pm 4 месяца и 7 месяцев \pm 3 месяца соответственно;

Адрес для переписки:

Ведерникова Алена Владимировна
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный
медицинский университет»
650056, Россия, Кемеровская обл. – Кузбасс,
г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а.
Тел.: 8 (929) 351-43-82.
E-mail: cmombilla@gmail.com

Address for correspondence:

Alena V. Vedernikova
Kemerovo State Medical University
22a Voroshilov St
Kemerovo, Kemerovo Region – Kuzbass
650056 Russian Federation
Phone: +7 (929) 351-43-82.
E-mail: cmombilla@gmail.com

Образец цитирования:

Ю.И. Ровда, А.В. Ведерникова, А.В. Шабалдин,
М.Л. Филипенко, А.А. Синицкая, И.К. Халивопуло,
Е.О. Гришачева, Г.А. Отставнов, Я.В. Шкитин,
Н.Н. Миняйлова, Т.С. Хоботкова, В.В. Дадонов
«Сравнительный анализ уровней концентрации
TREC и KREC у детей медико-биологического риска
(ЧБД – часто болеющие дети, оперированные дети
по поводу врожденного порока сердца с сочетанной
тимэктомией, дети – без таковой) и условно
здоровых» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 5. С. 993-1000. doi: 10.15789/1563-0625-CAO-16914

© Ровда Ю.И. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Yu.I. Rovda, A.V. Vedernikova, A.V. Shabaldin,
M.L. Filipenko, A.A. Sinitskaya, I.K. Khalivopulo,
E.O. Grishacheva, G.A. Otstavnov, Ya.V. Shkيتين,
N.N. Minyailova, T.S. Khabotkova, V.V. Dadonov
“Comparative analysis of TREC and KREC concentration
levels in children at medical and biological risk (CHD –
frequently ill children, children who have been operated for
congenital heart defect with combined thymectomy, children –
without it) and those conditionally healthy”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 5, pp. 993-1000.
doi: 10.15789/1563-0625-CAO-16914

© Rovda Yu.I. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-CAO-16914

2) 27 детей с относительно частой заболеваемостью респираторного тракта (острая респираторная вирусная инфекция более 8 раз в год) в возрасте $1,6 \pm 1,4$ месяца, среди которых удельный вес, посещающих детское дошкольное учреждение составляет 20 человек (74%).

Группа сравнения:

1) 16 условно здоровых детей (1 группа здоровья) в возрасте $1,7 \pm 1,6$ лет, среди которых, удельный вес посещающих детское дошкольное учреждение составлял 13 человек (81%);

2) 48 условно здоровых новорожденных детей, средний возраст которых составлял 15 ± 12 дней.

Количественное определение TREC, KREC было проведено с помощью мультиплексной тест-системы, разработанной в Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск). Были установлены средние концентрации TREC и KREC у условно здоровых новорожденных детей. Дети с высокой частотой инфекционной респираторной заболеваемости (более 8 случаев острой респираторной вирусной инфекции в год) имели значительно более высокий риск развития нарушений как со стороны Т-клеточного, так и В-клеточного иммунитета, в сравнении со здоровой популяцией. Дети, перенесшие тотальную тимэктомию во время оперативного лечения врожденных пороков сердца имели более высокий риск развития иммунодефицитных состояний, затрагивающих преимущественно Т-клеточный иммунитет, в сравнении с группой детей, оперированных с сохранением вилочковой железы.

Ключевые слова: врожденные пороки сердца, часто болеющие дети, тимэктомия, KREC, TREC, иммунодефицит

COMPARATIVE ANALYSIS OF TREC AND KREC CONCENTRATION LEVELS IN CHILDREN AT MEDICAL AND BIOLOGICAL RISK (CHD – FREQUENTLY ILL CHILDREN, CHILDREN WHO HAVE BEEN OPERATED FOR CONGENITAL HEART DEFECT WITH COMBINED THYMECTOMY, CHILDREN – WITHOUT IT) AND THOSE CONDITIONALLY HEALTHY

Rovda Yu.I.^a, Vedernikova A.V.^a, Shabaldin A.V.^{a,b}, Filipenko M.L.^c, Sinitskaya A.A.^b, Khalivopulo I.K.^b, Grishacheva E.O.^b, Otstavnov G.A.^d, Shkitin Ya.V.^a, Minyailova N.N.^a, Khobotkova T.S.^a, Dadonov V.V.^a

^a Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

^b Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

^c Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

^d Clinical Medical and Sanitary Unit "Energetik", Kemerovo, Russian Federation

Abstract. The purpose of the study was to compare and analyze the levels of KREC (kappa-deleting recombination excision circle) and TREC (T cell receptor excision circle) levels, which indirectly reflect impaired maturation of T and/or B lymphocytes, in children of the medical and biological risk group and the comparison group (patients considered relatively healthy, relative to the population).

The medical and biological risk groups were:

1) 15 children with operated congenital heart defects with combined thymectomy and 9 without it; the average age is 5 months ± 4 months and 7 months ± 3 months, respectively; and

2) 27 children with relatively frequent morbidity of the respiratory tract (acute respiratory viral infection more than 8 times a year) aged 1.6 ± 1.4 months, among whom the proportion attending a preschool institution is 20 people (74%).

The comparison groups were:

1) 16 relatively healthy children (health group 1) aged 1.7 ± 1.6 years, among whom the proportion of those attending a preschool institution was 13 people (81%); and

2) 48 apparently healthy newborn children, whose average age was 15 ± 12 days.

Quantitative determination of TREC and KREC was carried out using a multiplex test system developed at the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk). The average concentrations of TREC and KREC were determined in apparently healthy newborns. Children with a high incidence of infectious respiratory morbidity (more than 8 cases of acute respiratory viral infection per year) had a significantly higher risk of developing disorders of both T cell and B cell immunity, compared with the healthy population. Children who underwent total thymectomy during surgical treatment of congenital heart defects had a higher risk of developing immunodeficiency conditions, affecting predominantly T cell immunity, in comparison with the group of children operated on with preservation of the thymus gland.

Keywords: congenital heart defects, frequently ill children, thymectomy, KREC, TREC, immunodeficiency

Введение

С появлением и популяризацией новой методики оценки иммунного профиля при помощи измерения уровня KREC (kappa-deleting recombination excision circle) и TREC (T-cell receptor excision circle) появились возможности более качественного и простого скрининга на выявления иммунодефицитных состояний у пациентов. Современная классификация врожденных ошибок иммунитета (ВОИ) насчитывает более 450 нозологических форм и это число может в дальнейшем увеличиваться [3]. Особыми группами риска по манифестации ВОИ являются часто и длительно болеющие дети (более 8–10 раз за год), и, например, дети с врожденными пороками сердца. Кроме того, при кардиохирургическом лечении врожденного порока сердца (ВПС) нередко проводится тимэктомия, особенно у детей неонатального и грудничкового периодов [1]. Настоящее исследование направлено на сравнение показателей KREC и TREC у разных групп детей, как относительно здоровых, так и имеющих вышеобозначенные факторы риска в анамнезе.

Цель исследования — оценить концентрацию TREC и KREC (как высоковероятных маркеров Т-клеточного и гуморального иммунитета) у детей группы медико-биологического риска и группы сравнения.

Материалы и методы

Для выполнения поставленной цели на базе ФГБНУ НИИ КПССЗ, ФГБОУ ВО КемГМУ, ФГБОУ ВО КемГУ, АО КМСЧ «Энергетик» было проведено проспективное одномоментное исследование, направленное на изучение уровней KREC и TREC:

— у детей группы медико-биологического риска, состоящую из:

1) 15 детей с оперированными врожденными пороками сердца стимэктомией и 9 без нее, средний возраст 5 месяцев ± 3 месяца и 7 месяцев ± 3 месяца соответственно;

2) 27 детей с относительно частой заболеваемостью респираторного тракта (ОРВИ более 8 раз в год) или так называемые ЧБД (часто болеющие дети) в возрасте $1,6 \pm 1,4$ месяца, удельный вес которых посещающих детское дошкольное учреждение составляет 20 человек (74%).

— у детей группы сравнения, состоящую из:

1) 16 условно здоровых детей (1 группа здоровья) в возрасте $1,7 \pm 1,6$ лет, удельный вес которых, посещающих детское дошкольное учреждение составляет 13 человек (81%);

2) 48 условно здоровых новорожденных детей, средний возраст которых составлял 15 ± 12 дней.

У всех детей был выполнен забор периферической крови, которая наносилась на фильтры Perkin Elmer 226 Guthriecards (Perkin Elmer Health Sciences, США). Гатри-карты (сухие пятна) до использования хранились при комнатной температуре в лаборатории генетики КемГУ. Выделения ДНК выполняли из 6 дисков по 3 мм (примерно 20 мкл крови) с использованием реактивов, разработанных в Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН г. Новосибирск), по прилагаемым инструкциям. Количественное определение TREC, KREC было проведено с помощью мультиплексной тест-системы, разработанной в Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН г. Новосибирск). Набор реагентов адаптирован для проведения qPCR на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories). Статистическую обработку результатов исследования проводили при помощи пакета программ Statistica 10.0.

Результаты и обсуждение

Референсными нижними пороговыми значениями для уровня KREC и TREC считались 1000 копий $\times 10^5$ ядросодержащих клеток и 500 копий $\times 10^5$ ядросодержащих клеток соответственно [2]. Исходя из этих данных, было проанализировано

распределение концентрации экцизионных клонов в каждой исследуемой группе (табл. 1).

Было установлено, что у детей группы медико-биологического риска уровень TREC ниже референсных значений встречался чаще, чем у детей группы сравнения. ($X^2 11,9$ при $p < 0,05$), уровень KREC ниже минимального порогового интервала также встречался чаще у детей из группы медико-биологического риска ($X^2 16,3$ при $p < 0,05$).

Был рассчитан относительный риск выявления крайне низких показателей TREC и KREC у детей разных групп (табл. 2).

Относительный риск выявления крайне низких показателей TREC и KREC у детей разных групп

ОР (относительный риск) выявления крайне низких показателей TREC для пациентов групп медико-биологического риска составил – 2,114; 95% ДИ [1,4;3,0] Se составила 33%, Sp – 92%, KREC – 2,208; 95% ДИ [1,5;3,3], Se составила 52%, Sp – 82%. Следовательно, риск развития и выявления иммунодефицитных состояний у детей, имеющих частую инфекционную респираторную заболеваемость и у детей с врожденными пороками сердца (как с тимэктомией, так и без нее) объективно выше, чем у пациентов, не имеющих отягощающих обстоятельств в анамнезе.

Средние значения в каждой группе были рассчитаны и представлены в таблице 3.

Средние значения уровня TREC и KREC в исследуемых группах (нормативный показатель на 10^5 лейкоцитов)

Дети группы медико-биологического риска, в целом, отставали по среднему уровню TREC от детей группы сравнения, но средние показатели KREC при этом различались, например, дети раннего возраста из подгруппы ЧБД отставали от детей группы сравнения того же возраста с 1 группой здоровья, а аналогичные показатели у тимэктомированных пациентов были выше, чем у всех остальных групп. Исходя из этого, было принято решение рассчитать относительные риски выявления уровня TREC и KREC ниже минимального порогового значения в отдельных подгруппах.

Так, в первую очередь, было проведено сравнение показателей иммунного профиля у ЧБД раннего возраста, и группы условно здоровых сверстников 1 здоровья, считающихся здоровыми (табл. 4).

Относительный риск выявления крайне низких показателей TREC и KREC у часто болеющих детей (более 8 случаев ОРВИ в год) и сверстников 1 группы здоровья

Относительный риск при сравнении данных подгрупп составил 1,3 (ДИ [0,8;2,09] Se – 37%, Sp – 81%) и 2,04 (ДИ [1,06;4,02] Se – 77%, Sp –

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ TREC И KREC В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 1. DISTRIBUTION OF TREC AND KREC LEVELS IN THE RESEARCHED GROUPS

Уровни концентраций маркеров иммунного профиля Concentration levels of immune profile markers	Группа медико-биологического риска Group of medical and biological risk			Группа сравнения Comparison group	
	ЧБД раннего возраста Frequently ill young children (n = 27)	Дети с ВПС и тимэктомией Children with congenital heart defects and thymectomy (n = 15)	Дети с ВПС без тимэктомии Children with congenital heart defects without thymectomy (n = 9)	Новорожденные Newborn child (n = 48)	Дети раннего возраста 1 группы здоровья Young children of 1 st health group (n = 16)
TREC					
Менее 500 Under 500	10 (37%)	6 (40%)	1 (11%)	2 (4%)	3 (18%)
500-1000	7 (26%)	3 (20%)	0	9 (18%)	4 (25%)
Более 1000 Over 1000	10 (37%)	6 (40%)	8 (88%)	37 (77%)	9 (57%)
KREC					
Менее 1000 Under 1000	21 (78%)	4 (27%)	2 (22%)	5 (10%)	6 (38%)
1000-2000	6 (22%)	2 (13%)	0	9 (18%)	5 (31%)
Более 2000 Over 2000	0	9 (60%)	7 (77%)	34 (70%)	5 (31%)

Примечание. * – $p < 0,05$.

Note. *, $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ РИСК ВЫЯВЛЕНИЯ КРАЙНЕ НИЗКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ TREC И KREC У ДЕТЕЙ РАЗНЫХ ГРУПП

TABLE 2. THE RELATIVE RISK OF DETECTING EXTREMELY LOW TREC AND KREC VALUES IN CHILDREN OF DIFFERENT GROUPS

Медико-биологический риск Biomedical risk	Уровень TREC/KREC относительно нижнего порогового значения TREC/KREC level relative to the lower threshold value		Всего Total	ОР RR	ДИ CI	p-level
	Ниже Under	Выше Over				
TREC						
Есть / Yes	17 (38%)	34 (61%)	51	2,114	[1,4:3,0]	0,04
Нет / No	5 (5%)	59 (94%)	64			
Всего / Total	22	93	115			
KREC						
Есть / Yes	27 (59%)	24 (40%)	51	2,208	[1,5:3,3]	0,04
Нет / No	11 (12%)	53 (87%)	64			
Всего / Total	38	77	115			

ТАБЛИЦА 3. СРЕДНИЕ ЗНАЧЕНИЯ УРОВНЯ TREC И KREC В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ (НОРМАТИВНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ НА 10⁵ ЛЕЙКОЦИТОВ)

TABLE 3. THE AVERAGE VALUES OF TREC AND KREC LEVELS IN THE STUDY GROUPS (THE STANDARD INDICATOR FOR 10⁵ LEUKOCYTES)

	Группа медико-биологического риска Group of medical and biological risk			Группа сравнения Comparison group	
	ЧБД раннего возраста Frequently ill young children	Дети с ВПС, оперированные с тимэктомией Children with congenital heart defects operated with thymectomy	Дети с ВПС, оперированные без тимэктомии Children with congenital heart defects operated without thymectomy	Новорожденные дети Newborn child	Дети раннего возраста 1 группы здоровья Children early age 1 group health
TREC M±std	850±586	1357±1102	3398±5002	3057±1045	1728±1326
KREC M±std	835±324	4295±3275	3476±2488	3161±1612	1592±1226

62%) для TREC и KREC соответственно. Что свидетельствует статистически о более значимом риске развития нарушений в звеньях как Т-клеточного, так и В-клеточного иммунитета в подгруппе ЧБД раннего возраста.

Далее была проведена сравнительная оценка рисков выявления низких значений TREC и KREC среди детей оперированных по поводу врожденных пороков сердца как с сочетанной тимэктомией, так и без таковой и группой условно здоровых новорожденных детей (табл. 5). Данные группы подвергались сравнению в связи с практически аналогичными возрастными характеристиками.

Относительный риск выявления крайне низких показателей TREC и KREC у детей с врожденными пороками сердца и здоровых новорожденных

Относительный риск при сравнении данных подгрупп составил 2,8 (ДИ [1,6:4,9] Se – 29%, Sp – 95%) для TREC и 2,179 (ДИ [1, 2:3,7] Se – 33%, Sp – 89%) для KREC. Что позволило сделать вывод о статистически значимом низком иммунном статусе детей с оперированными врожденными пороками сердца (независимо от удаления вилочковой железы) в сравнении с группой здоровых новорожденных. Однако, учитывая определяющую роль вилочковой железы в формировании Т-клеточного иммунитета,

ТАБЛИЦА 4. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ РИСК ВЫЯВЛЕНИЯ КРАЙНЕ НИЗКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ TREC И KREC У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ (БОЛЕЕ 8 СЛУЧАЕВ ОРВИ В ГОД) И СВЕРСТНИКОВ 1 ГРУППЫ ЗДОРОВЬЯ

TABLE 4. THE RELATIVE RISK OF DETECTING EXTREMELY LOW TREC AND KREC VALUES IN FREQUENTLY ILL CHILDREN (MORE THAN 8 CASES OF SARS PER YEAR) AND PEERS OF THE 1ST HEALTH GROUP

Частая инфекционная заболеваемость Frequent infectious diseases	Уровень TREC/KREC относительно нижнего порогового значения TREC/KREC level relative to the lower threshold value		Всего Total	ОР RR	ДИ CI	p-level
	Ниже Under	Выше Over				
TREC						
Есть / Yes	10 (38%)	17 (61%)	27	1,357	[0,8:2,09]	0,04
Нет / No	3 (5%)	13 (94%)	16			
Всего / Total	13	30	43			
KREC						
Есть / Yes	21 (38%)	6 (61%)	27	2,04	[1,06:4,02]	0,04
Нет / No	6 (5%)	10 (94%)	16			
Всего / Total	27	16	43			

ТАБЛИЦА 5. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ РИСК ВЫЯВЛЕНИЯ КРАЙНЕ НИЗКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ TREC И KREC У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА И ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

TABLE 5. THE RELATIVE RISK OF DETECTING EXTREMELY LOW TREC AND KREC VALUES IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DEFECTS AND HEALTHY NEWBORNS

Врожденный порок сердца Congenital heart disease	Уровень TREC/KREC относительно нижнего порогового значения TREC/KREC level relative to the lower threshold value		Всего Total	ОР RR	ДИ CI	p-level
	Ниже Under	Выше Over				
TREC						
Есть / Yes	7 (38%)	17 (61%)	27	2,8	[1,6:4,9]	0,04
Нет / No	2 (5%)	46 (94%)	48			
Всего / Total	9	63	72			
KREC						
Есть / Yes	9 (38%)	18 (61%)	27	2,179	[1,2:3,7]	0,04
Нет / No	5 (5%)	43 (94%)	48			
Всего / Total	27	61	75			

было принято решение сравнить концентрации высоковероятного маркера его функционального состояния (в первую очередь – TREC) у детей оперированных по поводу ВПС с сочетанной тимэктомией и таковых с сохраненным тимусом (табл. 6).

Относительный риск выявления крайне низких показателей TREC и KREC у детей с врожденными

пороками сердца и тимэктомией и таковых с сохраненным тимусом

Относительный риск выявления крайне низких показателей TREC для пациентов, перенесших тимэктомию составил – 1,6; 95% ДИ [0,9:2,7] Se составила 40%, Sp – 88%, что доказывает значительное влияние удаления вилочковой железы на Т-клеточный иммунитет детей, перенесших оперативное разрешение врожденного порока сердца.

ТАБЛИЦА 6. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ РИСК ВЫЯВЛЕНИЯ КРАЙНЕ НИЗКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ TREC И KREC У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА И ТИМЭКТОМИЕЙ И ТАКОВЫХ С СОХРАНЕННЫМ ТИМУСОМ

TABLE 6. RELATIVE RISK OF DETECTING EXTREMELY LOW TREC AND KREC VALUES IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DEFECTS AND THYMECTOMY AND THOSE WITH PRESERVED THYMUS

Тимэктомия в ходе оперативного разрешения ВПС Thymectomy during surgical resolution of congenital heart disease	Уровень TREC/KREC относительно нижнего порогового значения TREC/KREC level relative to the lower threshold value		Всего Total	ОР RR	ДИ CI	p
	Ниже Under	Выше Over				
TREC						
Есть / Yes	6 (40%)	9 (60%)	15	1,6	[0,9;2,7]	0,04
Нет / No	1 (11%)	8 (89%)	9			
Всего / Total	7	17	24			
KREC						
Есть / Yes	4(26%)	11 (74%)	15	1,09	[0,5;2,1]	0,04
Нет / No	2 (22%)	7 (78%)	9			
Всего / Total	6	18	24			

Относительный риск выявления показателей KREC ниже референсного уровня был близок к единице – 1,09; 95% ДИ [0,5;2,1], Se составила 26%, Sp – 77%, и говорит о том, что показатели В-клеточного иммунитета существенно не различаются у детей, перенесших тимэктомию и без таковой.

Выводы

Дети с высокой частотой инфекционной заболеваемости (более 8 в год) имеют значительно более высокий риск развития нарушений как со стороны Т-клеточного, так и В-клеточного им-

мунитета, в сравнении с условно здоровой популяцией сверстников 1 групп здоровья. Дети, имеющие оперированный врожденный порок сердца в анамнезе, так же имеют высокий риск развития иммунодефицитного состояния как со стороны клеточного, так и гуморального иммунитета, сравнительно со здоровой популяцией новорожденных детей. Пациенты, перенесшие тимэктомию во время оперативного лечения врожденных пороков сердца имеют более высокий риск развития иммунодефицитных состояний, затрагивающих преимущественно Т-клеточный иммунитет, в сравнении с группой детей, оперированных с сохранением вилочковой железы.

Список литературы / References

1. Борисенко Д.В., Ивкин А.А., Шукевич Д.Л. Современные методы ограничения системного воспалительного ответа при коррекции врожденных пороков сердца у детей в условиях искусственного кровообращения // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2021. Т. 10, № 2. С. 113-124. [Borisenko D.V., Ivkin A.A., Shukevich D.L. Modern methods of limiting the systemic inflammatory response in the correction of congenital heart defects in children under cardiopulmonary bypass. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy = Complex Problems of Cardiovascular Diseases*, 2021, Vol. 10. no. 2, pp. 113-124. (In Russ.)]
2. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Шершнева В.Н. Определение нормативных значений TREC и KREC в сухих пятнах крови новорожденных разного срока гестации в Свердловской области // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 85-98. [Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Shershnev V.N. Determination of reference values for TREC and KREC in dry blood spots of newborns from different gestation ages in Sverdlovsk Region. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 85-98. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-85-98.
3. Chiarini M., Zanotti C., Serana F., Sottini A., Bertoli D., Caimi L., Imberti L. T-cell receptor and K-deleting recombination excision circles in newborn screening of T- and B-cell defects: review of the literature and future challenges. *J. Public Health Res.*, 2013, Vol. 2, no. 1, pp. 9-16.

Авторы:

Ровда Ю.И. — д.м.н., профессор кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Ведерникова А.В. — старший преподаватель кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Шабалдин А.В. — д.м.н., профессор кафедры поликлинической педиатрии, пропедевтики детских болезней и последипломной подготовки ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца, отдела хирургии сердца и сосудов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Филипенко М.Л. — к.б.н., ведущий научный сотрудник и заведующий группой фармакогеномики ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Кемерово, Россия

Синицкая А.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Халивопуло И.К. — кардиохирург, заведующий отделением кардиохирургии № 2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Гришачева Е.О. — детский кардиолог отделения кардиохирургии № 2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Отставнов Г.А. — врач-педиатр педиатрического отделения АО «Клиническая медико-санитарная часть “Энергетик”», г. Кемерово, Россия

Шкитин Я.В. — ординатор по специальности педиатрия ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Миняйлова Н.Н. — д.м.н., профессор кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Хоботкова Т.С. — ассистент кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Дадонов В.В. — студент 5 курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Authors:

Rovda Yu.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Vedernikova A.V., Senior Lecturer, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Outpatient Pediatrics, Propaedeutics of Childhood Diseases and Postgraduate Training Kemerovo State Medical University; Leading Research Associate, Laboratory of Heart Diseases, Department of Cardiac and Vascular Surgery, Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Filipenko M.L., PhD (Biology), Leading Research Associate and Head of the Pharmacogenomics Group, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Sinitskaya A.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Khalivopulo I.K., Cardiac Surgeon, Head, Department of Cardiac Surgery No. 2, Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Grishacheva E.O., Pediatric Cardiologist, Department of Cardiac Surgery No. 2, Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Otstavnov G.A., Pediatrician, Pediatric Department, Clinical Medical and Sanitary Unit “Energetik”, Kemerovo, Russian Federation

Shkitin Ya.V., Resident in Pediatrics, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Minyailova N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Khobotkova T.S., Assistant Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Dadonov V.V., 5th year Student, Pediatric Faculty, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 04.04.2024
Принята к печати 24.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 04.04.2024
Accepted 24.04.2024

ГИПОГАММАГЛОБУЛИНЕМИЯ У РЕБЕНКА С АТИПИЧНЫМ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

**Журавлева Н.С.^{1,2}, Кутузова В.И.¹, Алмерзаева М.Р.²,
Минеева Н.Ю.², Маслов О.Г.²**

¹ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

² ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. В работе описан клинический случай, представляющий интерес за счет особенности течения атипичного гемолитико-уремического синдрома у ребенка, ассоциированного с мутацией в экзоне 6 гена CD46 (chr1:207940532G>C) в гоми/гомозиготном состоянии. Пациентка В., 8 лет, поступила в неотложном порядке с проявлениями геморрагического синдрома, острого повреждения почек. Ребёнок с отягощенным генеалогическим анамнезом, от 2-й беременности, протекавшей на фоне отягощенного акушерского анамнеза; роды первые, оперативные, на 38 неделе. Развитие заболевания у пациентки началось в раннем возрасте и протекало под маской гастроэнтерологической патологии, при этом не исключалось течение синдрома первичного иммунодефицита: наряду с частыми инфекционными заболеваниями и отставанием в физическом развитии, у пациентки имели место диспепсические расстройства, наиболее вероятно, связанные с нарушениями углеводного обмена. С 4-х лет у ребенка регистрировалась стойкая гипоальбуминемия, гипопроотеинемия, гипогаммаглобулинемия, требующая заместительной терапии внутривенными иммуноглобулинами. В 2021-2023 годах девочка неоднократно обследована в гастроэнтерологических стационарах г. Екатеринбурга и федеральных клиник г. Москвы: данных за протеинуряющие формы энтеропатий, первичный иммунодефицит не получено. Полноэкзомное секвенирование с валидацией результата, проведенное с целью исключения наследственной этиологии предполагаемой врожденной ошибки иммунитета, исключило течение первичного иммунодефицита. Однако, при референсе генетического исследования была выделена мутация гена CD46, которая в ряде публикаций ассоциирована с развитием гемолитико-уремического синдрома. Развитию симптомокомплекса тромботической микроангиопатии предшествовала лихорадка неустановленной этиологии. Зарегистрированы проявления микроангиопатического гемолиза, тромбоцитопения, гиперазотемия, потребление С3, протеинурия, макрогематурия. Также обнаружены гиперхолестеринемия, нарушение белкового обмена, повышение трансаминаз, ферритина. По данным ультразвукового исследования почек – диффузные изменения паренхимы, снижение скоростных показателей кровотока в обеих почечных артериях на всех уровнях. Диффе-

Адрес для переписки:

Журавлева Наталья Сергеевна
ФГБОУ ВО «Уральский государственный
медицинский университет»
620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3.
Тел.: 8 (904) 544-30-22.
E-mail: jurnas178@yandex.ru

Address for correspondence:

Natalya S. Zhuravleva
Ural State Medical University
3 Repin St
Yekaterinburg
620028 Russian Federation
Phone: +7 (904) 544-30-22.
E-mail: jurnas178@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.С. Журавлева, В.И. Кутузова, М.Р. Алмерзаева, Н.Ю. Минеева, О.Ю. Маслов «Гипогаммаглобулинемия у ребенка с атипичным гемолитико-уремическим синдромом» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 1001-1008.
doi: 10.15789/1563-0625-HIA-16935

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

For citation:

N.S. Zhuravleva, V.I. Kutuzova, M.R. Almerzaeva, N.Yu. Mineeva, O.Yu. Maslov "Hypogammaglobulinemia in a child with atypical hemolytic-uremic syndrome", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1001-1008.
doi: 10.15789/1563-0625-HIA-16935

© Zhuravleva N.S. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-HIA-16935

ренциальная диагностика осуществлялась с тромботической тромбоцитопенической пурпурой, аутоиммунной гемолитической анемией, антительной формой атипичного гемолитико-уремического синдрома, вирусными и бактериальными инфекциями, системной патологией, антифосфолипидным синдромом, гемобластозами. В заместительной почечной терапии ребенок не нуждался. По жизненным показаниям была инициирована комплемент-блокирующая терапия с применением экулизумаба, на фоне лечения постепенно купированы признаки основного заболевания. Длительное отсутствие у девочки каких-либо проявлений нефропатии может свидетельствовать о многообразии функций гена CD46 и различном фенотипическом проявлении его мутаций, что подтверждается рядом исследований. Анализ литературных источников и обнаружение генов «окружения» CD46 (CYBA, LYST, ARPC1B) при полноэкзомном секвенировании наводят на мысль о неоднозначности, полиморфности фенотипических проявлений комплемент-опосредованной мутации.

Ключевые слова: дети, тромботическая микроангиопатия, гипогаммаглобулинемия, мутация гена CD46, комплемент-блокирующая терапия

HYPOGAMMAGLOBULINEMIA IN A CHILD WITH ATYPICAL HEMOLYTIC-UREMIC SYNDROME

Zhuravleva N.S.^{a, b}, Kutuzova V.I.^a, Almerzaeva M.R.^b, Mineeva N.Yu.^b, Maslov O.G.^b

^a Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Regional Child Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. We present a unique clinical case of an atypical hemolytic-uremic syndrome in a child. The mutation in exon 6 of the CD46 gene (chr1:207940532G>C) leads to a homozygous or hemizygous missense substitution. An 8-year-old girl was urgently hospitalized with symptoms of hemorrhagic syndrome and acute kidney injury. The child from the second pregnancy with an aggravated obstetric anamnesis, the first operative labor at the 38th week, who has an aggravated genealogical anamnesis. Initially, the disease developed in the guise of gastroenterological pathology: the girl had dyspeptic disorders, most likely associated with pathology of carbohydrate metabolism, also frequent infectious diseases and a lag in physical development. From the age of 4 years, the girl suffered from persistent hypoalbuminemia, hypoproteinemia and hypogammaglobulinemia, requiring replacement therapy with intravenous immunoglobulins. She was repeatedly examined in gastroenterological departments in Yekaterinburg and Moscow in 2021-2023, but no data concerning protein-losing enteropathies or primary immunodeficiency was obtained. Also, the whole-exome sequencing with result validation hasn't confirmed an inherited etiology of the presumed congenital immune error. However, a CD46 gene mutation, associated with the development of hemolytic-uremic syndrome in some publications, was identified in the study. The signs of thrombotic microangiopathy were preceded by fever of unspecified etiology: microangiopathic hemolysis, thrombocytopenia, hyperazotemia, C3 consumption, proteinuria, and macrohematuria; hypercholesterolemia, protein metabolism disorder, increased transaminases, ferritin were also noted. According to the ultrasound of the kidneys there were diffuse changes in the parenchyma, decreased velocity indices of blood flow in both renal arteries at all levels. Differential diagnosis was carried out with thrombotic thrombocytopenic purpura, autoimmune hemolytic anemia, antinuclear form of atypical hemolytic-uremic syndrome, viral and bacterial infections, systemic pathology, antiphospholipid syndrome, and hemoblastosis. The girl didn't need a renal replacement therapy. When complement-blocking therapy with eculizumab was initiated on vital indications, the signs of the disease were gradually eliminated. The prolonged absence of nephropathy in the child may indicate the diversity of the CD46 gene's functions and different phenotypic manifestation of its mutations. Analysis of literature sources and detection of CD46 "environment" genes (CYBA, LYST, ARPC1B) by full-exome sequencing suggest ambiguity and polymorphism of phenotypic manifestations of complement-mediated mutation.

Keywords: children, thrombotic microangiopathy, hypogammaglobulinemia, CD46 gene mutation, complement-blocking therapy

Введение

Атипичный гемолитико-уремический синдром (аГУС) – системное заболевание с прогрессирующим течением и неблагоприятным прогнозом, относящееся к группе тромботических микроангиопатий (ТМА). Патогенетический механизм его обусловлен неконтролируемой активацией альтернативного пути комплемента наследственной или приобретённой природы, которая приводит к генерализованному тромбообразованию в сосудах микроциркуляторного русла, т.е. комплемент-опосредованной тромботической микроангиопатии. В современном представлении, этот клиничко-лабораторный синдром развивается без сопутствующей болезни, что отличает его от типичного ГУСа, возникающего вторично в результате STEC-ассоциированного гемоколита, пневмококковой пневмонии, системной красной волчанки, наследственных нарушений обмена кобаламина, патогенное воздействие лекарств и других состояний, способные вызвать ТМА [3, 4]. В триаду симптомов аГУС входят Кумбс-негативная гемолитическая анемия с фрагментацией эритроцитов (шизоцитоз), тромбоцитопения и развитие острой почечной недостаточности [3]. По данным исследований, распространенность аГУС колеблется от 1 до 7 случаев на 1 000 000 населения и наблюдается в 5–10% всех случаев ГУС у детей [3].

По данным авторов, в структуре аГУС на долю семейного приходится около 10–20% случаев, тогда как спорадический аГУС, при котором отсутствует семейный анамнез, встречается у 80–90% пациентов. Наследственные формы аГУС встречаются в любом возрасте, возникают у членов одной семьи, наследуются по аутосомно-рецессивному или аутосомно-доминантному типу, при этом только половина носителей мутации в семье в течение жизни имеет манифестацию ГУС. В 20–25% случаев аГУС ассоциируется с мутациями CFH, MCP – примерно у 15% пациентов, CFI – около 10% пациентов [3, 4].

Мембранный кофакторный белок (MCP, CD46) представляет собой трансмембранный белок типа I, экспрессирующийся почти на всех ядросодержащих клетках человека и способный специфически связываться с фрагментами активации комплемента C3b и C4b [9, 12]. CD46 обладает кофакторной активностью: он связывает фактор I, сериновую протеазу плазмы, которая протеолитически инактивирует связанные с CD46 C3b и C4b альтернативного пути комплемента [12]. Ген MCP расположен в кластере генов регуляторов активации комплемента (RCA), расположенном на длинном плече хромосомы 1q3.2 [9, 10, 12].

Помимо кофакторной активности, CD46 обладает важной иммуномодулирующей активностью. Костимуляция CD46 не только усиливает продукцию $IFN\gamma$ CD4⁺T-хелперными клетками и дифференцировку T-хелперов типа 1 (Th1), но также опосредует программу сокращения Th1, управляя индуцированной дифференцировкой Treg (iTreg). CD46 также обладает важными внутренними функциями CD8⁺T-клеток, гарантирующими нормальную секрецию $IFN\gamma$ и цитотоксичность [5].

Анализ сцепления, полногеномные исследования ассоциаций и недавний значительный прогресс в секвенировании следующего поколения выявили растущее число связанных с заболеванием генетических изменений в CD46. В частности, варианты MCP все чаще ассоциируются с воспалительными заболеваниями, особенно характеризующимися развитием тромбов в мелких кровеносных сосудах (тромботическая микроангиопатия), особенно с атипичным гемолитико-уремическим синдромом (аГУС) [11]. Известно, что эндотелий почек является основной мишенью для поврежденной системы комплемента. Становится очевидным, что основополагающим дефектом аГУСа является бесконтрольная активация альтернативного пути комплемента на поврежденных или подвергшихся стрессу клеточных поверхностях, что приводит к чрезмерной и вредной активации «измененного себя» [13].

Клинические проявления аГУС характеризуются значительным полиморфизмом. Внепочечные проявления заболевания обусловлены генерализованным характером тромботической микроангиопатии с поражением микроциркуляторного русла различных органов и систем [1, 3, 4].

Представленный в работе клинический случай представляет интерес за счет уникальности клинического развития атипичного гемолитико-уремического синдрома у ребенка, ассоциированного с мутацией в экзоне 6 гена CD46 (chr1:207940532G>C), приводящий к миссенс-замене (p.(Cys283Ser), NM_002389.4), в гомозиготном состоянии (OMIM: 612922). Мутации в гене CD46 описаны у пациентов с атипичным гемолитическим уремическим синдромом (OMIM: 612922).

Материалы и методы

Проведен анализ клиничко-анамнестических данных: первичной медицинской документации (истории болезни), результатов объективного обследования с осмотром, интерпретацией лабораторных исследований (клинических, биохимических анализов крови и мочи, гемостазиограммы, измерения СКФ (Schwartz), иммунологических), инструментальных методов диагностики (УЗИ

органов брюшной полости и забрюшинного пространства с доплерографией сосудов почек, МРТ головного мозга, ЭКГ), морфологического исследования биоптатов тонкой и толстой кишки, молекулярно-генетическое исследование методом секвенирования полного экзона пациентки.

Результаты и обсуждение

Пациентка С., 8 лет, поступила в нефрологическое отделение ГАУЗ СО «ОДКБ» в неотложном порядке 20.12.2023 с направительным диагнозом: Вторичная тромботическая микроангиопатия. Острая почечная недостаточность. Атипичный ГУС? Вторичная иммунная недостаточность, гипогаммаглобулинемия.

Из анамнеза жизни известно, что пациентка от 2 беременности (исход 1 беременности – регресс на 7-8 неделе), первых срочных оперативных родов в сроке гестации 38 недель. Девочка родилась с массой 3540 г, ростом 50 см, оценка по Апгар 7/8 баллов. В раннем возрасте наблюдалась у невролога с диагнозом «ППЦНС». Вакцинирована по индивидуальному графику.

Генеалогический анамнез отягощен по материнской (цирроз печени с летальным исходом, вирусный гепатит В у родственников 2-3 линии, артериальная гипертензия, гиперхолестеринемия) и отцовской (ЛСН с летальным исходом, гипотиреоз, доброкачественная гиперплазия предстательной железы с летальным исходом, остеоартрит коленных суставов, гиперхолестеринемия) линиям, у сиблинга (2017 г. р.) – гипогаммаглобулинемия, задержка физического развития. В генетическом исследовании от марта 2024 также выявлена мутация гена CD46.

В раннем возрасте у пациентки отмечались рецидивирующие интеркуррентные заболевания – респираторные (ринофарингит, катаральный отит, этмоидальный синусит, бронхит) и кишечные (клебсиеллезный энтероколит, норовирусный энтерит и др.) заболевания, ветряная оспа, герпетическая ангина.

Первые клинические проявления настоящего заболевания возникли на 1 году жизни с развитием диспепсического синдрома (отрыжка, срыгивания через 1,5 часа после еды, непереваренный стул, склонность к запорам) и УЗ-признаками гастро-эзофагеального и умеренного дуодено-гастрального рефлюкса, снижения эвакуационной функции желудка, спленомегалией, гипотонией желчного пузыря, диффузными изменениями паренхимы печени. При микробиологическом исследовании кала выделена *E. coli* с гемолитическими свойствами, в копрограмме – креаторея, непереваренные крахмал, клетчатка.

В 2019 году в биохимическом анализе крови впервые обнаружены гипопропротеинемия 34-35 г/л, гипоальбуминемия 18,8-20 г/л, в изолированный дефицит IgG ниже 2,1 г/л. Девочка обследована в гастроэнтерологическом отделении ГАУЗ СО «ДГКБ № 9» г. Екатеринбурга, инструментально диагностировано умеренное воспаление собственной пластинки ДПК. В ноябре 2019 года диагностирован субклинический гипотиреоз (уровень Т4 16,1 пмоль/л), рекомендована терапия калия йодидом в дозе 100 мкг 1 раз в сутки в течение 1 года.

В течение 2019-2021 гг. лабораторно сохранялись гипопропротеинемия до 40 г/л, гипоальбуминемия до 26,4 г/л, селективный дефицит IgG до 1,99 г/л, общий анализ мочи – в пределах нормы. С середины 2020 года в связи с сохраняющимися жалобами на диспепсию начата безглютеновая безмолочная диета.

Для выработки тактики дальнейшего ведения пациентка госпитализировалась в гастроэнтерологическое отделение ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» в октябре-ноябре 2021 года. Проводилась дифференциальная диагностика между протеинтериями энтеропатиями, в частности, с первичной лимфангиэктазией кишечника. Лабораторно в копрограмме – выраженное увеличение содержания альфа-1-антитрипсина в кале до 1081 мг/л, в связи с чем рекомендована низкожировая диета с дополнительной дотацией СЦТ. Со слов матери, спустя месяц после начала диеты состояние девочки ухудшилось: вновь усилились проявления диспепсии, отмечено снижение уровней альбумина и общего белка в крови, в связи с чем пациентка вернулась к соблюдению безмолочной диеты.

Инструментально выявлены воспалительные изменения желудка и двенадцатиперстной кишки, а также эпителия прямой, сигмовидной частей толстой кишки, умеренно выраженная лактазная недостаточность. С противовоспалительной целью начата терапия Месалазином в форме кишечнорастворимых гранул в дозе 50 мг/кг в сутки. При консультации аллерголога-иммунолога – диагноз «Атопический дерматит, распространенная форма, подострое течение. Пищевая аллергия, гастроинтестинальная форма».

С целью исключения генетически обусловленных вариантов лимфангиэктазии, а также редких генетических вариантов протеинтериями энтеропатий (в частности, нарушение гликозилирования) кровь пациентки исследована в МГНЦ им. академика Н.П. Бочкова. В результате полного секвенирования экзона обнаружена мутация гена CD46 chr1 :207940532G>C C/C 6 с.848G>C p.(Cys283Ser) н/д NM_002389.4 x32,

ген LYST chr1:235916419G>T G/T 26 с.7385C>A p.(Ala2462Glu) 0.0003436 NM_000081.4 x51, ген ARPC1B chr7:98983388C>G C/G 2 с.51C>G p.(Asn17Lys) 0.0002305 NM_005720.4.

В период с января по май 2022 года девочка перенесла ОРВИ с кишечным синдромом, SARS-CoV-2-инфекцию, герпетическую инфекцию, лабораторно зафиксирована нейтропения до $0,65 \cdot 10^9/\text{л}$.

Таким образом, развитие заболевания у пациентки началось в раннем возрасте и протекало под маской желудочно-кишечной патологии, при этом не исключалось течение синдрома первичного иммунодефицита: наряду с частыми инфекционными заболеваниями и отставанием в физическом развитии, у пациентки имели место диспепсические расстройства, предположительно связанные с нарушениями углеводного обмена. С 4-летнего возраста в биохимическом анализе мочи наблюдались стойкие гипопроteinемия и гипоальбуминемия, в дальнейшем присоединился изолированный дефицит IgG, повышение альфа-амилазы кала. Такая клинико-диагностическая картина требовала мультидисциплинарного подхода к установлению этиологии усиленной потери белка, в связи с чем девочка несколько раз обследована в отделениях гастроэнтерологического профиля (май-июнь 2022 г., август 2022 г., июль-август 2023 г.). При морфологическом исследовании выявлена очаговая лимфофоликулярная гиперплазия слизистой оболочки тонкой и толстой кишки. При иммуофлюоресцентном окрашивании в собственной пластинке определялось отсутствие либо нахождение в минимальном количестве IgA, IgG, что не исключало течение иммунодефицита. При иммунофенотипировании лимфоцитов отмечалось повышение всех видов лимфоцитов, соотношение CD4/CD8 2,4 (N = 1,1-1,4). При проведении видеокапсульной энтероскопии кишечная лимфангиэктазия исключена. По данным КТ органов грудной клетки диагностированы единичные мелкие очаговоподобные уплотнения обоих легких неуточненной этиологии, рекомендована консультация фтизиатра. С учетом воспалительных изменений верхних отделов ЖКТ, пациентка получала курсами антацидную, антисекреторную, прокинетиическую терапию.

В ходе исследования ФВД выявлены умеренные нарушения проходимости на уровне периферических бронхов, девочка вновь консультирована аллергологом-иммунологом. По данным КТ ОГК сохранялись очаговые изменения, девочка консультирована фтизиатром, выявлена инфицированность *M. tuberculosis* при отсутствии данных за активное течение туберкулеза. Таким образом, высказано предположение о неспецифической

этиологии изменений в легких. Продолжена безмолочная, безглютеновая диета с постепенным расширением питания по переносимости.

За госпитализации проводилась дифференциальная диагностика между лимфангиэктазией, воспалительными заболеваниями кишечника, болезнью Уиппла, болезнью включения микроворсин, которые могли бы быть причиной гипопроteinемии и гипогаммаглобулинемии в рамках мальабсорции на фоне эрозивных или структурных изменений ЖКТ. При консультациях генетика исключено течение ПИД. По рекомендации гастроэнтерологов, девочка продолжительное время находилась на безлактозной, безглютеновой диете, на фоне которой отмечался регресс диспепсических явлений. Обращает на себя внимание тот факт, что за все время течения заболевания показатели общего анализа мочи находились в пределах референсных значений, что исключало поражение почек из дифференциально-диагностического ряда.

В ходе исследования ФВД выявлены умеренные нарушения проходимости на уровне периферических бронхов, рекомендована консультация аллерголога-иммунолога. По данным КТ ОГК сохранялись очаговые изменения, девочка консультирована фтизиатром, выявлена инфицированность *M. tuberculosis* при отсутствии данных за активное течение туберкулеза. Таким образом, высказано предположение о неспецифической этиологии изменений в легких. Продолжена безмолочная, безглютеновая диета с постепенным расширением питания по переносимости.

В период между госпитализациями (2022 г.) пересмотрены результаты клинического секвенирования генома, выявлены не описанные ранее мутации в экзоне 06 гена CD46 (OMIM 120920), нуклеотидный вариант с.848G>C (chr1:207767187G>C; NM_172351.3) в гомозиготном состоянии, приводящий к аминокислотному варианту p.C283S. На момент консультации генетиком наследственная этиология заболевания не установлена, рекомендована повторный прием после дообследования сибса.

В ГАУЗ СО «ОДКБ» девочка поступила с проявлениями геморрагического синдрома, острого повреждения почек, белково-энергетической недостаточности (SDS роста 0,18, SDS веса -1,34; BMI SDS -1,88). Развитию симптомокомплекса ГМА в виде микроангиопатического гемолиза, тромбоцитопении и ОПП, предшествовала лихорадка неустановленной этиологии. При поступлении лабораторно зарегистрированы признаки микроангиопатического гемолиза (Hb 100 г/л, шизоциты 2,3%, ЛДГ 3573 Ед/л), тромбоцитопения (12 тыс/мкл), гиперазотемия (мочевина 18,33 ммоль/л, креатинин 233 мкмоль/л,

рСКФ 10,6 мл/мин/1,73м²), потребление С3 (67,53 мг/дл), протеинурии (3,365 г/л), макрогематурия. Параллельно выявлены гиперхолестеринемия (6,32 ммоль/л), нарушение белкового обмена (общий белок 36 г/л, альбумин 21,5 г/л), повышение АЛТ/АСТ (98/427 Ед/л), ферритина (5560 нг/мл). По данным УЗИ – диффузные изменения паренхимы почек, снижение скоростных показателей кровотока в обеих почечных артериях на всех уровнях; при МРТ головного мозга выявлены перикаллезные липомы, умеренное расширение наружных ликворных пространств.

Дифференциальная диагностика осуществлялась с ТТП, аутоиммунной гемолитической анемией, антительной формой аГУС, вирусными и бактериальными инфекциями, системной патологией, АФС, гемобластозами. В заместительной почечной терапии ребенок не нуждался. Исключение иных форм ТМА, выявление гомозиготной мутации гена CD46, кодирующего данный белок, относящегося к системе комплемента, а также получение положительной динамики на фоне проведения антикомплементарной терапии, подтвердило течение аГУС в данном случае.

В ходе госпитализации проводилась дифференциальная диагностика с ТТП (активность ADAMTS13 82%), аутоиммунной гемолитической анемией (антиэритроцитарные антитела отрицательно, прямая проба Кумбса отрицательная), STEC-ГУС (ПЦР ДНК ЕНЕС кала отрицательно), антительной формой аГУС (683 AU/mL при норме менее 1500 AU/mL), вирусными и бактериальными инфекциями, системной патологией, АФС, гемобластозами. В отделении проводилась антибактериальная, ферментативная, гастропротективная, антигипертензивная, антикоагулянтная терапия, коррекция гипоальбуминемии, анемии (трансфузия эритроцитарной взвеси № 1), плазмотерапия (трансфузия гепаринизированной СЗП № 2). В ЗПТ ребенок не нуждался.

По жизненным показаниям была инициирована комплемент-блокирующая терапия с применением экулизумаба от 21.12.23 г. Привита против менингококковой инфекции (Менактра от 26.12.23 г.). На фоне продолжающейся терапии экулизумабом постепенно купированы признаки ТМА: уровень тромбоцитов нормализовался через 7 дней, ЛДГ и креатинин на 19 сутки, С3 на 15 сутки, уменьшилась выраженность протеинурии (Нв 94-86-77-101-94-95 г/л; тромбоциты 21-26-57-118-352-415 тыс/мкл, ЛДГ 2788-2890-1599-1015-734-483-311 Ед/л, креатинин 384-445-415-319-146-71-56 мкмоль/л; С3 67,53-114 мг/дл; СПУ 2,23 г/сут – 0,82 г/сут). На 4 сутки купированы признаки трансамината, на 10 – нормализовался ферритин. Следует подчеркнуть, что на

фоне антикомплементарной терапии нормализовались также показатели иммунограммы.

В ходе проведенного литературного обзора нам удалось выделить случаи с необычным дебютом аГУС. Так, авторы исследования [1] сообщили о наблюдении, в котором манифестация заболевания у пациентки 21 года протекала по типу кишечной инфекции (выраженный интоксикационный синдром, диарея с примесью крови, поражение дистальной трети сигмовидной и прямой кишки по данным колоноскопии). Такая клиническая картина затруднила постановку диагноза «аГУС», основным внепочечным проявлением было поражение желудочно-кишечного тракта в виде ишемического колита с последующим присоединением поражения ЦНС в виде инфаркта головного мозга.

В нашем наблюдении развитие заболевания у пациентки началось в раннем возрасте и протекало под маской гастроэнтерологической патологии, при этом не исключалось течение синдрома первичного иммунодефицита: наряду с частыми инфекционными заболеваниями и отставанием в физическом развитии, у пациентки имели место диспепсические расстройства, наиболее вероятно, связанные с нарушениями углеводного обмена. Для исключения наследственной этиологии предполагаемой врожденной ошибки иммунитета было проведено полноэкзомное секвенирование, с последующей валидацией результата исследования: было исключено течение первичного иммунодефицита. Однако, при референсе генетического исследования, была выделена мутация гена CD46, которая в ряде публикаций ассоциирована с развитием гемолитико-уремического синдрома.

До последней госпитализации у девочки отсутствовали какие-либо проявления нефропатии. Это может свидетельствовать о многообразии функций гена CD46 и различном фенотипическом проявлении его мутаций, что подтверждается рядом исследований. Так, одной из функций белка MCP служит передача сигналов через специальные структуры (какие), что может критически влиять на поведение клеток. Доказано, что CD46-опосредованная внутриклеточная передача сигналов повышает активность и выживаемость макрофагов, включая продукцию цитокинов и оксида азота, а также презентацию антигена [13]; регулирует аутофагию эпителиальных клеток при инвазии патогена или окислительном стрессе, модулирует активацию Т-клеток путем предоставления костимулирующих сигналов во время взаимодействия TCR и для оптимальных эффекторных функций CD8⁺T-клеток [5, 9]. Возможности передачи сигналов CD46 лучше всего изучены в CD4⁺T-клетках [14,

15]. Действительно, более детальное изучение CD46 во время активации Т-клеток привело к открытию внутриклеточной системы комплемента, или комплосомы, которая способствует иммунной защите посредством ключевых взаимодействий, включая модуляцию поглощения питательных веществ и клеточного метаболизма [6, 7].

Заключение

Анализ литературных источников и обнаружение генов «окружения» CD46 (CYBA, LYST, ARPC1B) при полноэкзомном секвенировании

наводят нас на мысль о неоднозначности, полиморфности фенотипических проявлений комплемент-опосредованной мутации [2].

Благодарности

Мы выражаем глубокую благодарность нашим коллегам из ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, а также Центра гравитационной хирургии крови и гемодиализа ГБУЗ ДГКБ св. Владимира ДЗМ, принимавших участие в обследовании и лечении нашей пациентки.

Список литературы / References

1. Озерова О.С., Полторыхина Е.А., Варданян А.В., Майновская О.А., Веселов В.В., Чернышов С.В. Ишемический колит на фоне атипичного гемолитико-уремического синдрома (клиническое наблюдение) // Колопроктология, 2019. Т. 18, № 2 (68). С. 82-89. [Ozerova O.S., Poltorykhina E.A., Vardanyan A.V., Maynovskaya O.A., Veselov V.V., Chernyshov S.V. Ischemic colitis in an adult patient with atypical hemolytic uremic syndrome (case report). *Koloproktologia = Coloproctology*, 2019, Vol. 18, no. 2 (68), pp. 82-89. (In Russ.)]
2. Тузанкина И.А., Болков М.А., Журавлева Н.С., Васенева Ю.О., Шинвари Х., Щипачева О.В. Фенотипические варианты манифестации гомозиготной делеции сегмента хромосомы 1, захватывающей участка гена *CFHR3* // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 569-576. Tuzankina I.A., Bolkov M.A., Zhuravleva N.S., Vaseneva Yu.O., Shinvari Kh., Schipacheva O.V. Phenotypic manifestation of homozygous partial deletion of the chromosome 1 segment spanning *CFHR3* region. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 3, p. 569-576. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PMO-1901.
3. Цыгин А.Н., Вашурина Т.В., Маргиева Т.В., Ананьин П.В., Мазо А.М., Пушков А.А., Савостьянов К.В. Федеральные клинические рекомендации по оказанию помощи детям с гемолитико-уремическим синдромом // Педиатрическая фармакология, 2015. Т. 12, № 4. С. 447-455. [Tsygin A.N., Vashurina T.V., Margieva T.V., Ananyin P.V., Mazo A.M., Pushkov A.A., Savostianov K.V. Federal Clinical Guidelines on Rendering Help to Children with Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2015, Vol. 12, no. 4, pp. 447-455. (In Russ.)]
4. Эмирова Х.М., Абасеева Т.Ю., Баранов А.А., Вашакмадзе Н.Д., Вишнева Е.А., Генералова Г.А., Захарова Е.Ю., Калужная Т.А., Куцев С.И., Намазова-Баранова Л.С., Макарова Т.П., Маргиева Т.В., Мстиславская С.А., Музуров А.Л., Панкратенко Т.Е., Шилова М.М., Федосеев М.В. Современные подходы к ведению детей с атипичным гемолитико-уремическим синдромом // Педиатрическая фармакология, 2022. Т. 19, № 2. С. 127-152. [Emirova Kh.M., Abaseeva T.Yu., Baranov A.A., Vashakmadze N.D., Vishneva E.A., Generalova G.A., Zakharova E.Yu., Kaluzhnaya T.A., Kutsev S.I., Namazova-Baranova L.S., Makarova T.P., Margieva T.V., Mstislavskaya S.A., Muzurov A.L., Pankratenko T.E., Shilova M.M., Fedoseenko M.V. Modern Approaches to the Management of Children with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2022, Vol. 19, no. 2, pp. 127-152. (In Russ.)]
5. Arbore G., West E.E., Rahman J., Le Friec G., Niyonzima N., Pirooznia M., Tunc I., Pavlidis P., Powell N., Li Y., Liu P., Servais A., Couzi L., Fremeaux-Bacchi V., Placais L., Ferraro A., Walsh P.R., Kavanagh D., Afzali B., Lavender P., Lachmann H.J., Kemper C. Complement receptor CD46 co-stimulates optimal human CD8(+) T cell effector function via fatty acid metabolism. *Nat. Commun.*, 2018., Vol. 9, Iss. 1, pp. 4186-4201.
6. Arbore G., Kemper C. A novel "complement-metabolism-inflammasome axis" as a key regulator of immune cell effector function. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, pp. 1563-1573.
7. Arbore G., Kemper C., Kolev M. Intracellular complement – the complosome – in immune cell regulation. *Mol. Immunol.*, 2017, Vol. 89, pp. 2-9.
8. Geller A., Yan J. The role of membrane bound complement regulatory proteins in tumor development and cancer immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1074. doi: 10.3389/fimmu.2019.01074.
9. Liszewski M.K., Atkinson J.P. Membrane cofactor protein (MCP; CD46): deficiency states and pathogen connections. *Curr. Opin. Immunol.*, 2021, Vol. 72, pp. 126-134.
10. Liszewski M.K., Kemper C. Complement in motion: the evolution of CD46 from a complement regulator to an orchestrator of normal cell physiology. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 203, pp. 3-5.
11. Liszewski M.K., Atkinson J.P. Complement regulator CD46: genetic variants and disease associations. *Hum Genomics*, 2015, Vol. 9, 7. doi: 10.1186/s40246-015-0029-z.
12. Meyer B.J., Kunz N., Seki S., Higgins R., Ghosh A., Hupfer R., Baldrich A., Hirsiger J.R., Jauch A.J., Burgener A.V., Löttscher J., Aschwanden M., Dickenmann M., Stegert M., Berger C.T., Daikeler T., Heijnen I.,

Navarini A.A. Rudin C. Yamamoto H. Kemper C. Hess C. Recher M. Immunologic and Genetic Contributors to CD46-Dependent Immune Dysregulation. *J. Clin. Immunol.*, 2023, Vol. 4, Iss. 8, pp. 1840-1856.

13. Wang X., Zhang D., Sjolinder M., Wan Y., Sjolinder H. CD46 accelerates macrophage-mediated host susceptibility to meningococcal sepsis in a murine model. *Eur. J. Immunol.*, 2017, Vol. 47, pp. 119-130.

14. West E.E., Kemper C. Complement and T cell metabolism: food for thought. *Immunometabolism*, 2019, Vol. 1, e190006. doi: 10.20900/immunometab20190006.

15. West E.E., Kunz N., Kemper C. Complement and human T cell metabolism: location, location, location. *Immunol. Rev.*, 2020, Vol. 295, Iss. 1, pp. 68-81.

Авторы:

Журавлева Н.С. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной педиатрии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач-нефролог детского консультативно-диагностического центра ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Россия

Кутузова В.И. — студентка 6 курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Алмерзаева М.Р. — врач-нефролог нефрологического отделения ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Россия

Минеева Н.Ю. — врач-нефролог нефрологического отделения ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Россия

Маслов О.Г. — к.м.н., заведующий нефрологическим отделением ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Zhuravleva N.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Hospital Pediatrics, Ural State Medical University; Nephrologist, Regional Child Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russian Federation

Kutuzova V.I., Student of the 6th course, Faculty of Pediatrics, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

Almerzaeva M.R., Nephrologist, Regional Child Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russian Federation

Mineeva N.Yu., Nephrologist, Regional Child Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russian Federation

Maslov O.G., PhD (Medicine), Head, Nephrological Department, Regional Child Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 03.04.2024

Отправлена на доработку 12.04.2024

Принята к печати 17.04.2024

Received 03.04.2024

Revision received 12.04.2024

Accepted 17.04.2024

РОЛЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ В ДЕТСКОМ ВОЗРАСТЕ

Быстрицкая Е.П.¹, Мурашкин Н.Н.^{2,3}, Наумова Е.А.⁴,
Материкин А.И.², Солнцева В.К.³

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

⁴ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. Атопический дерматит (АтД) — генетически детерминированное хроническое воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зудом, рецидивирующим течением, возрастными особенностями локализации и морфологии очагов поражения. Среди этиологических факторов, способствующих развитию АтД, принято выделять несколько составляющих: аллергические реакции, воспалительные реакции в коже, влекущие за собой нарушение барьерной функции, влияние и взаимодействие генетических факторов и факторов окружающей среды. Эпигенетические механизмы также играют одну из ключевых ролей в иммунной регуляции. Целью этой работы является изучение полногеномного профиля метилирования в коже у детей с АтД в стадии обострения, а также определение изменения уровня экспрессии генов иммунного ответа, связанных общими сигнальными путями, на фоне терапии. С помощью полногеномного секвенирования исследовалось метилирование в образцах кожи от пациентов с АтД и контроля. Последовательно проводились этапы биоинформатической обработки данных. Изменение уровня экспрессии генов *TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1* до и после лечения проводили при помощи ОТ-ПЦР-РВ на образцах мононуклеарных клеток крови. При сравнении образцов от пациентов с АтД и здоровых детей были показаны изменения в метилировании 2364 областей геномной ДНК с соответствующими им конкретными генами. Среди выявленных генов отбирались те, которые имеют отношение к процессам, связанным с патогенезом АтД. На следующем этапе оценивали изменение экспрессии описываемых показателей иммунитета (*TLR2*, *TLR9*; *IL4*, *IL13*, *DEFB1*, *CAMP*) согласно типу применяемого лечения в динамике. Для этого пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от назначения системной терапии. Через три месяца после лечения уровень экспрессии по всем изучаемым показателям иммунитета снижался. Однако достоверное снижение экспрессии практически по всем параметрам (за исключением гена *DEFB1*)

Адрес для переписки:

Быстрицкая Елизавета Петровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (915) 155-86-18.
E-mail: lisabystritskaya@gmail.com

Address for correspondence:

Elizaveta P. Bystritskaya
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
5a Malyy Kazenny Lane
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (915) 155-86-18.
E-mail: lisabystritskaya@gmail.com

Образец цитирования:

Е.П. Быстрицкая, Н.Н. Мурашкин, Е.А. Наумова,
А.И. Материкин, В.К. Солнцева «Роль эпигенетических
факторов при атопическом дерматите в детском
возрасте» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 5. С. 1009-1016.
doi: 10.15789/1563-0625-TRO-16816

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

For citation:

E.P. Bystritskaia, N.N. Murashkin, E.A. Naumova,
A.I. Materikin, V.K. Solntseva "The role of epigenetic
factors in childhood atopic dermatitis", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5,
pp. 1009-1016.
doi: 10.15789/1563-0625-TRO-16816

© Bystritskaia E.P. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-TRO-16816

регистрируется в группе, в которой в дополнение к топическому лечению применялась системная терапия (дупилумаб). При этом индекс SCORAD после проведения лечения в среднем улучшился на 63% и составил $17 \pm 6,0$ баллов. Таким образом, системная терапия, направленная на подавление сигналов цитокинов IL-4 и IL-13, опосредованно приводит и к нормализации уровней экспрессии факторов врожденного иммунитета. Изучение регуляции молекулярно-генетических механизмов иммунитета, вовлеченных в процессы воспалительных реакций при АтД, способствует уточнению иммунопатогенеза этого заболевания, определению диагностических маркеров и мишеней для таргетной лекарственной терапии.

Ключевые слова: атопический дерматит, эпигенетика, метилирование, врожденный иммунитет, экспрессия генов, цитокины

THE ROLE OF EPIGENETIC FACTORS IN CHILDHOOD ATOPIC DERMATITIS

Bystritskaia E.P.^a, Murashkin N.N.^{b,c}, Naumova E.A.^d, Materikin A.I.^b, Solntseva V.K.^c

^a I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

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

^d M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Atopic dermatitis (AD) is a genetically determined chronic inflammatory skin disease characterized by itching, relapsing course, age-related features of the lesion morphology and localization. The etiological factors contributing to the development of AD are: allergic reactions, inflammatory reactions in the skin, leading to a barrier dysfunction, the affect and interaction of genetic and environmental factors. Epigenetic mechanisms also play a key role in immune regulation. The aim of this work is to study the genome-wide methylation profile in the skin of children with AD in the acute stage, as well as to determine changes in the expression level of immune response genes associated with common signaling pathways during therapy. Whole-genome sequencing was conducted to examine methylation in the skin samples from AD patients and controls. The stages of bioinformatics data processing were carried out. Changes in the expression levels of the *TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, and *DEFB1* genes before and after treatment were carried out using RT-PCR-RT on samples of mononuclear blood cells. When comparing samples from patients with AD and healthy children, changes were shown in the methylation of 2364 regions of genomic DNA with their corresponding specific genes. Among the identified genes, those related to processes associated with the pathogenesis of AD were selected. At the next stage, changes in the expression of the described immunity factors (*TLR2*, *TLR9*, *IL-4*, *IL-13*, *DEFB1*, *CAMP*) were assessed over time according to the type of treatment. For this purpose, patients were divided into 2 groups depending on the prescription of systemic therapy. Three months after treatment, the level of expression for all studied immune factors decreased. However, a significant decrease in expression for almost all parameters (except for the *DEFB1* gene) was recorded in the group in which systemic therapy (dupilumab) was used in addition to topical treatment. At the same time, the SCORAD index after treatment improved by an average of 63% and amounted to 17 ± 6.0 points. Thus, systemic therapy aimed at suppressing signaling of IL-4 and IL-13 cytokines indirectly leads to normalization of the expression levels of innate immune factors. Studying the regulation of molecular genetic mechanisms of immunity involved in the processes of inflammation in AD helps to clarify the immunopathogenesis of this disease, determine diagnostic markers and targets for drug therapy.

Keywords: atopic dermatitis, epigenetics, methylation, innate immunity, gene expression, cytokines

Введение

Атопический дерматит (АтД) — генетически детерминированное хроническое воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зу-

дом, рецидивирующим течением, возрастными особенностями локализации и морфологии очагов поражения [2, 4]. Распространенность АтД среди детского населения составляет 20%, среди

взрослого – до 8%. Дебют заболевания приходится на детский возраст.

Среди этиологических факторов, способствующих развитию АтД, принято выделять несколько составляющих. К ним относятся аллергические реакции, воспалительные реакции в коже, влекущие за собой нарушение барьерной функции, влияние и взаимодействие генетических факторов и факторов окружающей среды [5]. Эпигенетические механизмы также играют одну из ключевых ролей в иммунной регуляции и находятся под влиянием разнообразных факторов окружающей среды, приводящих к модификации активности генов.

Целью этой работы является изучение полногеномного профиля метилирования в коже у детей с АтД в стадии обострения, а также определение изменения уровня экспрессии генов иммунного ответа, связанных общими сигнальными путями, на фоне терапии.

Материалы и методы

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» и одобрено локальным этическим комитетом при ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» (протокол заседания локального совета по этике №5 от 12 мая 2022 г.). Пациенты подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

В исследование был включен 81 ребенок, из них основную группу составили 55 пациентов с АтД. Участниками исследования являлись 34 мальчика и 21 девочка; средний возраст составил 14 лет (от 6 до 18 лет). В исследуемые группы были включены пациенты с различной степенью тяжести АтД: среднетяжелой ($n = 38$) и тяжелой ($n = 17$). Контрольную группу составили 26 относительно здоровых детей от 6 до 18 лет. Тяжесть АтД оценивали с применением метода SCORAD (среднетяжелая форма АтД: от 25 до 50; тяжелая форма: более 50).

Все пациенты получали препараты наружного применения (местные глюкокортикостероиды средней и высокой активности, топические ингибиторы кальциневрина); 20 пациентов основной группы дополнительно получали системную терапию препаратом дупилумаб.

Для исследования метилирования было проведено полногеномное секвенирование трех образцов кожи от пациентов с АтД и трех контрольных образцов. Материалом для исследования являлись биоптаты пораженных участков кожи, из которых выделяли геномную ДНК набором реагентов Monarch Genomic DNA purification kit

(New England Biolabs, США). Использовали секвенатор III поколения MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) с проточными ячейками SpotON Flow Cell (R9.4.1). В ходе работы применяли протокол лигирования ДНК №SQK-LSK109.

Биоинформатический анализ проводился поэтапно (получение сырых данных – определение модифицированных (метилированных) оснований – картирование на референсный геном (GRCh38.dna) – сортировка и индексация выравнивания, агрегация 5mC – фильтр непарных прочтений – объединение файлов – определение дифференциально метилированных участков генома). При анализе паттернов метилирования использовали статистический показатель areaStat (сумма значений t-тестов для каждого сайта дифференциального метилирования в последовательности гена или на выбранном интервале ДНК). Разница уровней метилирования у пациентов с АтД и здоровых добровольцев считалась тем больше, чем больше значение areaStat, и наоборот. Для систематизации выявленных дифференциально метилированных генов был проведен их онтологический анализ с использованием электронного ресурса DAVID.

Для оценки изменения уровня экспрессии генов *TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*, *CAMP*, *DEFB1* до и после лечения выделяли РНК (Extract RNA, Евроген, Россия) из мононуклеарных клеток крови пациентов и здорового контроля, и далее проводили реакцию обратной транскрипции («ОТ-1», Синтол, Россия) и ПЦР-РВ. В реакции использовались специфические последовательности праймеров (Синтол, Россия), которые подбирались с помощью программы Primer-BLAST (NCBI). ПЦР-анализ в режиме реального времени проводился на приборе Rotor-Gene Q (QIAGEN Hiden, Германия). Реакция проводилась при следующих условиях: 1) 95°C – 5 мин – 1 цикл; 2) 95°C – 15 сек, 60 °C (или 58 °C) – 50 сек – 40 циклов. Обработка полученных данных (Ct) проводилась методом $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства β -актина (*ACTB*) [6].

Анализ полученных данных, представленных в относительных единицах, проводился в несколько этапов в программе MS Excel. Статистическая достоверность между группами данных рассчитывалась при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни, а также Н-теста Краскела–Уоллиса.

Результаты и обсуждение

Сводные данные по описанным и классифицированным дифференциально метилированным генам представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО МЕТИЛИРОВАННЫЕ ГЕНЫ, ПОТЕНЦИАЛЬНО ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ПАТОГЕНЕЗ АТД
TABLE 1. DIFFERENTIALLY METHYLATED GENES POTENTIALLY INVOLVED IN AD PATHOGENESIS

Ген Gene	Значение areaStat areaStat value	Статус метилювания Methylation status	Возможный сигнальный путь Possible signaling pathway
Кератиноциты Keratinocytes			
Процессы транскрипции и транскрипционные модификации: Transcription processes and modifications:			
<i>FLNA</i>	-1208,77	деметилюван demethylated	регуляция актинового цитоскелета actin cytoskeleton regulation
<i>CEBPG</i>	57,04	метилюван methylated	ЖАК-, PI3K/Akt-, p38 MAPK-сигнальный путь JAK-, PI3K/Akt-, p38 MAPK-signaling pathway
<i>CARD11</i>	102,69	метилюван methylated	NF-κB-сигнальный путь NF-κB-signaling pathway
<i>NFIA</i>	112,52	метилюван methylated	дифференцировка нейробластов, кератиноцитов neuroblasts and keratinocytes differentiation
<i>EHMT1</i>	143,67	метилюван methylated	модификация хроматина chromatin modification
<i>MAPK14</i>	173,79	метилюван methylated	p38 MAPK-сигнальный путь p38 MAPK-signaling pathway
<i>RUNX3</i>	1409,76	метилюван methylated	Th1-, Th2-клеточная дифференцировка Th1-, Th2- differentiation
Процессы, связанные с работой малых ГТФаз: Small GTPases processes:			
<i>CCR7</i>	-98,72	деметилюван demethylated	хемокиновый сигнальный путь chemokine signaling pathway
<i>DOCK1</i>	-67,24	деметилюван demethylated	регуляция актинового цитоскелета actin cytoskeleton regulation
<i>DOCK2</i>	104,57	метилюван methylated	хемокиновый сигнальный путь chemokine signaling pathway
Поддержание целостности и нормального функционирования кожного барьера: Normal functioning of the skin barrier:			
<i>HIC1</i>	-1173,00	деметилюван demethylated	WNT-зависимый сигнальный путь WNT-dependent signaling pathway
<i>ALOX12</i>	-730,90	деметилюван demethylated	метаболический сигнальный путь metabolic signaling pathway
<i>PRSS3</i>	-206,14	деметилюван demethylated	PRSS3-PAR-сигнальный путь PRSS3-PAR-signaling pathway
<i>FYN</i>	-80,57	деметилюван demethylated	регуляция актинового цитоскелета actin cytoskeleton regulation
<i>CTNBP1</i>	-71,69	деметилюван demethylated	WNT-зависимый сигнальный путь WNT-dependent signaling pathway
<i>BARX1</i>	-60,16	деметилюван demethylated	WNT-зависимый сигнальный путь WNT-dependent signaling pathway
<i>TLE1</i>	-56,83	деметилюван demethylated	WNT-зависимый сигнальный путь WNT-dependent signaling pathway

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Ген Gene	Значение areaStat areaStat value	Статус метилювания Methylation status	Возможный сигнальный путь Possible signaling pathway
GRB10	-49,90	деметилюван demethylated	WNT-зависимый сигнальный путь WNT-dependent signaling pathway
TRABD2B	48,52	метилюван methylated	WNT-зависимый сигнальный путь WNT-dependent signaling pathway
XIRP2	52,01	метилюван methylated	регуляция актинового цитоскелета actin cytoskeleton regulation
WWOX	53,44	метилюван methylated	WNT-зависимый сигнальный путь WNT-dependent signaling pathway
TAX1BP3	60,67	метилюван methylated	WNT-зависимый сигнальный путь WNT-dependent signaling pathway
FAT1	66,24	метилюван methylated	регуляция актинового цитоскелета actin cytoskeleton regulation
DEFB124	113,86	метилюван methylated	MAPK-, NF-κB-сигнальный путь MAPK-, NF-κB-signaling pathway
DACT3	3633,33	метилюван methylated	WNT-зависимый сигнальный путь WNT-dependent signaling pathway
Иммунные клетки Immune cells			
Процессы транскрипции и транскрипционные модификации: Transcription processes and modifications:			
GATA3	-298,67	деметилюван demethylated	Th1-, Th2-, Th17-клеточная дифференцировка Th1-, Th2-, Th17-cell differentiation
GATA4	-99,13	деметилюван demethylated	Ca-зависимый сигнальный путь Ca dependent signaling pathway
VAV1	-63,49	деметилюван demethylated	хемокиновый сигнальный путь chemokine signaling pathway
MAP3K8	-61,30	деметилюван demethylated	p38 MAPK-сигнальный путь p38 MAPK-signaling pathway
MAP2K6	-42,97	деметилюван demethylated	p38 MAPK-сигнальный путь p38 MAPK-signaling pathway
MAP2K4	96,00	метилюван methylated	MKK/JNK-сигнальный путь MKK/JNK-signaling pathway
MAP2K2	140,56	метилюван methylated	MKK/JNK-сигнальный путь MKK/JNK-signaling pathway
JAK3	376,90	метилюван methylated	JAK-STAT сигнальный путь JAK-STAT signaling pathway
Регуляция дифференцировки дендритных клеток: Regulation of dendritic cell differentiation:			
SLC9A6	-687,81	деметилюван demethylated	дифференцировка дендритных клеток dendritic cell differentiation
PAK2	-116,90	деметилюван demethylated	MAPK-сигнальный путь; дифференцировка дендритных клеток MAPK-signaling pathway; dendritic cell differentiation
EPHB2	-75,00	деметилюван demethylated	EphrinB2-сигнальный путь; дифференцировка дендритных клеток EphrinB2-signaling pathway; dendritic cell differentiation

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В МНК У ПАЦИЕНТОВ С АтД В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРИМЕНЯЕМОЙ ТЕРАПИИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. PBMS GENE EXPRESSION IN AD PATIENTS DEPENDING ON THE THERAPY USED, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Экспрессия гена (значения 2 ^{-ΔΔCt} , отн. ед.) Gene expression (2 ^{-ΔΔCt}), rel. units	1 Пациенты с АтД до лечения, топическая терапия Patients with AD before treatment, topical therapy	2 Пациенты с АтД после лечения, топическая терапия Patients with AD after treatment, topical therapy	3 Пациенты с АтД до лечения, топическая + системная терапия Patients with AD before treatment, topical + systemic therapy	4 Пациенты с АтД после лечения, топическая + системная терапия Patients with AD after treatment, topical + systemic therapy	p
TLR2	4476,77 (66,66-19833,37)	104,69 (18,13-10809,41)	9069,19 (168,89-173568,39)	30,33* (3,84-1968,13)	p _{1/2} – ns p _{3/4} < 0,05
TLR9	935,76 (35,24-3467,54)	110,38 (20,17-1201,19)	955,43 (256,74-4259,49)	56,89* (7,67-910,18)	p _{1/2} – ns p _{3/4} < 0,05
IL4	643,73 (34,99-6900,45)	66,12 (17,35-333,65)	649,22 (143,29-2136,25)	238,86* (24,93-580,04)	p _{1/2} – ns p _{3/4} < 0,05
IL13	249,00 (6,83-2718,99)	7,06 (4,98-308,69)	380,04 (52,71-6122,90)	3,13* (0,66-13,00)	p _{1/2} – ns p _{3/4} < 0,01
CAMP	9,19 (4,42-28,71)	19,82 (0,82-55,05)	11,63 (6,82-24,59)	1,21* (0,10-9,85)	p _{1/2} – ns p _{3/4} < 0,05
DEFB1	149,30 (17,85-461,74)	46,53 (10,27-163,39)	131,60 (86,93-684,44)	39,50 (0,79-290,02)	p _{1/2} – ns p _{3/4} – ns

Примечание. В колонке «p» показана степень достоверности для пар групп (1 и 2; 3 и 4). Серым цветом и звездочкой выделены группы с достоверно пониженным значением экспрессии. Достоверность между группами оценивалась по критерию Манна–Уитни.

Note. Column “p” shows the significance for pairs of groups (1 and 2; 3 and 4). Groups with significantly reduced expression values are highlighted in gray and an asterisk. Reliability between groups was assessed using the Mann–Whitney U test.

При сравнении образцов от пациентов с АтД и здоровых детей были показаны изменения в метилировании 2364 областей геномной ДНК с соответствующими им конкретными генами. Среди выявленных генов отбирались те, которые имеют отношение к процессам, связанным с патогенезом АтД.

Функционально гены, даже в рамках одной группы, дополняют друг друга или, наоборот, проявляют антагонистические свойства (хотя генов, способствующих нормальному функционированию кожного барьера и при этом находя-

щихся в состоянии активации, меньше). Поэтому при развитии патологического процесса важно рассматривать все факторы вместе.

Исходя из полученных данных по дифференциально метилированным генам, для экспрессионного анализа были отобраны гены, входящие в MyD88-зависимый сигнальный путь (*TLR2*, *TLR9*, *IL4*, *IL13*), а также гены АМП (*DEFB1*, *CAMP*).

Изменение экспрессии описываемых показателей иммунитета было также проанализировано согласно типу применяемого лечения в дина-

мике. Для этого пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от назначения системной терапии. Полученные данные представлены в таблице 2.

Из представленных результатов следует, что в целом через три месяца после лечения уровень экспрессии по всем изучаемым показателям иммунитета снижался. Однако достоверное снижение экспрессии практически по всем параметрам (за исключением гена *DEFB1*) регистрируется в группе, в которой в дополнение к топическому лечению применялась системная терапия (дупилумаб). При этом индекс SCORAD после проведения лечения в среднем улучшился на 63% и составил $17 \pm 6,0$ баллов. Так, основные цитокины IL-4 и IL-13, на которые направлено действие этого препарата, показали нормализацию экспрессии своих генов после лечения в 3 и 127 раз соответственно (медиана для IL-4 после терапии равна 238,86; для IL-13 равна 3,13). Уровни экспрессии показателей врожденного иммунитета также снижались. Для TLRs наблюдалось снижение в 302 (для гена *TLR2*) и 16,7 (для гена *TLR9*) раз. Активация гена кателицидина снижалась (в 12 раз по сравнению с состоянием до лечения, Me = 1,21). Таким образом, системная терапия, направленная на подавление сигналов цитокинов IL-4 и IL-13, опосредованно приводит к нормализации уровней экспрессии факторов врожденного иммунитета.

АтД в стадии обострения имеет уникальный иммунологический профиль, который характе-

ризуется активацией экспрессии генов *TLR2* и *TLR9* в иммунологических клетках крови [7, 8].

В настоящий момент данных по поводу функционального значения антимикробных пептидов HBD1 и LL37 в крови при АтД не так много [1]. Помимо антибактериальной, противогрибковой и противовирусной активности, эти белки участвуют в хемотаксисе клеток, индукции иммунных медиаторов и регуляции воспалительного ответа.

Существует множество данных, что IL-4 и IL-13 цитокины играют центральную роль в поддержании воспаления при АтД и являются мишенями для препарата дупилумаба, при применении которого происходит подавление молекул, участвующих в воспалительной реакции Th2-типа. Было показано, что IL-4 инициирует Th2-иммунный ответ, тогда как IL-13 отвечает за его длительное поддержание [3]. Оба цитокина оказывают влияние на синтез IgE, также участвующего в патогенезе атопического дерматита.

Заключение

Изучение регуляции молекулярно-генетических механизмов иммунитета, вовлеченных в процессы воспалительных реакций при АтД, способствует уточнению иммунопатогенеза этого заболевания, определению диагностических маркеров и мишеней для таргетной лекарственной терапии.

Список литературы / References

1. Быстрицкая Е.П., Мурашкин Н.Н., Материкин А.И., Наумова Е.А., Яковлева И.В., Вартанова Н.О., Свитич О.А. Экспрессия генов HBD1 и LL37 при атопическом дерматите у детей и подростков // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 4. С. 405-410. [Bystritskaya E.P., Murashkin N.N., Materikin A.I., Naumova E.A., Yakovleva I.V., Vartanova N.O., Svitich O.A. HBD1 and LL37 gene expression in children with atopic dermatitis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 4, pp. 405-410. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1194-HAL.
2. Мурашкин Н.Н., Намазова-Баранова Л.С., Опрятин Л.А., Епишев Р.В., Материкин А.И., Амбарчян Э.Т. Биологическая терапия среднетяжелых и тяжелых форм атопического дерматита в детском возрасте // Вопросы современной педиатрии, 2020. Т. 19, № 6. С. 432-443. [Murashkin N.N., Namazova-Baranova L.S., Opryatyn L.A., Epishev R.V., Materikin A.I., Ambarchian E.T. Biologic Therapy of Moderate and Severe Forms of Atopic Dermatitis in Children. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Issues of Modern Pediatrics*, 2020, Vol. 19, no. 6, pp. 432-443. (In Russ.)]
3. Czarnowicki T., Gonzalez J., Shemer A., Malajian D., Xu H., Zheng X. Severe atopic dermatitis is characterized by selective expansion of circulating TH2/TC2 and TH22/TC22, but not TH17/TC17, cells within the skin-homing T-cell population. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, no. 1, pp. 104-115.e7.
4. Langan S.M., Irvine A.D., Weidinger S. Atopic dermatitis. *Lancet*, 2020, Vol. 396, no. 10247, pp. 345-360.
5. Lebwohl M.G., Del Rosso J.Q., Abramovits W., Berman B., Cohen D.E., Guttman E. Pathways to managing atopic dermatitis: consensus from the experts. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.*, 2013, Vol. 6, no. 7 Suppl., pp. S2-S18.

6. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 2001, Vol. 25, no. 4, pp. 402-408.
7. Miller L.S. Toll-like receptors in skin. *Adv. Dermatol.*, 2008, Vol. 24, pp. 71-87.
8. Yu Y., Lin D., Cai X., Cui D., Fang R., Zhang W., et al. Enhancement of Chemokine mRNA Expression by Toll-Like Receptor 2 Stimulation in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Atopic Dermatitis. *BioMed Res. Int.*, 2020, Vol. 2020, pp. 1-7.

Авторы:

Быстрицкая Е.П. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Мурашкин Н.Н. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий отделением дерматологии с группой лазерной хирургии, заведующий лабораторией патологии кожи у детей отдела научных исследований в педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Наумова Е.А. — научный сотрудник кафедры генетики, биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Материкин А.И. — к.м.н., врач-дерматовенеролог, отделение дерматологии с группой лазерной хирургии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Солнцева В.К. — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Authors:

Bystritskaya E.P., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Murashkin N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Research Associate, Head of the Department of Dermatology, Head of the Laboratory of Skin Pathology in Children, Medical Research Center for Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Naumova E.A., Research Associate, Genetics Department, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Materikin A.I., PhD (Medicine), Dermatovenereologist, Department of Dermatology, Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Solntseva V.K., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 31.03.2024
Отправлена на доработку 08.04.2024
Принята к печати 10.04.2024

Received 31.03.2024
Revision received 08.04.2024
Accepted 10.04.2024

МЕТАБОЛИЗМ ЛИМФОЦИТОВ И УРОВЕНЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Радыгина Т.В.¹, Курбатова О.В.¹, Купцова Д.Г.¹, Петричук С.В.¹,
Фисенко А.П.¹, Мовсисян Г.Б.¹, Абдуллаева Л.М.¹, Потапов А.С.^{1,3},
Мурашкин Н.Н.^{1,2,3}, Парахина Д.В.¹

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

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

Резюме. В последние десятилетия отмечен рост заболеваемости аутоиммунными заболеваниями (АИЗ) среди взрослых и детей. В основе иммунопатогенеза АИЗ лежит дисбаланс между аутоагрессивными и регуляторными клетками (Treg), который регулируется метаболическими сигнальными путями и цитокиновым микроокружением. Понимание механизмов иммунометаболизма открывает новые возможности терапии пациентов с АИЗ. Цель — оценить активность дегидрогеназ лимфоцитов, сопряженных с ОXPHOS и гликолизом в зависимости от уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у детей с АИЗ.

Обследовано 324 ребенка с АИЗ: 80 — болезнь Крона (БК), 53 — язвенный колит (ЯК), 89 — псориаз (ПС), 66 — рассеянный склероз (РС), 36 — аутоиммунный гепатит (АИГ). Активность митохондриальных дегидрогеназ (сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ)) оценивали иммуноцитохимическим методом с использованием проточной цитометрии. Уровень цитокинов (ЦК) в сыворотках крови определяли мультиплексным анализом.

В каждой исследованной группе детей выявлены ЦК с наибольшими значениями в обострении и в ремиссии заболевания. Максимальные значения ЦК были у пациентов в обострении: для БК, ЯК, ПС, РС — IL-23; АИГ — IL-27. Оценка комплексов цитокинов, ассоциированных с клетками показала достоверные отличия между пациентами в обострении / ремиссии: БК, ЯК и ПС — M1 (IL-1+IL-6+TNF α), cTh1 (IFN γ +IL-12p70+TNF β +IL-2), cTh2 (IL-4+IL-5+IL-10+IL-13+IL-17E/IL-25+IL-33), cTh17

Адрес для переписки:

Радыгина Татьяна Вячеславовна
ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
119991, Россия, Москва,
Ломоносовский пр., 2, стр. 1.
Тел.: 8 (499) 134-13-98.
Факс: 8 (499) 134-70-01.
E-mail: radigina.tv@nczd.ru

Address for correspondence:

Tatiana V. Radygina
National Medical Research Center of Children's Health
2 Lomonosovskiy Ave, Bldg 1
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (499) 134-13-98.
Fax: +7 (499) 134-70-01.
E-mail: radigina.tv@nczd.ru

Образец цитирования:

Т.В. Радыгина, О.В. Курбатова, Д.Г. Купцова,
С.В. Петричук, А.П. Фисенко, Г.Б. Мовсисян,
Л.М. Абдуллаева, А.С. Потапов, Н.Н. Мурашкин,
Д.В. Парахина «Метаболизм лимфоцитов и уровень
циркулирующих цитокинов у детей с аутоиммунными
заболеваниями» // Медицинская иммунология, 2024.
Т. 26, № 5. С. 1017-1024.
doi: 10.15789/1563-0625-LMA-16773

© Радыгина Т.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.V. Radygina, O.V. Kurbatova, D.G. Kuptsova,
S.V. Petrichuk, A.P. Fisenko, G.B. Movsisyan,
L.M. Abdullaeva, A.S. Potapov, N.N. Murashkin,
D.V. Parakhina "Lymphocyte metabolism and the level of
circulatory cytokines in children with autoimmune disease",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1017-1024.
doi: 10.15789/1563-0625-LMA-16773

© Radygina T.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-LMA-16773

(IL-1 β +IL-6+IL-17A+IL-17F+IL-21+IL-22+IL-23); PC – M1, cTh1, cTh2; АИГ – cTh2. Активность СДГ в ремиссии АИЗ отличалась между патологиями в CD4⁺ клетках, Th17 и Treg. В обострении АИЗ отличия были в Treg между пациентами с ЯК и ПС. Наибольшая активность ГФДГ в обострении наблюдалась у БК в CD4⁺ лимфоцитах, Th17 и Treg. Соотношение СДГ/ГФДГ в Т-лимфоцитах у детей с БК в обострении и ремиссии было наименьшим и достоверно ниже, чем при ЯК, ПС, РС, АИГ и условно здоровых детей. В группе детей с низким соотношением СДГ/ГФДГ были достоверно увеличены уровни CCL20/MIP3 α , IFN γ , IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , TNF α .

Выявлены информативные цитокиновые комплексы у детей с АИЗ различной этиологии. Показана взаимосвязь метаболической активности лимфоцитов и уровня циркулирующих цитокинов.

Ключевые слова: дегидрогеназы, Th17-лимфоциты, Treg, гликолиз, цитокины, воспалительные заболевания кишечника, рассеянный склероз, псориаз, аутоиммунный гепатит, дети

LYMPHOCYTE METABOLISM AND THE LEVEL OF CIRCULATORY CYTOKINES IN CHILDREN WITH AUTOIMMUNE DISEASE

Radygina T.V.^a, Kurbatova O.V.^a, Kuptsova D.G.^a, Petrichuk S.V.^a, Fisenko A.P.^a, Movsisyan G.B.^a, Abdullaeva L.M.^a, Potapov A.S.^{a, c}, Murashkin N.N.^{a, b, c}, Parakhina D.V.^a

^a National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

^b Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. In recent decades, there has been an increase in the incidence of autoimmune diseases (AID) among adults and children. The immunopathogenesis of AID is based on an imbalance between autoaggressive and regulatory cells (Tregs), which is regulated by metabolic signaling pathways and the cytokine microenvironment. Understanding the mechanisms of immunometabolism opens up new possibilities for the treatment of patients with AID. The aim was to evaluate the activity of lymphocyte dehydrogenases associated with OXPHOS and glycolysis, depending on the level of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in children with AID.

324 children with AID were examined: 80 – Crohn's disease (CD), 53 – ulcerative colitis (UC), 89 – psoriasis (PS), 66 – multiple sclerosis (MS), 36 – autoimmune hepatitis (AIH). Activity of mitochondrial dehydrogenases (succinate dehydrogenase (SDH) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)) were evaluated by immunocytochemical method using flow cytometry. The level of cytokines (CC) in blood sera was determined by multiplex analysis.

In each studied group of children, CC with the highest values in exacerbation and remission of the disease were identified. The maximum values of CC were in patients with exacerbation: CD, UC, PS, MS – IL-23; AIH – IL-27. Evaluation of cytokine complexes associated with cells showed significant differences between patients in exacerbation/remission: CD, UC and PS – M1(IL-1+IL-6+TNF α), cTh1(IFN γ +IL-12p70+TNF β +IL-2), cTh2 (IL-4+IL-5+IL-10+IL-13+IL-17E/IL-25+IL-33), cTh17 (IL-1 β +IL-6+IL-17A+IL-17F+IL-21+IL-22+IL-23); MS – M1, cTh1, cTh2; AIH – cTh2. SDH activity in AID remission differed between pathologies in CD4⁺ cells, Th17 and Tregs. In exacerbation of AID, there were differences in Tregs between patients with UC and PS. The highest GPDH activity in exacerbation was observed in CD4⁺ lymphocytes, Th17 and Tregs in CD. The ratio of SDH/GPDH in T-lymphocytes in children with CD in exacerbation and remission was lowest and significantly lower than in UC, PS, MS, AIH and apparently healthy children. In the group of children with a low SDH/GPDH ratio, the levels of CCL20/MIP3 α , IFN γ , IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , and TNF α were significantly increased. Conclusions. Informative cytokine complexes were identified in children with AID. The relationship between the metabolic activity of lymphocytes and the level of circulating cytokines is shown.

Keywords: dehydrogenases, Th17 lymphocytes, Tregs, glycolysis, cytokines, inflammatory bowel diseases, multiple sclerosis, psoriasis, autoimmune hepatitis, children

Введение

Заболеваемость и распространенность аутоиммунными заболеваниями (АИЗ) неуклонно растет как у взрослых, так и у детей, что является серьезной проблемой здравоохранения [6]. АИЗ возникают в результате aberrантных иммунных реакций, направленных против собственных тканей и приводящих к чрезмерной активации воспаления. Патогенез ряда АИЗ имеет относительно общий механизм, обусловленный активацией аутоагрессивных популяций лимфоцитов (Th1, Th17) и выработкой ими провоспалительных цитокинов (ЦК) на фоне снижения функции Т-регуляторных клеток (Treg) [1, 5]. Баланс Th17/Treg регулируется цитокиновым микроокружением и клеточными метаболическими сигнальными путями. Наивные CD4⁺ Т-клетки могут дифференцироваться в провоспалительные Th17 или противовоспалительные Treg-клетки в соответствии со специфическим цитокиновым микроокружением [14]. Показано, что дифференцировка клеток Th17 индуцируется под действием IL-6, IL-21, IL-23, IL-1 β и TGF- β [13]. Провоспалительные цитокины IL-6, IL-21 и IL-23 активируют STAT3, индуцируя экспрессию гена *RORC* и стимулируя Т-клетки к дифференцировке Th17 клеток [15].

В тоже время известно, что фенотип лимфоцитов и их функции определяются метаболическим профилем [4]. В отсутствие воспаления клетки используют источники энергии (АТФ), вырабатываемые в основном посредством окислительного фосфорилирования (ОХРНOS) из липидов или глюкозы, для производства АТФ и удовлетворения своих основных метаболических потребностей [7]. При воспалении происходит метаболическое переключение в иммунных клетках, вызывающее усиление аэробного гликолиза, который регулирует баланс между воспалительными и регуляторными иммунными фенотипами [8]. Циркулирующие цитокины напрямую контролируют интенсивность метаболизма лимфоцитов. Показано, например, что IL-2 оказывает двойственный эффект, активируя как эффекторные, так и регуляторные клетки. В Th1-клетках IL-2 способствует передаче сигналов от STAT5 через путь PI3K/Akt/mTOR, активируя анаболический метаболизм и обеспечивая пролиферацию и поддержание эффекторной функции Т-лимфоцитов. Помимо этого, IL-2 необходим для развития Treg в тимусе, а также для пролиферации и поддержания Treg на периферии [12]. Кроме того, показано, что активация IL-2 пути STAT5 негативно регулирует Т-фолликулярные хелперные клетки (Tfh) и дифференцировку клеток Th17, уменьшая выработку IL-17, что в целом снижает провоспалительные реакции [9]. Ингибирование гликолиза в CD4⁺Т-клетках с помощью

циклин-зависимой киназы 7 (CDK7) приводит к ингибированию дифференцировки Th17/Th1 и к снижению тяжести IL-23-опосредованного псориаза в эксперименте на мышинной модели [10]. Известно, что снижение уровня гликолиза в CD4⁺Т-клетках может не только ингибировать дифференцировку эффекторных клеток, но и способствовать дифференцировке регуляторных. Treg усиливают свою регуляторную функцию за счет секреции противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- β , замедляя прогрессирование аутоиммунных заболеваний, [11]. Таким образом, воздействие на метаболизм клетки может быть важным инструментом для управления иммунной системой и контроля воспаления при АИЗ. Понимание механизмов и способов воздействия на метаболическое перепрограммирование открывает новые возможности для таргетной терапии пациентов с АИЗ.

Цель исследования – оценить активность дегидрогеназ лимфоцитов, сопряженных с ОХРНOS и гликолизом в зависимости от уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у детей с АИЗ.

Материалы и методы

Обследовано 324 ребенка в возрасте от 4 до 18 лет с аутоиммунными заболеваниями на фоне патогенетической терапии, находящихся на лечении в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России: болезнь Крона (БК, n = 80), язвенный колит (ЯК, n = 53), псориаз (ПС, n = 89), рассеянный склероз (РС, n = 66), аутоиммунный гепатит (АИГ, n = 36). Пациенты были разделены на группы обострение /ремиссия в зависимости от клинических индексов активности PCDIA для БК (PCDIA > 10 – обострение, PCDIA \leq 10 – ремиссия), PUCAI для ЯК (PUCAI > 10 – обострение, PUCAI \leq 10 – ремиссия), индекса площади поражения PASI для ПС (PASI > 10 – обострение, PASI \leq 10 – ремиссия), по наличию очагов демиелинизации на МРТ для пациентов с РС (активные очаги – обострение, без активных очагов – ремиссия), по уровню трансаминаз печени (АЛТ/АСТ > 40 – обострение). Обследование выполнено согласно этическим нормам и одобрено локальным этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Для исследования использовали периферическую кровь. Активность митохондриальных дегидрогеназ (сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – фермента цикла Кребса и II этапа ОХРНOS, глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) – фермента, отражающего интенсивность гликолиза) оценивали иммуноцитохимическим методом в выделенных и пермеабиллизированных лимфоцитах [2]. Исследование уровня цитокинов в сыворотках крови проводили мульти-

плексным анализом с использованием набора MILLIPLEX MAP Human Th17 Magnetic Bead Panel (EMD Millipore Corporation, США) в соответствии с инструкцией производителя на проточном флюориметре Bio-Plex™-200 Assay System (Bio-Rad, США). Анализ полученных данных проводили с применением программного обеспечения xPONENT 4.2 и Milliplex Analyst 5.1. Панель исследованных цитокинов включала: IL-17F, GM-CSF, IFN γ , IL-10, CCL20/MIP3 α , IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-22, IL-9, IL-1 β , IL-33, IL-2, IL-21, IL-4, IL-23, IL-5, IL-6, IL-17E/IL-25, IL-27, IL-31, TNF α , TNF β , IL-28A. Результаты цитокинов были представлены в пг/мл. Был проведен анализ отдельных цитокинов и цитокинов, ассоциированных с определенными клетками: макрофагальные – IL-1+IL-6+TNF α (M1), IFN γ +IL-12p70+TNF β +IL-2 (сTh1), IL-4+IL-5+IL-10+IL-13+IL-17E/IL-25+IL-33 (сTh2), IL-1 β +IL-6+IL-17A+IL-17F+IL-21+IL-22+IL-23 (сTh17) [3].

Для разделения состояний обострение/ремиссия проведена z-стандартизация (z-score) для всех исследованных цитокиновых комплексов (ЦКК). Нормализованный показатель Z рассчитан по формуле:

$$Z = (x_i - \mu) / \sigma,$$

где Z – стандартизованная оценка, x_i – исходный элемент выборки, μ – среднее арифметическое по группе, σ – стандартное отклонение по группе.

Статистическая обработка проведена с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Описательная статистика представлена в виде медианы (нижние и верхние квартили) – Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), среднего (стандартная ошибка среднего) – $M \pm m$. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни ($p < 0,05$ – статистически значимые).

Результаты и обсуждение

Анализ уровня циркулирующих цитокинов у пациентов с АИЗ показал широкий диапазон измеряемых показателей и в каждой исследованной патологии были цитокины с максимальными концентрациями. Для БК максимальные значения выявлены для IL-23 Me – 2753 (1407-7009) pg/mL – у пациентов в обострении, Me – 769,7 (388,6-1343) pg/mL – у пациентов в ремиссии; для ЯК IL-23 Me – 1535 (1120-3661) pg/mL – у пациентов в обострении, Me – 769,7 (610,6-1008,6) pg/mL – у пациентов в ремиссии; для ПС IL-23 Me – 2367 (1343-4515) pg/mL – у пациентов в обострении, Me – 897,1 (706-1025) pg/mL – у пациентов в ремиссии; для РС у пациентов в обострении IL-23 Me – 928,9 (8-1343) pg/mL и IL-27 Me – 519 (395-746) pg/mL, у пациентов в ремиссии

IL-23 Me – 84 (8-1025) pg/mL I и 127 Me – 559 (335-861) pg/mL; для АИГ IL-27 Me – 11279 (9421-13297) pg/mL – у пациентов в обострении, Me – 11408 (10074-13216) pg/mL – у пациентов в ремиссии. При БК все исследованные ЦК достоверно выше в обострении, чем в ремиссии. Аналогичная ситуация была при ЯК за исключением IL-1 β . При ПС достоверных отличий между состояниями обострение/ремиссия не выявлено для цитокинов CCL20/MIP3 α , IL-15, IL-1 β . При РС достоверные отличия выявлены между состояниями обострение/ремиссия для GM-CSF, IL-12p70, IL-9, IL-21, IL-5, IL-6, IL-17E/IL-25, TNF β , IL-28A. При АИГ достоверные отличия выявлены для IL-12p70, IL-15, TNF α , IL-2.

Для выявления наибольшего вклада клеток-продуцентов ЦК в иммунопатогенез заболеваний нами была применена Z-стандартизация, которая позволила объединить исследованные ЦК в комплексы, ассоциированные с клетками.

Получены достоверные отличия для комплексов M1, сTh1, сTh2, сTh17 при БК, ЯК и ПС ($p < 0,001$). Для пациентов с РС достоверные отличия получены для M1 ($p = 0,002$), сTh1 ($p = 0,002$), сTh2 ($p < 0,001$). Для пациентов с АИГ достоверные отличия получены для сTh2 ($p = 0,015$). Наиболее значимые ЦКК, отличающиеся для состояний обострение/ремиссия представлены на рисунке 1. Среди анализируемых патологий наибольшие значения для ЦКК получены для пациентов с ПС, а наименьшие для пациентов с АИГ.

Была проанализирована активность внутриклеточных дегидрогеназ СДГ и ГФДГ у пациентов с АИГ в состоянии обострения и ремиссии (табл. 1).

Значимых отличий по активности СДГ между группами пациентов в обострении в CD4⁺ клетках, Th17 клетках и Treg выявлено не было за исключением активности в Treg между пациентами с ЯК и ПС (активность у пациентов с ПС была достоверно выше, чем для ЯК). Однако, в состоянии ремиссии активность СДГ отличалась между патологиями. Наибольшая активность ГФДГ наблюдалась у пациентов с БК относительно всех патологий в CD4⁺ лимфоцитах, Th17 и Treg у пациентов в состоянии обострения. В состоянии ремиссии выявлено повышение активности СДГ в Treg у детей с ПС и РС (табл. 1). Соотношение СДГ/ГФДГ в Т-лимфоцитах у пациентов с БК было наименьшим и составляло в обострении – Me = 1,1 (1,005-1,196), в ремиссии – Me = 1,096 (1,013-1,168) и было достоверно ниже, чем у детей с ЯК, ПС, РС и АИГ ($p < 0,01$) и чем у условно здоровых детей (Me = 1,15 (1,07-1,25), $p < 0,05$). Таким образом, снижение соотношения СДГ/ГФДГ отражает повышение интенсивности процессов гликолиза, что согласуется с изменениями метаболизма клеток при воспалении [8].

ТАБЛИЦА 1. АКТИВНОСТЬ СДГ И ГФДГ В ЛИМФОЦИТАХ У ПАЦИЕНТОВ В ОБОСТРЕНИИ И РЕМИССИИ АИЗ

TABLE 1. ACTIVITY OF SDG AND GFDH IN LYMPHOCYTES IN PATIENTS IN EXACERBATION AND REMISSION OF AID

Популяция Population	БК-1 CD (n = 48)	ЯК-2 UC (n = 33)	ПС-3 PS (n = 30)	РС-4 MS (n = 34)	АИГ-5 AIH (n = 16)
Активность СДГ и ГФДГ в лимфоцитах у пациентов в обострении Activity of SDG and GFDG in lymphocytes in patients with exacerbation					
CD4 СДГ/SDG	181 168-193	179 165-192	184,8 169-187	184* 170-196	182,8 175-192
CD4 ГФДГ/GFDG	163 145-176	145,9* 134-156	151 129-160	140 138-162	146* 144-150
	$p_{12} = 0,012$		$p_{13} = 0,004$	$p_{14} = 0,028$	$p_{15} = 0,016$
Th17 СДГ/SDG	175 161-190	173,4 164-183	170 157-185	181,7* 162-192	176,2 168-187
Th17 ГФДГ/GFDG	162,1 141-176	143,3 133,7-156*	156 134-162	139 137-163	144* 143-149
	$p_{12} = 0,020$		$p_{13} = 0,027$	$p_{14} = 0,034$	$p_{15} = 0,027$
Treg СДГ/SDG	186 171-197	179,7 168-194	181* 174-195	188,4* 174-194	186,7 180-194
Treg ГФДГ/GFDG	172,4 157-186	151,9* 141-166	162,3 142-168	152,2 143-185	156,8* 156-161
	$p_{12} = 0,02$		$p_{13} = 0,0007$	$p_{14} = 0,090$	$p_{15} = 0,005$
Популяция Population	БК CD (n = 32)	ЯК UC (n = 20)	ПС PS (n = 59)	РС MS (n = 32)	АИГ AIH (n = 16)
Активность СДГ и ГФДГ в лимфоцитах у пациентов в ремиссии Activity of SDG and GFDG in lymphocytes in patients with remission					
CD4 СДГ/SDG	184 164-195	198 177-212	178 168-183	200* 190-201	189 180-197
		$p_{23} = 0,006$	$p_{34} = 0,002$		$p_{35} = 0,0006$
CD4 ГФДГ/GFDG	163 151-167	177* 148-182	138 137-165	163 161-171	155* 146-157
	$p_{13} = 0,0004$	$p_{23} = 0,001$		$p_{45} = 0,033$	
Th17 СДГ/SDG	177 154-194	184,7 162-204	169,8 161-181	192,9* 188-201	183,7 173-193
			$p_{34} = 0,001$		$p_{35} = 0,001$
Th17 ГФДГ/GFDG	159 150-166	172,3 152-184*	140 138-170	170 131-186	153* 145-156
	$p_{13} = 0,006$	$p_{23} = 0,004$			
Treg СДГ/SDG	187 170-193	209 179-212	196* 187-201	204* 194-207	192 184-199
	$p_{14} = 0,017$	$p_{23} = 0,012$	$p_{13} = 0,0001$	$p_{45} = 0,047$	
Treg ГФДГ/GFDG	171 159-175	185* 146-188	146 144-175	174 168-185	165* 157-167
	$p_{13} = 0,001$	$p_{23} = 0,004$		$p_{45} = 0,025$	$p_{35} = 0,027$

Примечание. p – достоверность отличий между группами, 1 – группа БК, 2 – группа ЯК, 3 – группа ПС, 4 – группа РС, 5 – группа АИГ; * отмечены достоверные отличия между состоянием обострения и ремиссии.

Note. p is the reliability of differences between groups; 1, CD group; 2, UC group; 3, the PS group; 4, MS group; 5, AIH group; *, significant differences between the state of exacerbation and remission were noted.

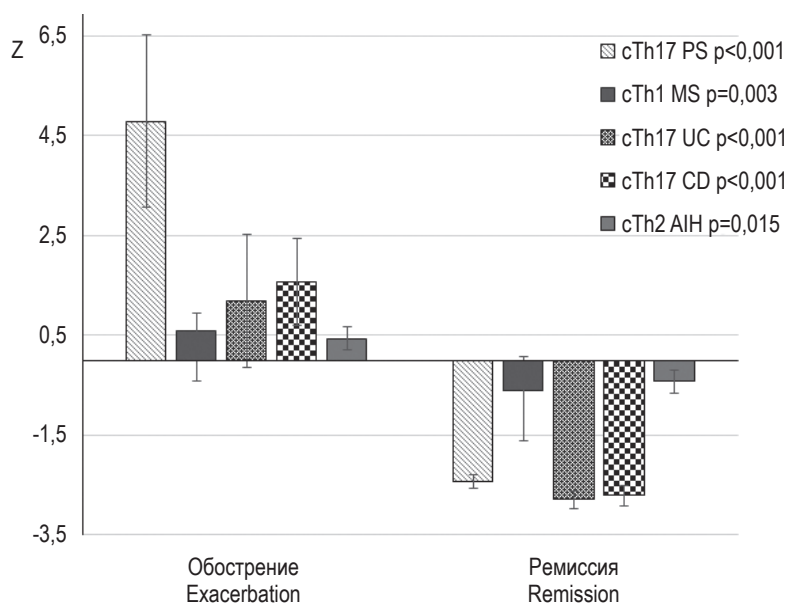


Рисунок 1. Цитокиновые комплексы, ассоциированные с различными популяциями лимфоцитов, при обострении и ремиссии у детей с АИЗ

Figure 1. Cytokine complexes associated with different lymphocyte populations during exacerbation and remission in children with AID

На основании полученных данных были сформированы 2 группы пациентов с АИЗ. В 1 группу вошли пациенты, у которых соотношение СДГ/ГФДГ было сопоставимо с показателями условно-здоровых детей и составляло $Me = 1,21$ (1,17-1,34) при СДГ $Me = 187$ (181-192) усл.ед и ГФДГ $Me = 155$ (136-164) усл. ед. Вторую группу составили дети, у которых соотношение СДГ/ГФДГ было снижено относительно условно-здоровых детей и составляло $Me = 0,97$ (0,93-0,98) при СДГ $Me = 158$ (148-162) усл.ед и ГФДГ $Me = 164$ (162-

170) усл. ед. Анализ циркулирующих ЦК показал достоверное увеличение CCL20/MIP3 α , IFN γ , IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , TNF α во второй группе (табл. 2).

Данный факт подтверждает сопряженность метаболизма иммунных клеток и цитокинового микроокружения [14]. При повышении процессов гликолиза и снижении процессов OXPHOS можно ожидать увеличение уровня основных провоспалительных цитокинов, в частности, IFN γ , IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-1 β , TNF α .

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СДГ/ГФДГ В ПОПУЛЯЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С АИЗ (пг/мл)

TABLE 2. CYTOKINE CONCENTRATIONS DEPENDING ON SDH/GFDH IN THE T LYMPHOCYTE POPULATION IN PATIENTS WITH AID (pg/mL)

Цитокины Cytokines	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Достоверность Reliability
CCL20/MIP3 α	31,7 25,6-50,7	62,5 33,1-73,2	$p = 0,01$
IFN γ	3,19 3,0-4,6	4,3 3,1-12,9	$p = 0,045$
IL-12p70	2,2 2,0-2,8	2,7 2,4-5,9	$p = 0,039$
IL-13	100,1 68,9-170,9	200,8 91,5-270,6	$p = 0,011$
IL-17A	0,49 0,21-0,84	0,85 0,41-7,1	$p = 0,005$
IL-1 β	0,55 0,24-1,46	1,24 0,71-2,25	$p = 0,025$
TNF α	12,2 9,7-20,2	20,2 15,6-74,7	$p = 0,013$

Заключение

Уровень циркулирующих цитокинов и цитокиновых комплексов, ассоциированных с иммунными клетками, могут быть использованы в качестве дополнительного критерия оценки

активности воспалительного процесса у детей с АИЗ. Выявлены наиболее информативные цитокиновые комплексы у детей с АИЗ различной этиологии. Показана взаимосвязь метаболической активности лимфоцитов и уровня циркулирующих цитокинов.

Список литературы / References

1. Купцова Д.Г., Радыгина Т.В., Мурашкин Н.Н., Фрейдлин Е.В., Курбатова О.В., Петричук С.В. Особенности содержания цитокинов и хемокинов в сыворотке крови у детей с вульгарным псориазом // Цитокины и воспаление, 2023. Т. 20, № 1. С. 18-24. [Kuptsova D.G., Radygina T.V., Murashkin N.N., Freidlin E.V., Kurbatova O.V., Petrichuk S.V. Peculiarities of cytokine and chemokine content in blood serum of children with psoriasis vulgaris. *Tsitokiny i vospaleniye = Cytokines and Inflammation*, 2023, Vol. 20. no. 1, pp. 18-24. (In Russ.)]
2. Курбатова О.В., Радыгина Т.В., Купцова Д.Г., Петричук С.В., Мовсисян Г.Б., Потапов А.С., Мурашкин Н.Н., Абдуллаева Л.М., Фисенко А.П. Координация сигнального пути NF-κB и метаболизма лимфоцитов у детей с аутоиммунными заболеваниями // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 491-500. [Kurbatova O.V., Radygina T.V., Kuptsova D.G., Petrichuk S.V., Movsisyan G.B., Potapov A.S., Murashkin N.N., Abdullaeva L.M., Fisenko A.P. Coordination of the NF-κB signaling pathway and lymphocyte metabolism in children with autoimmune diseases. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, Vol. 26. no. 4, pp. 491-500. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-13800-COT.
3. Радыгина Т.В., Фисенко А.П., Петричук С.В., Купцова Д.Г., Курбатова О.В., Фрейдлин Е.В., Потапов А.С., Мурашкин Н.Н., Бурсагова Б.И., Абдуллаева Л.М., Семикина Е.Л. Изменения цитокиновых комплексов у детей с аутоиммунными заболеваниями при разной эффективности их биологической терапии // Российский педиатрический журнал, 2023. Т. 26, № 6. С. 390-398. [Radygina T.V., Fisenko A.P., Petrichuk S.V., Kuptsova D.G., Kurbatova O.V., Freydlin E.V., Potapov A.S., Murashkin N.N., Bursagova B.I., Abdullaeva L.M., Semikina E.L. Changes in cytokine complexes in children with autoimmune diseases with different effectiveness of their biological therapy. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal = Russian Pediatric Journal*, 2023, Vol. 26. no. 6, pp. 390-398. (In Russ.)]
4. Bujak R., Struck-Lewicka W., Markuszewski M.J., Kalisz R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *J. Pharm Biomed. Anal.*, 2015, Vol. 113, pp. 108-120.
5. Chetaille Nézondet A.L., Poubelle P.E., Pelletier M. The evaluation of cytokines to help establish diagnosis and guide treatment of autoinflammatory and autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, Vol. 108. no. 2. pp. 647-657.
6. Conrad N., Misra S., Verbakel J.Y., Verbeke G., Molenberghs G., Taylor P.N., Mason J., Sattar N., McMurray J.J.V., McInnes I.B., Khunti K., Cambridge G. Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK. *Lancet*, 2023, Vol. 401, no. 10391, pp. 1878-1890.
7. Hamaidi I., Kim S. Sirtuins are crucial regulators of T cell metabolism and functions. *Exp. Mol. Med.*, 2022, Vol. 54, pp. 207-215.
8. Kelly B., O'Neill L.A.J. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.*, 2015, Vol. 25., pp. 771-784.
9. Kosmaczewska A. Low-dose interleukin-2 therapy: A driver of an imbalance between immune tolerance and autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 15., pp. 18574-18592.
10. Lin Y., Xue K., Li Q., Liu Z., Zhu Z., Chen J., Dang E., Wang L., Zhang W., Wang G., Li B. Cyclin-Dependent Kinase 7 Promotes Th17/Th1 Cell Differentiation in Psoriasis by Modulating Glycolytic Metabolism. *J. Invest. Dermatol.*, 2021, Vol. 141, no. 11, pp. 2656-2667.
11. Liu S., Liao S., Liang L., Deng J., Zhou Y. The relationship between CD4⁺ T cell glycolysis and their functions. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2023, Vol. 34, no. 6, pp. 345-360.
12. Ross S.H., Cantrell D.A. Signaling and function of interleukin-2 in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 36, pp. 411-433.
13. Wu B., Wan Y. Molecular Control of Pathogenic Th17 Cells in Autoimmune Diseases. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 80, 106187. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106187.
14. Zhang S., Gang X., Yang S., Cui M., Sun L., Li Z., Wang G. The Alterations in and the Role of the Th17/Treg Balance in Metabolic Diseases. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 678355. doi: 10.3389/fimmu.2021.678355.
15. Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M., Ivanov I.I., Min R., Victora G.D., Shen Y., Du J., Rubtsov Y.P., Rudensky A.Y., Ziegler S.F., Littman D.R. TGF-β-Induced Foxp3 Inhibits T(H)17 Cell Differentiation by Antagonizing RORγ Function. *Nature*, 2008, Vol. 453, no. 7192, pp. 236-240.

Авторы:

Радыгина Т.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Radygina T.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Курбатова О.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, и. о. заведующего лабораторией экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Купцова Д.Г. — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Петричук С.В. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Фисенко А.П. — д.м.н., профессор, директор ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Мовсисян Г. Б. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории редких наследственных болезней, врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Абдуллаева Л.М. — младший научный сотрудник лаборатории редких наследственных болезней у детей Медико-генетического центра, врач-невролог отделения психоневрологии и нейрореабилитации Центра детской психоневрологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Потапов А.С. — д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории научных основ детской гастроэнтерологии и гепатологии, начальник центра воспалительных заболеваний кишечника, заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Мурашкин Н.Н. — д.м.н., профессор, руководитель НИИ детской дерматологии, заведующий отделением дерматологии и аллергологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Парахина Д. В. — врач-педиатр гастроэнтерологического отделения ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Kurbatova O.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Head, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Kuptsova D.G., Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Petrichuk S.V., PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Fisenko A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Movsisyan G.B., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Rare Hereditary Diseases, Gastroenterologist of the Gastroenterology Department with the Hepatological Group, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Abdullaeva L.M., Junior Research Associate, Laboratory of Rare Hereditary Diseases in Children of the Medical Genetic Center, Neurologist of the Department of the Psychoneurology and Neurorehabilitation, Pediatric Center of psychoneurology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Potapov A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Scientific Foundations of Pediatric Gastroenterology and Hepatology, Head of the Center for Inflammatory Bowel Diseases in Children, Head of Gastroenterology Department with Hepatology Group, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Murashkin N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Research Institute of Pediatrics Dermatology, Head of Department of Dermatology and Allergology, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Dermovenereology and Cosmetology, Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Parakhina D.V., Pediatrician, Gastroenterology Department, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЙ СТИМУЛИРУЕТ TLR9-NF-κB СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Ершова Е.С.¹, Жесткова Е.М.², Савинова Е.А.¹, Костюк С.Э.¹, Салимова Т.А.¹, Вейко Н.Н.¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

² Московский амбулаторный центр психиатрии, психотерапии и наркологии «Осознанность выбора», Москва, Россия

Резюме. Шизофрения – психическое заболевание сложной этиологии. Множественные генетические факторы и факторы окружающей среды связаны с повышенным риском. В последнее время возрос интерес к роли иммунной системы в патофизиологии психических расстройств. Концепция нейровоспаления при нарушениях развития нервной системы приобретает широкий интерес, включая роль Toll-подобных рецепторов.

Заболевание шизофренией ассоциировано с повышением концентрации циркулирующей вкДНК в крови человека. Наряду со значительным увеличением общей концентрации фрагментов вкДНК у больных шизофренией значительно изменяется состав фрагментов вкДНК по сравнению с клеточной ДНК: накапливаются GC-богатые фрагменты рибосомного повтора и происходит окисление оснований. Аналогичные изменения, но менее выраженные, имеют место и для вкДНК здоровых доноров.

Для подтверждения гипотезы о возможном участии фрагментов вкДНК больных шизофренией в индукции воспаления путем активации сигнального пути TLR9-NF-κB-цитокины мы исследовали действие выделенных из плазмы крови образцов вкДНК здоровых и больных шизофренией мужчин на культивируемые мононуклеары человека.

В отличие от клеточной ДНК, вкДНК(SZ) и вкДНК(K) стимулируют в мононуклеарах транскрипцию гена TLR9. В результате в клетках уже через 1 час в 2,9 и 3,3 раза по сравнению с контролем возрастает количество РНК TLR9. Через 24 часа уровень РНК TLR9 немного снижается, но по-прежнему превышает контрольный в 2-3 раза. Через 1 час возрастает также и количество самого белка TLR9 соответственно в 1,5 и 1,7 раза по сравнению с контролем. В отличие от РНК TLR9, уровень белка TLR9 еще больше повышается через 24 часа культивирования.

Увеличение уровня экспрессии белка TLR9 коррелирует с увеличением в лимфоцитах количества транскрипционного фактора NF-κB и сопровождается нарастанием количества РНК гена провоспалительного цитокина IL8, транскрипция которого контролируется фактором NF-κB.

Адрес для переписки:

Ершова Елизавета Сергеевна
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр
имени академика Н.П. Бочкова»
115522, Россия, Москва, ул. Москворечье, 1.
Тел.: 8 (903) 717-07-10.
E-mail: Es-ershova@rambler.ru

Address for correspondence:

Elizaveta S. Ershova
N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics
1 Moskvorechie St
Moscow
115478 Russian Federation;
Phone: +7 (903) 717-07-10.
E-mail: Es-ershova@rambler.ru

Образец цитирования:

Е.С. Ершова, Е.М. Жесткова, Е.А. Савинова,
С.Э. Костюк, Т.А. Салимова, Н.Н. Вейко
«Внеклеточная днк плазмы крови больных
шизофренией стимулирует TLR9-NF-κB сигнальный
путь в культивируемых лимфоцитах человека»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5.
С. 1025-1030.
doi: 10.15789/1563-0625-EDF-16907

© Ершова Е.С. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.S. Ershova, E.M. Jestkova, E.A. Savinova, S.E. Kostyuk,
T.A. Salimova, N.N. Veiko “Extracellular DNA from the blood
plasma of patients with schizophrenia stimulates the TLR9-
NF-κB signaling pathway in cultured human lymphocytes”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1025-1030.
doi: 10.15789/1563-0625-EDF-16907

© Ershova E.S. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EDF-16907

Таким образом, вкДНК(SZ) и вкДНК(K) в лимфоцитах стимулируют сигнальный путь TLR9-NF-κB-провоспалительные цитокины. Биологическое действие вкДНК зависит не только от GC-состава фрагментов, но и от концентрации этих фрагментов во внеклеточной среде. Поскольку концентрации вкДНК в крови больных шизофренией по сравнению со здоровыми донорами значительно увеличены, то следует ожидать и гораздо большего уровня активации сигнального пути TLR9-NF-κB в клетках организма больных людей.

Образцы вкДНК больных шизофренией обладают выраженным биологическим действием на клетки иммунной системы, стимулируя синтез провоспалительных цитокинов путем активации сигнального пути TLR9-NF-κB-провоспалительные цитокины. Высокое содержание вкДНК в плазме крови может быть одной из причин индукции и поддержания в организме больного шизофренией низкоуровневого воспаления.

Ключевые слова: шизофрения, воспаление, вкДНК, Toll-подобный рецептор, мононуклеары, IL-8

EXTRACELLULAR DNA FROM THE BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA STIMULATES THE TLR9-NF-κB SIGNALING PATHWAY IN CULTURED HUMAN LYMPHOCYTES

Ershova E.S.^a, Jestkova E.M.^b, Savinova E.A.^a, Kostyuk S.E.^a,
Salimova T.A.^a, Veiko N.N.^a

^a N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

^b Moscow Outpatient Center for Psychiatry, Psychotherapy and Narcology "Awareness of Choice", Moscow, Russian Federation

Abstract. Schizophrenia is a mental illness of complex etiology. Recently, there has been increased interest in the role of the immune system in the pathophysiology of mental disorders. The concept of neuroinflammation in neurodevelopmental disorders is gaining widespread interest, including the role of Toll-like receptors.

Schizophrenia is associated with an increase in the concentration of cfDNA in human blood, and the composition of cfDNA fragments changes significantly compared to cellular DNA: GC-rich fragments of the ribosomal repeat accumulate and base oxidation occurs. Similar changes, but less pronounced, also occur for cfDNA from healthy donors.

To confirm the hypothesis about the possible participation of cfDNA in the inflammation induction, we studied the effect of cfDNA samples on cultured mononuclear cells.

Unlike cellular DNA, cfDNA(SZ) and cfDNA(K) stimulate transcription of the TLR9 gene in mononuclear cells. After 1 hour the amount of TLR9 RNA increases by 2.9 and 3.3 times compared to the control. After 24 hours, the TLR9 RNA level decreases slightly, but is still 2-3 times higher than the control level. After 1 hour, TLR9 protein increases by 1.5 and 1.7 times, respectively, and further increased after 24h of culture.

An increase TLR9 protein expression correlates with an increase of the transcription factor NF-κB in lymphocytes and is accompanied by an increase in proinflammatory cytokine IL8 RNA, the transcription of IL8 is controlled by the NF-κB factor.

Thus, cfDNA(SZ) and cfDNA(K) stimulate the TLR9-NF-κB-proinflammatory cytokine signaling pathway in lymphocytes. The effect of cfDNA also depends on the concentration of these fragments in the extracellular environment. Since the concentrations of cfDNA in the blood of patients with schizophrenia are significantly increased compared to healthy donors, we should expect a much higher level of activation of the TLR9-NF-κB signaling pathway in the body cells of sick people.

Samples of cfDNA from patients with schizophrenia have a pronounced biological effect on cells of the immune system, stimulating the synthesis of pro-inflammatory cytokines by activating the TLR9-NF-κB-proinflammatory cytokines signaling pathway. High levels of cfDNA in blood plasma may be one of the reasons for the induction and maintenance of low-level inflammation in schizophrenia.

Keywords: schizophrenia, inflammation, cfDNA, Toll-like receptor, mononuclear cells, IL-8

Введение

Шизофрения — психическое заболевание сложной этиологии. Генетические факторы, факторы окружающей среды и акушерские осложнения влияют на развитие этой патологии [2, 5, 6]. Заболеванию шизофренией сопутствует окислительный стресс и воспаление. В крови больных обнаружены высокие уровни цитокинов, экспрессия генов которых контролируется транскрипционным фактором NF-κB [10]. Окислительный стресс и воспаление приводят к увеличению уровня гибели клеток. В результате в циркуляции в 2-3 раза возрастает концентрация внеклеточной ДНК (вкДНК) [1]. ВкДНК по нуклеотидному составу значительно отличается от геномной ДНК. В составе вкДНК плазмы крови повышено содержание GC-богатых фрагментов генома [4].

В последнее время концепция нейровоспаления вызывает большой интерес с точки зрения поиска новых подходов к терапии [4]. Провоспалительный транскрипционный фактор NF-κB может быть активирован различными путями, в том числе и путем активации Toll-подобных белков-рецепторов семейства TLR [7, 8, 9]. Значительное увеличение количества вкДНК в крови больных шизофренией и увеличение в циркуляции количества неметилованных GC-богатых фрагментов рибосомных генов [4] позволяет предположить, что фрагменты вкДНК могут выступать в роли лигандов ДНК-сенсоров TLR9, которые образуют комплексы с CpG содержащими неметилованными фрагментами вкДНК. TLR9 являются компонентами врожденной иммунной системы. Эти ДНК-сенсоры локализованы на поверхности клеточной мембраны и в эндосомах [7]. Стимуляция TLR9 индуцирует сигнальный каскад, который приводит к транслокации NF-κB в ядро и активации транскрипции генов провоспалительных цитокинов.

Для подтверждения гипотезы о возможном участии фрагментов вкДНК больных шизофренией в индукции воспаления путем активации сигнального пути TLR9-NF-κB-цитокины мы исследовали действие выделенных из плазмы крови образцов вкДНК здоровых и больных шизофренией мужчин на культивируемые мононуклеары человека.

В исследовании приняли участие 10 здоровых мужчин и 10 мужчин — больных шизофренией в возрасте от 18 до 35 лет. ВкДНК выделяли из 0,8 мл плазмы периферической крови методом экстракции фенол-хлороформом. Концентрацию вкДНК определяли флуориметрически, с краси-

телем PicoGreen (Invitrogen, США) на спектрофлуориметре (EnSpire PerkinElmer, США). Контроль выделения ДНК и анализ длин фрагментов проводили электрофорезом в 1% агарозном геле. В исследование биологического действия брали суммарный образец вкДНК здорового контроля и суммарный образец вкДНК больных (соответственно вкДНК(К) и вкДНК(SZ)). В образцах вкДНК было определено содержание GC-богатого маркера (рибосомного повтора, рДНК) методом нерадиоактивной количественной гибридизации [10].

Мононуклеары из периферической крови 4-х здоровых доноров выделяли центрифугированием в градиенте плотности (1,077 г/мл, «Панек», Россия). Клетки инкубировали в присутствии вкДНК(SZ), вкДНК(К) и геномной ДНК в концентрации 50 нг/мл среды [раствор Hanks, 1 mM HEPES (Fluka) и 10% ЭТС (HyClone, USA)].

Клетки для проточной цитометрии фиксировали 3,7% формалином 30 мин при 4°C, обрабатывали 90% метанолом. Использовали флуоресцентно-меченные специфические антитела: TLR9 (NBP2-24729, Novus Bio, США), NF-κB (bs-0465r-cy7, Bioss, США). Клетки инкубировали с антителами (1 мкг/мл, 1 час, 25° С), промывали PBS (Панек, Россия) и анализировали на проточном цитофлуориметре CytoFlexS (Beckman Coulter, США).

Выделение РНК из клеток осуществляли с использованием набора RNeasyPlus MiniKit (Qiagen, США). ПЦР в реальном времени проводили с использованием праймеров («Синтол», Москва) и красителя SybrGreen I на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, США). Праймеры, использованные в работе: *TBP* (референсный ген) (F: 5'-GCCCCGAAACGCCGAATAT-3'; R: 5'-CCGTGGTTCGTGGCTCTCT-3') *TLR9* (T G A A G A C T T C A G G C S S A A C T G ; T G C A C G G T C A C C A G G T T G T) ; *IL 8* (A A A T C T G G C A A C S S T A G T C T G ; G T G A G G T A A G A T G G T G G C T A A T).

Суммарные образцы вкДНК(К) и вкДНК(SZ) содержали соответственно 3,0 и 4,5 пг рДНК/нг ДНК, что в 2-3 раза превышает содержание рДНК в образцах клеточной ДНК (1,7 пг/нг ДНК). Для анализа биологического действия вкДНК на лимфоциты в среду культивирования клеток добавляли образцы вкДНК и образец клеточной ДНК в концентрации 50 нг/мл среды на 1 час (ранний ответ) и на 24 часа (поздний ответ). В отличие от клеточной ДНК, вкДНК(SZ) и вкДНК(К) стимулируют в мононуклеарах транскрипцию гена *TLR9*. В результате в клетках уже через 1 час в 2,9 и 3,3 раза по сравнению с контролем возрастает количество РНК *TLR9*.

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ОТВЕТЕ ЛИМФОЦИТОВ НА ДЕЙСТВИЕ ПРОБ вкДНК И клДНК. ДАННЫЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (ГЕН) И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ (БЕЛОК)

TABLE 1. CHANGES IN THE ACTIVITY OF GENES INVOLVED IN THE RESPONSE OF LYMPHOCYTES TO THE ACTION OF cfDNA AND clDNA SAMPLES. REAL-TIME PCR (RNA) AND FLOW CYTOMETRY (PROTEIN) DATA

Ген Белок Gene Protein	1 час 1 hour			24 часа 24 hours		
	клДНК clDNA	вкДНК(К) cfDNA(K)	вкДНК(SZ) cfDNA(SZ)	клДНК clDNA	вкДНК(К) cfDNA(K)	вкДНК(SZ) cfDNA(SZ)
TLR9	1,0±0,3	2,9±0,5*	3,3±0,5*	1,1±0,3	2,3±0,5*	2,9±0,5*
TLR9	1,1±0,1	1,5±0,4	1,7±0,3*	1,0±0,1	2,4±0,6*	2,3±0,5*
NF-κB	1,4±0,1*	2,3±0,4*	2,9±0,3*	1,1±0,1	1,4±0,6	1,9±0,5*
IL8	1,0±0,2	1,7±0,4*	1,8±0,3*	1,0±0,1	2,4±0,2*	2,5±0,5*

Примечание. * – различия с контролем достоверны (p < 0,05).

Note. *, differences with control are statistically reliable (p < 0.05).

Через 24 часа уровень РНК *TLR9* немного снижается, но по-прежнему превышает контрольный в 2-3 раза (табл. 1).

Количество белка определяли методом проточной цитометрии, анализируя фракцию лимфоцитов. При действии вкДНК(SZ) и вкДНК(К) на фоне повышенного уровня РНК через 1 час возрастает также и количество самого белка *TLR9* соответственно в 1,5 и 1,7 раза по сравнению с контролем. В отличие от РНК *TLR9*, уровень белка *TLR9* еще больше повышается через 24 часа культивирования.

Увеличение уровня экспрессии белка *TLR9* коррелирует с увеличением в лимфоцитах количества транскрипционного фактора NF-κB через 1 час культивирования в 2-3 раза. Через 24 часа количество фактора снижается, но превышает контрольный уровень. Действие образцов вкДНК сопровождается нарастанием количества РНК гена провоспалительного цитокина *IL8* (табл. 1), транскрипция которого контролируется фактором NF-κB.

Таким образом, вкДНК(SZ) и вкДНК(К) в лимфоцитах стимулируют сигнальный путь *TLR9*-NF-κB-провоспалительные цитокины. Эффекты, индуцируемые вкДНК(SZ) несколько

превышают эффекты от вкДНК(К) при введении в среду культивирования образцов вкДНК в одинаковой концентрации. Биологическое действие вкДНК зависит не только от GC-состава фрагментов, но и от концентрации этих фрагментов во внеклеточной среде. Поскольку концентрации вкДНК в крови больных шизофренией по сравнению со здоровыми донорами значительно увеличены [1], то следует ожидать и гораздо большего уровня активации сигнального пути *TLR9*-NF-κB в клетках организма больных людей.

Заключение

Образцы вкДНК больных шизофренией обладают выраженным биологическим действием на клетки иммунной системы, стимулируя синтез провоспалительных цитокинов путем активации сигнального пути *TLR9*-NF-κB-провоспалительные цитокины. Высокое содержание вкДНК в плазме крови может быть одной из причин индукции и поддержания в организме больного шизофренией низкоуровневого воспаления.

Список литературы / References

1. Жесткова Е.М., Ершова Е.С., Мартынов А.В., Захарова Н.В., Костюк Г.П., Вейко Н.Н., Костюк С.В. Концентрация циркулирующей внеклеточной ДНК в плазме периферической крови больных с острыми психозами эндогенной и экзогенной этиологии // Психиатрия, 2021. Т. 19, № 3. С. 6-14. [Jestkova E.M., Ershova E.S., Martynov A.V., Zakharova N.V., Kostyuk G.P., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Concentration of Circulating Cell-Free DNA in the Peripheral Blood Plasma of Patients with Acute Endogenous and Exogenous Etiology Psychoses. *Psikhiatriya = Psychiatry (Moscow)*, 2021, Vol. 19, no. 3, pp. 6-14. (In Russ.)]
2. Bramness J.G., Gundersen Ø.H., Guterstam, J., Rognli E.B., Konstenius M., Løberg E.-M., Medhus, S., Tanum, L., Franck, J. Amphetamine-induced psychosis – A separate diagnostic entity or primary psychosis triggered in the vulnerable? *BMC Psychiatry*, 2012, Vol. 12, 221. doi: 10.1186/1471-244X-12-221.
3. Chestkov I.V., Jestkova E.M., Ershova E.S., Golimbet V.E., Lezheiko T.V., Kolesina N.Y., Porokhovnik L.N., Lyapunova N.A., Izhevskaya V.L., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Abundance of ribosomal RNA gene copies in the genomes of schizophrenia patients. *Schizophr. Res.*, 2018 Jul;19, pp 305-314.
4. Ershova E.S., Jestkova E.M., Martynov A.V., Shmarina G.V., Umriukhin P.E., Bravve L.V., Zakharova N.V., Kostyuk G.P., Saveliev D.V., Orlova M.D., Bogush M., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Accumulation of Circulating Cell-Free CpG-Enriched Ribosomal DNA Fragments on the Background of High Endonuclease Activity of Blood Plasma in Schizophrenic Patients. *Int. J. Genomics*, 2019, Vol. 2019, 8390585. doi: 10.1155/2019/8390585.
5. Hilker R., Helenius, D., Fagerlund, B., Skytthe, A., Christensen, K., Werge T.M., Nordentoft, M., Glenthøj B. Heritability of Schizophrenia and Schizophrenia Spectrum Based on the Nationwide Danish Twin Register. *Biol. Psychiatry*, 2018, Vol. 83, pp. 492-498.
6. Grohs M.N., Reynolds, J.E., Liu, J., Martin, J.W., Pollock, T., Lebel, C., Dewey D., Kaplan B.J., Field C.J., Dewey D. Prenatal maternal and childhood bisphenol a exposure and brain structure and behavior of young children. *Environ. Health*, 2019, Vol. 18, 85. doi: 10.1186/s12940-019-0528-9.
7. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, pp 373-384.
8. McKernan D.P., Dennison U., Gaszner G., Cryan J.F., Dinan T.G. Enhanced peripheral toll-like receptor responses in psychosis: Further evidence of a pro-inflammatory phenotype. *Transl. Psychiatry*, 2011, Vol. 1, e36. doi: 10.1038/tp.2011.37.
9. Patlola S.R., Donohoe G., McKernan D.P. Counting the Toll of Inflammation on Schizophrenia – A Potential Role for Toll-like Receptors. *Biomolecules*, 2023, Vol. 13, 1188. doi: 10.3390/biom13081188.
10. Yang Q., Wang G., Zhang F. Role of peripheral immune cells-mediated inflammation on the process of neurodegenerative diseases. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 582825. doi: 10.3389/fimmu.2020.582825.

Авторы:

Ершова Е.С. – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Жесткова Е.М. – к.м.н., врач-психиатр, Московский амбулаторный центр психиатрии, психотерапии и наркологии «Осознанность выбора», Москва, Россия

Савинова Е.А. – научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Authors:

Ershova E.S., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Jestkova E.M., PhD (Medicine), Psychiatrist, Moscow Outpatient Center for Psychiatry, Psychotherapy and Narcology “Awareness of Choice”, Moscow, Russian Federation

Savinova E.A., Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Костюк С.Э. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Kostyuk S.E., Research Assistant, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Салимова Т.А. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Salimova T.A., Research Assistant, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Вейко Н.Н. — д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Veiko N.N., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Поступила 03.04.2024

Отправлена на доработку 04.04.2024

Принята к печати 17.04.2024

Received 03.04.2024

Revision received 04.04.2024

Accepted 17.04.2024

НАРУШЕНИЯ ТОЛЕРАНТНОСТИ МОНОЦИТОВ- МАКРОФАГОВ К ЛИПОПОЛИСАХАРИДУ У ПАЦИЕНТОВ С КОРОНАРНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

**Чегодаев Е.С.^{1,2}, Никифоров Н.Г.^{1,3}, Попов М.А.⁴, Шумаков Д.В.⁴,
Зыбин Д.И.⁴, Орехов А.Н.¹**

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

² ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Резюме. Атеросклероз является хроническим заболеванием, при котором в стенках артерий накапливаются липиды, клетки и различные белковые молекулы, образуя атеросклеротические бляшки. Образование и рост атеросклеротических бляшек приводит к ухудшению кровотока, за счет сужения просвета кровеносного сосуда. Известно, что атеросклероз сопровождается локальным воспалением, при этом в сосудистой стенке повышается количество иммунокомпетентных макрофагов гематогенного происхождения. Причины, по которым воспалительная реакция не может завершиться и переходит в хроническую форму, не ясны. Для разрешения воспаления и защиты тканей от высоких концентраций цитокинов, которые способны вызывать апоптоз, существует механизм иммунной толерантности врожденного иммунитета. Толерантность моноцитов-макрофагов к липополисахариду (LPS) это явление, при котором клетки снижают свою чувствительность к повторяющимся воздействиям LPS. Это состояние характеризуется снижением способности макрофагов вырабатывать провоспалительные цитокины и способствует разрешению воспаления. Мы предположили, что при атеросклерозе возможны нарушения толерантности в моноцитах-макрофагах. В исследовании были включены пациенты, которые были приняты в кардиохирургическое отделение МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского. Пациенты были разделены на больных коронарным атеросклерозом (CAD) с выявленным стенозом в 2 и более артериях и здоровых без стеноза в артериях по результатам коронарографии. В настоящем исследовании мы изучили способность макрофагов от 13 пациентов с CAD и 11 пациентов без него формировать толерантность к LPS. Для этого мы выделяли CD14⁺ моноциты из крови путем положительной селекции с помощью иммуномагнитного сепарирования

Адрес для переписки:

Чегодаев Егор Сергеевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»
125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, 8.
Тел.: 8 (926) 350-81-54.
E-mail: egozavr-ch@mail.ru

Address for correspondence:

Egor S. Chegodaev
Institute of General Pathology and Pathophysiology
8 Baltiyskaya St
Moscow
125315 Russian Federation
Phone: +7 (926) 350-81-54.
E-mail: egozavr-ch@mail.ru

Образец цитирования:

Е.С. Чегодаев, Н.Г. Никифоров, М.А. Попов,
Д.В. Шумаков, Д.И. Зыбин, А.Н. Орехов «Нарушения
толерантности моноцитов-макрофагов
к липополисахариду у пациентов с коронарным
атеросклерозом» // Медицинская иммунология, 2024.
Т. 26, № 5. С. 1031-1036.
doi: 10.15789/1563-0625-ITO-16792

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

For citation:

E.S. Chegodaev, N.G. Nikiforov, M.A. Popov, D.V. Shumakov,
D.I. Zybin, A.N. Orekhov "Impaired tolerance of monocyte-
macrophages to lipopolysaccharide in patients with coronary
atherosclerosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1031-1036.
doi: 10.15789/1563-0625-ITO-16792

© Chegodaev E.S. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ITO-16792

и подвергали двум последовательным стимуляциям LPS, непосредственно после выделения клеток и через 6 дней культивирования. Оценку секреции цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10 и хемокинов IL-8, CCL2 измеряли в супернатантах клеточных культур с использованием иммуноферментного анализа. Наши результаты показали нарушение толерантности макрофагов по секреции CCL2 и улучшение толерантности по секреции IL-8 после двух стимуляций LPS в макрофагах от пациентов с САД по сравнению с пациентами без него. Поскольку IL-8 и CCL2 являются хемоаттрактантами для других иммунных клеток, можно предположить, что наблюдаемые нарушения толерантности макрофагов к LPS при атеросклерозе повышают инфильтрацию других моноцитов в очаг воспаления, способствуя хронизации воспаления.

Ключевые слова: атеросклероз, толерантность, моноциты, макрофаги, цитокины, хемокины, LPS

IMPAIRED TOLERANCE OF MONOCYTE-MACROPHAGES TO LIPOPOLYSACCHARIDE IN PATIENTS WITH CORONARY ATHEROSCLEROSIS

Chegodaev E.S.^{a, b}, Nikiforov N.G.^{a, c}, Popov M.A.^d, Shumakov D.V.^d, Zybin D.I.^d, Orekhov A.N.^a

^a Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

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

^c Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. Atherosclerosis is a chronic disease in which lipids, cells and various proteins accumulate in the walls of the arteries, forming atherosclerotic plaques. The growth of plaques leads narrowing of the lumen of the blood vessels. Atherosclerosis is accompanied by local inflammation, while the number of hematogenous macrophages are derived from monocytes increases in the vascular wall. The reasons why the inflammatory reaction cannot be completed and becomes chronic are not clear. To resolve inflammation and protect tissues from high concentrations of cytokines that can cause apoptosis, there is a mechanism of immune tolerance of innate immunity. Lipopolysaccharide (LPS) tolerance of monocyte-macrophages is a phenomenon in which cells reduce their sensitivity to repeated exposure to LPS. This condition is characterized by a decrease in the ability of macrophages to produce proinflammatory cytokines and promotes resolution of inflammation. We hypothesized that in atherosclerosis, tolerance violations in monocyte-macrophages are possible. The study included patients who were admitted to the department of cardiac surgery, Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI). Patients were divided into patients with coronary atherosclerosis (CAD) with detected stenosis in 2 or more arteries and healthy controls without stenosis in the arteries according to the results of coronary angiography. In the present study, we examined the ability of macrophages from 13 patients with CAD and 11 patients without CAD to develop tolerance to LPS. To do this, we isolated CD14⁺ monocytes from the blood by positive selection using immunomagnetic separation and subjected them to two sequential LPS stimulations, immediately after cell isolation and after 6 days of culture. The secretion of cytokines TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-8, and CCL2 was measured in cell culture supernatants using by ELISA. Our results showed impaired macrophage tolerance for CCL2 secretion and improved tolerance for IL-8 secretion in macrophages from patients with CAD compared with patients without. Since IL-8 and CCL2 are chemoattractants for other immune cells, it can be assumed that the observed impairment of macrophage tolerance to LPS in atherosclerosis increases the infiltration of other monocytes into the inflammatory site, contributing to the chronicity of inflammation.

Keywords: atherosclerosis, tolerance, monocytes, macrophages, cytokines, chemokines, LPS

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 22-15-00273.

Введение

Атеросклероз является хроническим заболеванием, и сопровождается локальным воспалением в стенках артерий, где накапливаются жиры, холестерин, фибрин и инфильтраты клеток, образуя атеросклеротические бляшки. Атеросклеротические бляшки в стабильной форме характеризуются медленным ростом, их рост приводит к стенозу просвета кровеносных сосудов и блокированию кровотока [6]. В очагах локального воспаления обнаружены макрофаги моноцитарного происхождения. Моноциты в кровотоке прикрепляются к участкам дисфункционального эндотелия и мигрируют в субэндотелиальное пространство в ответ на хемотаксические сигналы, например моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1), или CCL2 [13]. Моноциты в атеросклеротических поражениях дифференцируются в макрофаги и постоянно подвергаются воздействию различных факторов микроокружения, таких как свободный холестерин, липопротеиды, компоненты умирающих клеток, цитокины, а также подвержены гипоксии и окислительному стрессу. Моноциты и макрофаги повторно подвергающиеся воздействию LPS, могут перепрограммировать свои состояния, они становятся менее чувствительными к воспалительным стимулам [9]. Это состояние характеризуется снижением окислительного метаболизма, снижением способности макрофагов

вырабатывать провоспалительные цитокины и способствует разрешению воспаления. Такое состояние называется толерантностью макрофагов [7]. Толерантность макрофагов была хорошо изучена в контексте инфекций, вызванных эндотоксином, таким как LPS [1]. Мы предположили, что при атеросклерозе возможны нарушения толерантности в моноцитах-макрофагах. **Целью настоящего исследования** было оценить способность макрофагов моноцитарного происхождения от пациентов с CAD и пациентов без CAD формировать толерантность к LPS.

Материалы и методы

Пациенты

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией, при этом все пациенты предоставили письменное информированное согласие. В клиническое исследование были включены пациенты (n = 24) из отделения кардиохирургии МОНИКИ имени М. Ф. Владимирского. Для исследования артерий пациентов с подозрением на стабильную ишемическую болезнь сердца (ИБС), таким пациентам была назначена коронарография. По результатам коронарографии пациенты были разделены на больных коронарным атеросклерозом с выявленным стенозом в 2 и более артериях и здоровых без стеноза в артериях (табл. 1).

Выделение и культивирования CD14⁺ моноцитов

Образцы периферической крови от пациентов собирали в пробирки Improvacuter. Образцы крови центрифугировали 30 минут 500 g при

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS IN THE STUDY GROUPS

	Пациенты без CAD Healthy (n = 11)	Пациенты CAD CAD (n = 13)	p-уровень значимости p-values
Мужчины (%) Male (%)	100	100	
Возраст (г) Age (Yr)	61,8±6,1	58,2±3,4	0,1
Gensini Score	0	84,5±18,5	** < 0,001
СРБ (ммоль/л) CRP (mM/L)	4,7±1,6	4,3±2,4	0,6
Общий холестерин (ммоль/л) Total Cholesterol (mM/L)	4,1±0,4	4,2±0,5	0,7
Триглицериды (ммоль/л) Triglycerides (mM/L)	1,6±0,7	1,5±0,5	0,7
ЛПВП (ммоль/л) HDL Cholesterol (mM/L)	1,3±0,36	1,3±0,32	0,85
ЛПНП (ммоль/л) LDL Cholesterol (mM/L)	2,8±0,65	2,9±0,7	0,7

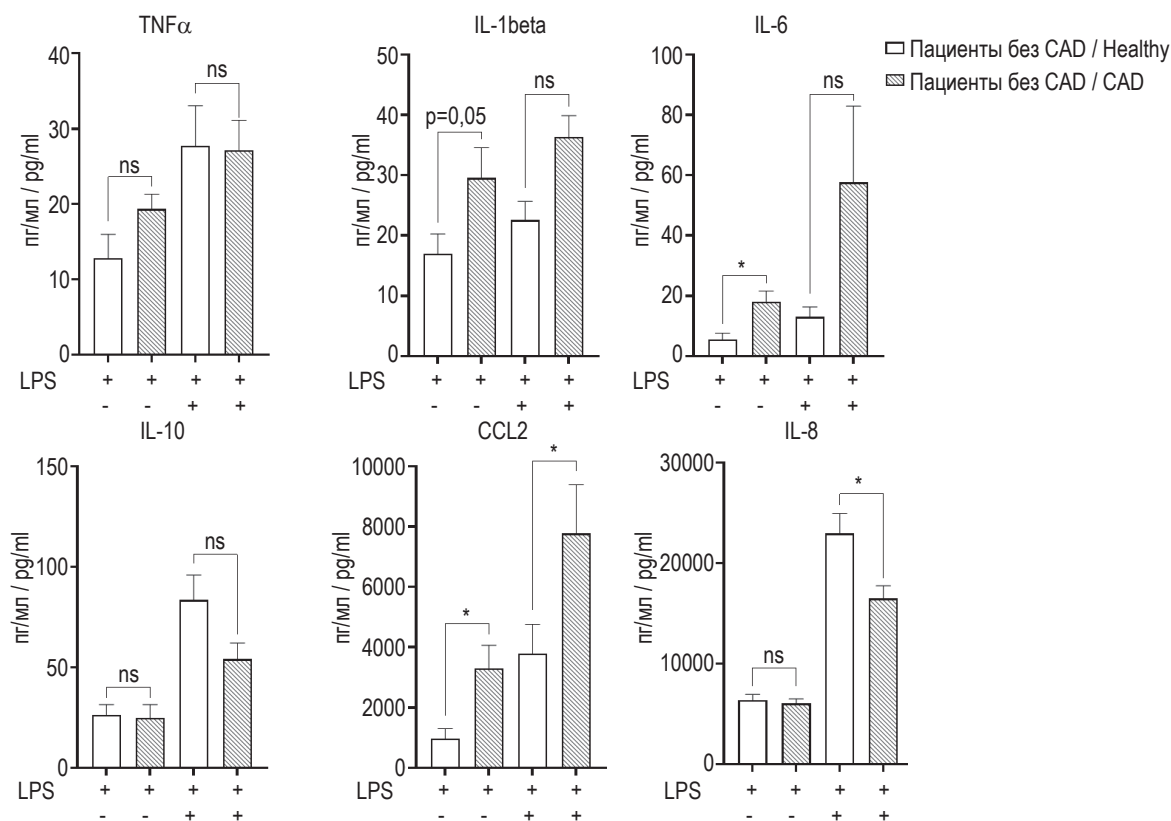


Рисунок 1. Секретия цитокинов TNFα, IL-1β, IL-6, IL-10 и хемокинов IL-8, CCL2 макрофагами на 7 день культивирования при одинарной и при двойной стимуляции LPS от пациентов с CAD и без него

Примечание. * p < 0,05 (t-тест), ns – нет значимости.

Figure 1. Secretion of cytokines TNFα, IL-1β, IL-6, IL-10 and chemokines IL-8, CCL2 by macrophages on day 7 of culture under single and double LPS stimulation from patients with and without CAD

Note. * p < 0.05 (t-test); ns, no significance.

комнатной температуре в градиенте плотности фикола (Панэко, Россия) для разделения плазмы, лейкоцитарной фракции и эритроцитов. Из фракции лейкоцитов моноциты выделяли путем положительной селекции с помощью иммуномагнитных частиц CD14⁺ (Milteny Biotec, Германия). Чистоту проверяли методом проточной цитометрии, > 90% клеток CD14⁺. Выделенные моноциты рассаживали в 48-е планшеты без обработки поверхности (SPL Life Sciences, Корея) по 0,5 × 10⁶ клеток на 0,5 мл без сывороточной среды X-Vivo 10 (Lonza, Швейцария). Для индукции воспалительного ответа клетки стимулировали LPS из *Escherichia coli* O111:B4 [1 мкг/мл] (Sigma-Aldrich, США). На следующий день собирали супернатанты и культивировали клетки в свежей культуральной среде еще 5 дней. На 6-й день культуральную среду снова обновляли и добавляли LPS, чтобы индуцировать вторую стимуляцию. На 7-е сутки собирали супернатанты и замораживали при -80 °С.

Оценка секреции цитокинов

Уровни цитокинов TNFα, IL-1β, IL-6, IL-10 и хемокинов IL-8, CCL2 измеряли в супернатан-

тах клеточных культур с использованием иммуноферментного анализа (ELISA) в соответствии с инструкциями производителя (R&D Systems, США).

Статистический анализ

Анализ результатов и статистическую обработку проводили в программе IBM SPSS Statistics. Различия между группами оценивали с помощью t-теста. Визуализация результатов была выполнена в программе GraphPad Prism. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Достоверность была определена при p < 0,05 и отмечена на графиках.

Результаты и обсуждение

Для оценки толерантности макрофагов, клетки стимулировали LPS в течение суток после выделения CD14⁺ и повторно стимулировали (или не стимулировали) LPS в течение суток на 6 день культивирования. Ключевым результатом настоящего исследования является то, что у пациентов с CAD мы наблюдали нарушенную толерантность моноцитов-макрофагов по секреции CCL2, ко-

торая проявлялась в повышенной секреции после двух стимуляций (рис. 1). Интересно что при двукратной стимуляции LPS, толерантность макрофагов от больных САД по секреции IL-8 сформировалась лучше, за счет снижения секреции этого хемокина у пациентов с САД в сравнении с пациентами без САД (рис. 1). Результаты оценки секреции цитокинов и хемокинов макрофагами при однократной стимуляции показали повышенную секрецию таких цитокинов как IL-1 β ($p = 0,05$), IL-6 и хемокина CCL2 у пациентов с САД по сравнению с пациентами без САД (рис. 1). Важно отметить, что секреция TNF α , IL-1 β , IL-6 и IL-10 макрофагами при однократной стимуляции была на низком уровне и возникают трудности при интерпретации достоверных различий между группами пациентов по IL-1 β и IL-6.

CCL2 секретируют моноциты и макрофаги для привлечения других иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления [3]. Было показано, что CCL2 привлекает миелоидные клетки в места поражения сосудов и, что блокирование сигналинга CCL2-CCR2 приводило к снижению развития атеросклероза в мышечной модели [4]. Результаты нашего исследования согласуются с этими результатами, более того, мы показали, что уровень секреции CCL2 в однократно и двукратно стимулированных макрофагов выше у пациентов с САД по сравнению с пациентами без САД, что свидетельствует о нарушении толерантности макрофагов. Возможно, нарушение толерантности макрофагов по CCL2 в атеросклеротических поражениях приводит к увеличению бляшек и дальнейшим тяжелым последствиям. Также результаты нарушения толерантности макрофагов по CCL2 согласуются с ранее полученными нами данными в предыдущем клиническом исследовании [10]. Уровень секреции IL-8 при повторной стимуляции напротив, был ниже у пациентов с САД в сравнении с пациентами без САД. IL-8 стимулирует воспалительную реакцию посредством связывания с двумя его рецепторами: хемокиновым рецептором CXCR1 (CXCR1) и хемокиновым рецептором CXCR2 (CXCR2), в

первую очередь на нейтрофилах, а также моноцитах и других иммунных клетках, способствуя ранней фазе образования атеросклеротических бляшек *in vivo* [2, 11]. IL-8 был идентифицирован как критический регулятор функции эндотелиальных и гладкомышечных клеток, вызывая дисфункцию эндотелия [8]. Было показано что уровень IL-8 повышался у пациентов с заболеванием периферических артерий [12], что не согласуется с нашими результатами. Возможной причиной этого несоответствия является измерение цитокинов в плазме крови, а не в культуральной жидкости макрофагов. Снижение секреции IL-8 макрофагами по всей видимости ассоциировано с атеросклерозом. Стоит отметить, что концентрация секретируемых хемокинов IL-8 и CCL2 значительно выше, чем провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10. Это может быть обусловлено тем, что хемокины индуцируют миграцию лейкоцитов в субэндотелиальный участок пораженной интимы сосудов за счет градиента концентрации [5].

Заключение

В настоящей работе мы обнаружили нарушения в толерантности макрофагов к липополисахариду от больных коронарным атеросклерозом по сравнению со здоровыми донорами. Причем это нарушение проявлялось в повышенной секреции хемокина CCL2 макрофагами. Возможно, нарушения толерантности в хемокиновом ответе макрофагов, которые находятся в участках пораженных сосудов, способствует привлечению еще большего количества иммунных клеток, что приводит к хронизации воспаления и прогрессии атеросклероза.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН, за возможность использования научного оборудования.

Список литературы / References

1. Benjaskulluecha S., Boonmee A., Pattarakankul T., Wongprom B., Klomsing J., Palaga T. Screening of Compounds to Identify Novel Epigenetic Regulatory Factors That Affect Innate Immune Memory in Macrophages. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, 1912. doi: 10.1038/s41598-022-05929-x.
2. Cambier S., Gouwy M., Proost, P. The Chemokines CXCL8 and CXCL12: Molecular and Functional Properties, Role in Disease and Efforts towards Pharmacological Intervention. *Cell. Mol. Immunol.*, 2023, Vol. 20, pp. 217-251.
3. Deshmane S.L., Kremlev S., Amini S., Sawaya B.E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2009, Vol. 29, pp. 313-326.
4. Gencer S., Evans B.R., van der Vorst E.P.C., Döring Y., Weber C. Inflammatory Chemokines in Atherosclerosis. *Cells*, 2021, Vol. 10, 226. doi:10.3390/cells10020226.
5. Hedayati-Moghadam M., Hosseini S., Paseban M., Shabgah A.G., Gholizadeh J., Jamialahmadi T., Sathyapalan T., Sahebkar A. The Role of Chemokines in Cardiovascular Diseases and the Therapeutic Effect of

Curcumin on CXCL8 and CCL2 as Pathological Chemokines in Atherosclerosis. In Natural Products and Human Diseases: Pharmacology, Molecular Targets, and Therapeutic Benefits, Sahebkar, A., Sathyapalan, T., Eds., Springer International Publishing: Cham, 2021, pp. 155-170.

6. Hou P., Fang J., Liu Z., Shi Y., Agostini M., Bernassola F., Bove P., Candi E., Rovella V., Sica G., Sun Q., Wang Y., Scimeca M., Federici M., Mauriello A., Melino G. Macrophage Polarization and Metabolism in Atherosclerosis. *Cell Death Dis.*, 2023, Vol. 14, pp. 1-14.

7. Langston P.K., Nambu A., Jung J., Shibata M., Aksoylar H.I., Lei J., Xu P., Doan M.T., Jiang H., MacArthur M.R., Gao X., Kong Y., Chouchani E. T., Locasale J. W., Snyder N. W., Horng T. Glycerol Phosphate Shuttle Enzyme GPD2 Regulates Macrophage Inflammatory Responses. *Nat. Immunol.*, 2019, Vol. 20, pp. 1186-1195.

8. Lv G., Zhu H., Li C., Wang J., Zhao D., Li S., Ma L., Sun G., Li F., Zhao Y., Gao Y. Inhibition of IL-8-Mediated Endothelial Adhesion, VSMCs Proliferation and Migration by siRNA-TMEM98 Suggests TMEM98's Emerging Role in Atherosclerosis. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, 88043-88058.

9. Morante-Palacios O., Lorente-Sorolla C., Ciudad L., Calafell-Segura J., Garcia-Gomez A., Català-Moll F., Ruiz-Sanmartín A., Martínez-Gallo M., Ferrer R., Ruiz-Rodríguez J.C., Álvarez-Errico D., Ballestar E. JAK2-STAT Epigenetically Regulates Tolerized Genes in Monocytes in the First Encounter With Gram-Negative Bacterial Endotoxins in Sepsis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 734652. doi: 10.3389/fimmu.2021.734652.

10. Nikiforov N.G., Kirichenko T.V., Kubekina M.V., Chegodaev Y.S., Zhuravlev A.D., Ilchuk L.A., Nikolaeva M.A., Arefieva A.S., Popov M.A., Verkhova S.S., Bagheri Ekta M., Orekhov A. N. Macrophages Derived from LPS-Stimulated Monocytes from Individuals with Subclinical Atherosclerosis Were Characterized by Increased pro-Inflammatory Activity. *Cytokine*, 2023, Vol. 172, 156411. doi:10.1016/j.cyto.2023.156411.

11. Russo R.C., Garcia C.C., Teixeira M.M., Amaral F.A. The CXCL8/IL-8 Chemokine Family and Its Receptors in Inflammatory Diseases. *Exp. Rev. Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 10, pp. 593-619.

12. Szomjak E., Der H., Kerekes G., Veres K., Csiba L., Toth J., Peter M., Soltesz P., Szodoray P. Immunological Parameters, Including CXCL8 (IL-8) Characterize Cerebro- and Cardiovascular Events in Patients with Peripheral Artery Diseases. *Scand. J. Immunol.*, 2010, Vol. 71, pp. 283-291.

13. Zhang H., Yang K., Chen F., Liu Q., Ni J., Cao W., Hua Y., He F., Liu Z., Li L., Fan G. Role of the CCL2-CCR2 Axis in Cardiovascular Disease: Pathogenesis and Clinical Implications. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 975367. doi: 10.3389/fimmu.2022.975367.

Авторы:

Чегодаев Е.С. — лаборант-исследователь лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; аспирант ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Никифоров Н.Г. — к.б.н., заведующий лабораторией ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Попов М.А. — к.м.н., кардиохирург отделения кардиохирургии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Шумаков Д.В. — д.м.н., член-корр. РАН, руководитель отделения кардиохирургии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Зыбин Д.И. — к.м.н., заведующий отделением кардиохирургии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Орехов А.Н. — д.б.н., научный руководитель лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Authors:

Chegodaev E.S., Research Laboratory Assistant, Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology; Postgraduate Student, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Nikiforov N.G., PhD (Biology), Head, Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology; Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Popov M.A., PhD (Medicine), Cardiac Surgeon, Department of Cardiac Surgery, Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Shumakov D.V., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Cardiac Surgery, Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Zybin D.I., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Cardiac Surgery, Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Orekhov A.N., PhD (Biology), Scientific Advisor, Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 31.03.2024
Отправлена на доработку 03.04.2024
Принята к печати 22.04.2024

Received 31.03.2024
Revision received 03.04.2024
Accepted 22.04.2024

ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ БЕТА-КЛЕТОК ПРИ РАЗВИТИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Белоусова А.В., Соколова К.В., Данилова И.Г., Черешнева М.В.,
Черешнев В.А.

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Сахарный диабет второго типа характеризуется слабо выраженной воспалительной реакцией в поджелудочной железе, что влияет на структуру и функции панкреатических островков: количество β -клеток уменьшается и растет число α -клеток. В работе исследовали особенности дифференцировки β -клеток в условиях развития экспериментального сахарного диабета второго типа и при снижении воспалительного процесса. Применялись биохимические, гистологические методы, иммуноферментный анализ, иммуногистохимические методы с использованием первичных антител к инсулину, глюкагону, маркеру пролиферации Ki-67 и вторичных антител, меченых флюоресцентными красителями. Для моделирования сахарного диабета второго типа использовали стрептозотцин и никотинамид, а для снижения воспалительной реакции натриевую соль 5-амино-2,3-дигидрофалазин-1,4-диона. В предыдущих исследованиях было показано, что она меняет фенотип макрофагов с провоспалительного M1 на противовоспалительный M2. При сахарном диабете второго типа на фоне уменьшения в панкреатических островках количества макрофагов с маркером CD163 и концентрации цитокина TGF- β 1, обладающих противовоспалительным действием, наблюдалось снижение числа β -клеток и их функциональной активности, в то время как содержание α -клеток, синтезирующих глюкагон, росло. После введения натриевой соли 5-амино-2,3-дигидрофалазин-1,4-диона в островках поджелудочной железы отмечалась противоположная картина: на фоне увеличения числа CD163⁺ макрофагов и содержания TGF- β 1 росло количество β -клеток и снижалось число α -клеток. Рост числа инсулинсинтезирующих клеток не сопровождался их митотической активностью. Вероятно, снижение количества CD163⁺ макрофагов и уровня противовоспалительного цитокина TGF- β 1 в островках являются факторами, способствующими изменению микроокружения клеток и, как следствие, дифференцировке β -клеток в α -клетки. Напротив, рост числа CD163⁺ макрофагов и TGF- β 1 на фоне введения натриевой соли 5-амино-2,3-дигидрофалазин-1,4-диона, предположительно, способствует обратной дифференцировке α -клеток в β -клетки и восстановлению синтеза инсулина поджелудочной железой. Целенаправленное воздействие на микроокружение клеток в панкреатическом островке при сахарном диабете второго типа может являться новым подходом к лечению заболевания.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, α -клетки, β -клетки, дифференцировка β -клеток, макрофаги, цитокины

Адрес для переписки:

Белоусова Анна Викторовна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106
Тел.: 8 (906) 806-55-09.
E-mail: A1b2v3@mail.ru

Address for correspondence:

Anna V. Belousova
Institute of Immunology and Physiology,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
106 Pervomajskaya St
Yekaterinburg
620049 Russian Federation
Phone: +7 (906) 806-55-09.
E-mail: A1b2v3@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Белоусова, К.В. Соколова, И.Г. Данилова,
М.В. Черешнева, В.А. Черешнев «Особенности
дифференцировки бета-клеток при развитии сахарного
диабета 2 типа» // Медицинская иммунология, 2024.
Т. 26, № 5. С. 1037-1044.
doi: 10.15789/1563-0625-FOB-16880

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

For citation:

A.V. Belousova, K.V. Sokolova, I.G. Danilova,
M.V. Cheresheva, V.A. Cheresheva "Features of beta cell
differentiation during the development of type 2 diabetes
mellitus", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1037-1044.
doi: 10.15789/1563-0625-FOB-16880

© Belousova A.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-FOB-16880

FEATURES OF BETA CELL DIFFERENTIATION DURING THE DEVELOPMENT OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Belousova A.V., Sokolova K.V., Danilova I.G., Chereshneva M.V., Chereshnev V.A.

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Type 2 diabetes mellitus is characterized by a mild inflammatory reaction in the pancreas, which affects the structure and function of the pancreatic islets: the number of β -cells decreases and the number of α -cells increases. The work examined the features of β -cell differentiation in the development of experimental type 2 diabetes mellitus and while reducing the inflammatory process. Biochemical, histological methods, enzyme-linked immunosorbent assay, immunohistochemical methods were used using primary antibodies to insulin, glucagon, proliferation marker Ki-67 and secondary antibodies labeled with fluorescent dyes. Streptozotocin and nicotinamide were used to model type 2 diabetes mellitus, and the sodium salt of 5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione was used to reduce the inflammatory response. Previous studies have shown that it changes the macrophage phenotype from proinflammatory M1 to anti-inflammatory M2. In type 2 diabetes mellitus, against the background of a decrease in the number of macrophages with the CD163 marker and the concentration of the cytokine TGF- β 1, which have an anti-inflammatory effect, in the pancreatic islets, a decrease in the number of β -cells and their functional activity was observed, while the content of α -cells synthesizing glucagon increased. After administration of the sodium salt of 5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione, the opposite picture was observed in the pancreatic islets: against the background of an increase in the number of CD163⁺ macrophages and the content of TGF- β 1, the number of β cells increased and the number of α cells decreased-cells. The increase in the number of insulin-synthesizing cells was not accompanied by their mitotic activity. It is likely that a decrease in the number of CD163⁺ macrophages and the level of the anti-inflammatory cytokine TGF- β 1 in the islets are factors contributing to changes in the cell microenvironment and, as a consequence, the differentiation of β -cells into α -cells. On the contrary, an increase in the number of CD163⁺ macrophages and TGF- β 1 against the background of administration of the sodium salt of 5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione presumably promotes reverse differentiation of α -cells into β -cells and restoration of insulin synthesis pancreas. Targeted effects on the microenvironment of cells in the pancreatic islet in type 2 diabetes mellitus may be a new approach to treating the disease.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, α -cells, β -cells, β -cell differentiation, macrophages, cytokines

Работа выполнена в рамках гос. задания ИИФ УрО РАН (регистрационный номер темы 122020900136-4) с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

Введение

Число пациентов, страдающих сахарным диабетом растет с каждым годом. В связи с этим, изучение патологических процессов, происходящих в островках поджелудочной железы и задачи по поиску новых методов лечения остаются актуальными. В настоящее время установлено, что при воздействии повреждающих факторов

β -клетки теряют свою функциональную активность [6, 11]. Известно, что при сахарном диабете 2 типа количество β -клеток уменьшается и растет число α -клеток. Высокие концентрации IL-1 β подавляют экспрессию генов, специфичных для β -клеток, что стимулирует их дифференцировку в α -клетки [3]. Сокращение длительности воздействия повреждающих факторов или уменьшение их концентрации приводит к возвращению функционального состояния, характерного для β -клетки [7, 10]. В данном исследовании рассматривались особенности дифференцировки инсулинсинтезирующих клеток в условиях развития экспериментального сахарного диабета 2 типа

(СД2) и при уменьшении интенсивности воспалительного процесса. Для снижения воспалительной реакции использовали натриевую соль 5-амино-2,3-дигидрофалазин-1,4-диона (АФГ). Ранее было показано, что АФГ меняет продукцию макрофагов в сторону противовоспалительной [1] и приводит к частичному восстановлению количества β -клеток при экспериментальном СД [5].

Материалы и методы

Эксперименты проводились на крысах-самцах линии Wistar возрастом 12-13 недель ($n = 28$). На проведение исследования получено разрешение Этического Комитета ИИФ УрО РАН (протокол № 07/19 от 18.12.19). Для создания модели СД2 внутрибрюшинно вводили водный раствор никотинамида (Sigma-Aldrich, США) 110 мг/кг, а через 15 минут – раствор стрептозотоцина (Sigma-Aldrich, США) в цитратном буфере 65 мг/кг [8, 9, 13]. Случайным образом крысы были поделены на 4 группы: интактные крысы, крысы с экспериментальным СД2 продолжительностью 30 и 60 суток, крысы с экспериментальным СД2, которым, начиная с 30-го дня эксперимента, в течение месяца внутримышечно вводили АФГ в дозе 2 мг/кг по схеме, описанной в [5].

Концентрацию глюкозы в плазме определяли глюкозооксидазным методом с использованием наборов реагентов производства «Вектор-Бест» (Россия), концентрацию инсулина в крови, а также TGF- β 1 в гомогенате и крови поджелудочной железы оценивали методом ИФА с использованием автоматического анализатора LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM (Dynex Technologies, США) и наборов Rat/Mouse Insulin ELISA (Millipore, Германия) и TGF- β 1 крысы, 2 \times 96 тестов, BMS623 Bioscience

Относительное содержание гликированного гемоглобина в цельной крови оценивали методом аффинной хроматографии с использованием наборов реагентов «Гликогемотест» («Элта», Россия). Оральный глюкозотолерантный тест (ОГТТ) и расчет индекса инсулинорезистентности НОМА-IR проводились по стандартным методикам.

Ткань поджелудочной железы фиксировали в 10% формалине в течение 24 часов и подвергали стандартной процедуре гистологической проводки и заливки в парафин. Для проведения морфометрического исследования срезы ткани толщиной 3 мкм окрашивали гематоксилином и эозином с использованием Autostainer DAKO и изучали с использованием микроскопа Leica DM2500 с видеокамерой Leica DFC420 и про-

граммного обеспечения Leica Application Suite. Определяли количество островков на мм² ткани, их площадь, мкм² и число клеток на мм² площади островка.

Количественную оценку содержания макрофагов F4/80⁺ и CD163⁺ в панкреатических островках проводили с помощью иммуногистохимического метода окрашивания с применением антител (Anti-Rat F4/80 antibody PA5-21399, ThermoFisher и Anti-ratCD163/M130antibody (ED2); MA5-16658, ThermoScientific, Waltham). Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-систему NovolinkTMPolymer-DetectionSystem (NovocastraLab., Ltd), включающую хромогенный субстрат 3,3-диаминобензидин (DAB) в забуференном растворе. DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию цитоплазмы.

Для выявления α - и β -клеток проводили двойное иммунофлуоресцентное окрашивание ткани поджелудочной железы с использованием антител к инсулину (Anti-Rat Insulin/Proinsulin antibody; MA5-12042, ThermoScientific, Waltham), глюкагону (GCG Antibody, Cusabio), а также вторичных антител с флуоресцентными метками Alexa fluor (Goat anti-mouse, A31555 invitrogen) и Texas Red (Goat anti-rabbit, T6390 invitrogen). Пролиферирующие β -клетки определяли методом двойного флуоресцентного окрашивания ткани поджелудочной железы с использованием антител Anti-Rat Ki-67 antibody; PA1-21520 и вторичных антител с флуоресцентными метками. Ядра докрашивали DAPI (ThermoScientific). В качестве негативного контроля использовали срезы поджелудочной железы, окрашенные без первичных антител.

Визуализацию изображений осуществляли с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 710 (CARL ZEISS, Германия) и программного обеспечения ZEN2010. На препаратах определяли количество инсулин+ (β -клетки), глюкагон+ (α -клетки) и инсулин+ глюкагон+ клеток и подсчитывали количество пролиферирующих β -клеток (инсулин+ Ki67+ клетки) на мм² площади островка. Определяли оптическую плотность цитоплазмы инсулин+ клеток, зависящую от количества связанных антител и характеризующую содержание инсулина в клетках. Обработка изображений велась при помощи программы ImageJ [12]. Подсчет количества инсулин+, глюкагон+ и инсулин+глюкагон+ клеток производился с помощью программы Cell Profiler [14].

Для статистической обработки полученных результатов использовали непараметрический критерий Краскела—Уоллиса для множественных парных сравнений. Отличия считались достоверными при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm ошибки среднего.

Результаты и обсуждение

Показатели гипергликемии, ОГТТ и концентрация инсулина в плазме крови указывали на развитие СД2. При введении АФГ содержание глюкозы в крови и индекс НОМА-IR уменьшались, а уровень инсулина увеличивался (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА
TABLE 1. INDICATORS OF CARBOHYDRATE METABOLISM

Показатели Indicators	Интактная группа Intact group	Сахарный диабет 2 типа Diabetes mellitus type 2		
		30 суток 30 days	60 суток 60 days	60 суток + АФГ 60 days + APH
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	6,0 \pm 0,2 ^{2,3,4}	12,1 \pm 1,0 ^{1,4}	12,2 \pm 0,5 ^{1,4}	8,5 \pm 1,4 ^{1,2,3}
Гликированный гемоглобин, % Glycatedhemoglobin, %	4,3 \pm 0,3	5,0 \pm 0,7	4,5 \pm 0,6	4,8 \pm 0,6
Инсулин, мкЕд/мл Insulin, mU/mL	22,0 \pm 2,1 ³	16,9 \pm 4,1	15,2 \pm 3,9 ^{1,4}	18,7 \pm 4,3 ³
НОМА-IR(инсулин, мкЕд/мл \times глюкоза, ммоль/л) / 22,5 НОМА-IR (insulin, μ U/mL \times glucose, mmol/L) / 22.5	5,9 \pm 0,7 ³	9,1 \pm 3,1	8,3 \pm 1,9 ¹	7,1 \pm 3,1
Оральный глюкозотолерантный тест Oralglucosetolerancetest				
Группа Group	До нагрузки Before load	Глюкоза крови, ммоль/л Bloodglucose, mmol/L		
		Время после нагрузки глюкозой (1 г/кг), мин Time after load with glucose (1 g/kg), min		
		30	60	90
Интактная Intact	5,3 \pm 0,1	9,0 \pm 0,3 ⁵	7,0 \pm 0,9	5,2 \pm 0,8
СД2 30 суток T2DM 30 days	9,3 \pm 0,4	18,1 \pm 2,4 ⁵	12,1 \pm 0,3 ⁵	11,9 \pm 0,6 ⁵

Примечание. ¹ – $p < 0,05$ в сравнении с интактной группой; ² – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 30 суток; ³ – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 60 суток; ⁴ – $p < 0,05$ в сравнении с группой СД2 60 суток; ⁵ – $p < 0,05$ в сравнении со значениями до нагрузки глюкозой в своей группе.

Note. ¹, $p < 0.05$ in comparison with the intact group; ², $p < 0.05$ in comparison with the T2DM group for 30 days; ³, $p < 0.05$ in comparison with the T2DM group for 60 days; ⁴, $p < 0.05$ in comparison with the T2DM group for 60 days; ⁵, $p < 0.05$ in comparison with the values before glucose loading in the same group.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ МАКРОФАГОВ В ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКАХ И ИХ ПРОДУКЦИЯ

TABLE 2. CONTENT OF MACROPHAGES IN PANCREATIC ISLETS AND THEIR PRODUCTS

Показатели Indicators	Экспериментальная группа Experimental group			
	Интактная Intact	Сахарный диабет 2 типа Diabetes mellitus type 2		
		30 суток 30 days	60 суток 60 days	60 суток + АФГ 60 days + APH
F4/80⁺ макрофаги, N/мм² площади островка F4/80 ⁺ macrophages, N/mm ² of islet	137,8±29	125,9±35	163,6±26	165,3±14
CD163⁺ макрофаги, усл. ед. CD163 ⁺ macrophages, arb. units	0,3±0,098 ³	0,3±0,11 ³	0,03±0,02 ^{1,2,4}	0,2±0,05 ³
TGF-β1 в плазме крови, пг/мл TGF-β1 in blood, pg/mL	271,2±14,2 ^{2,3,4}	148,9±12,4 ^{1,4}	127,1±6,7 ^{1,4}	187,1±16,4 ^{1,2,3}
TGF-β1 в гомогенате поджелудочной железы, пг/мл TGF-β1 in pancreas, pg/mL	264,1±57,6 ^{2,3}	114,8±9,2 ^{1,4}	128,1±20,5 ^{1,4}	182,7±31,2 ^{2,3}

Примечание. ¹ – p < 0,05 в сравнении с интактной группой; ² – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 30 суток; ³ – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 60 суток; ⁴ – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 60 суток.

Note. ¹, p < 0.05 in comparison with the intact group; ², p < 0.05 in comparison with the T2DM group for 30 days; ³, p < 0.05 in comparison with the T2DM group for 60 days; ⁴, p < 0.05 in comparison with the T2DM group for 60 days.

Маркер F4/80 присутствует на поверхности тканевых макрофагов и используется для их идентификации [4]. Количество макрофагов F4/80⁺ в островках поджелудочной железы оставалось неизменным во всех экспериментальных группах, в то время как содержание в островках макрофагов с маркером CD163, обладающих противовоспалительной активностью, снижалось на 60-е сутки развития СД2. При введении АФГ их количество увеличивалось и достигало значений интактной группы. Концентрация TGF-β1 в поджелудочной железе и плазме крови снижалась при диабете и росла под действием АФГ (табл. 2). Поскольку семейство трансформирующих ростовых факторов бета контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток [2], наблюдаемое изменение концентрации TGF-β1 влияет на процессы, происходящие в панкреатических островках при разной степени выраженности воспалительной реакции.

Количество островков поджелудочной железы и их площадь во всех группах оставались неизменными; при введении АФГ росло общее число клеток в островке. Пролиферативная активность β-клеток во всех группах была одинаковой, при этом на 30-е сутки уменьшалось число β-клеток и оптическая плотность цитоплазмы в них, а число α-клеток увеличивалось. На 60-е сутки на фоне дальнейшего снижения количества β-клеток и роста числа α-клеток возрастало содержание инсулин+глюкагон+клеток. После воздействия АФГ наблюдался рост количества β-клеток, а число α- и инсулин+глюкагон+клеток уменьшалось. Также отмечалось увеличение оптической плотности β-клеток, что согласуется с увеличением концентрации инсулина в плазме крови и свидетельствует о восстановлении функциональной активности β-клеток (табл. 3).

ТАБЛИЦА 3. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ОСТРОВКОВ

TABLE 3. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF PANCREATIC ISLETS

Показатели Indicators	Экспериментальная группа Experimental group			
	Интактная Intact	Сахарный диабет 2 типа Diabetes mellitus type 2		
		30 суток 30 days	60 суток 60 days	60 суток + АФГ 60 days + APH
Количество панкреатических островков, N/мм ² ткани Number of pancreatic islet, N/mm ² tissue	1,9±0,2	1,9±0,4	1,6±0,4	2,5±0,5
Площадь островка, мкм ² Islet area, μm ²	8073,2±952,8	9476,9±749,2	9586,9±607,8	7733,2±773,6
Количество клеток в островке, N/мм ² Number of cells in the islet, N/mm ²	12099,6±435,6 ⁴	11457,6±630,9 ⁴	10230,7±535,8 ⁴	13145,4±166,7 ^{1,2,3}
β-клетки, N/ мм ² островка β-cells, N/mm ² islet	6943,9±256,8 ^{2,3}	4837,2±241,8 ^{1,3,4}	4015,1±245,7 ^{1,2,4}	6752,1±219 ^{2,3}
Пролиферирующие β-клетки, N/мм ² островка Proliferating β-cells, N/mm ² islets	47,9±6,2	69,0±12,8	108,1±39,7	93,1±37,6
Оптическая плотность цитоплазмы β-клеток, усл. ед Optical density of β-cell cytoplasm, arb. units	1,2±0,3 ^{2,3}	0,7±0,1 ^{1,4}	0,5±0,2 ^{1,4}	1,4±0,4 ^{2,3}
α-клетки, N/ мм ² островка α-cells, N/mm ² islet	1503,8±218,7 ^{2,3,4}	3045,1±459,8 ^{1,3}	4566,2±401,1 ^{1,2,4}	3620,8±396,9 ^{1,3}
Инсулин+ глюкагон+ клетки, N/ мм ² островка Insulin + glucagon + cells, N/mm ² islets	2000,6±153,8 ³	1968,8±150,7 ³	2232,9±28,1 ^{1,2,4}	1947,2±100,6 ³

Примечание. ¹ – p < 0,05 в сравнении с интактной группой; ² – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 30 суток; ³ – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 60 суток; ⁴ – p < 0,05 в сравнении с группой СД2 60 суток.

Note. ¹, p < 0.05 in comparison with the intact group; ², p < 0.05 in comparison with the T2DM group for 30 days; ³, p < 0.05 in comparison with the T2DM group for 60 days; ⁴, p < 0.05 in comparison with the T2DM group for 60 days.

Заключение

Уменьшение числа CD163⁺ макрофагов в островках и снижение уровня противовоспалительного цитокина TGF-β1 меняет микроокружение β-клеток и, предположительно, участвует в процессе дифференцировки последних в α-клетки, а наблюдаемый при введении АФГ рост числа CD163⁺ макрофагов в островках способствует обратной дифференцировке α-клеток в β-клетки, поскольку на фоне неизменной митотической активности инсулин+ клеток уве-

личивается их количество, а содержание глюкагон+ и инсулин+ глюкагон+ клеток уменьшается (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки). Полученные данные могут быть полезны при поиске новых подходов к лечению СД2.

Благодарности

Авторы благодарят сотрудников лаборатории морфологии и биохимии за участие в подготовке исследования.

Список литературы / References

1. Булавинцева Т.С., Юшков Б.Г., Данилова И.Г., Абидов М.Т. Влияние макрофагов на инсулинсинтезирующую систему в норме и при аллоксановом диабете // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2. С. 287-300. [Bulavintseva T.S., Yushkov B.G., Danilova I.G., Abidov M.T. Influence of macrophages on the insulin-synthesizing system under normal conditions and in alloxan diabetes. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 287-300. (In Russ.)] doi: 10.15789/10.15789/1563-0625-IOM-2534.
2. Гетте И.Ф., Емельянов В.В. Влияние соединения из ряда замещенных 1,3,4-бн-тиадиазинов на содержание цитокинов в плазме крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13, № 3 (22). С. 1103-1107. [Gette I.F., Emelianov V.V., Belousova A.V., Danilova I.G., Sidorova L.P., Tseitler T.A. The influence of a number of substituted 1,3,4-h-thiadiazines on the content of cytokines in blood plasma of rats with experimental diabetes mellitus type 2. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13, no. 3 (22), pp. 103-1107. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210007234-2.
3. Anquetil F., Sabouri S. Alpha cells, the main source of IL-1 β in human pancreas. *J. Autoimmun.*, 2017, Vol. 81, pp. 68-73.
4. Cassado ADA. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. *Results Probl. Cell Differ.*, 2017, Vol. 62, pp. 161-179.
5. Danilova I.G. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 95, pp. 103-110.
6. Donath M., Shoelson S. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, pp. 98-107.
7. Efrat S. Beta-Cell Dedifferentiation in Type 2 Diabetes: Concise Review. *Stem Cells*, 2019, Vol. 37, no. 10, pp. 1267-1272.
8. Ghasemi A., Khalifi S., Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes. *Acta Physiol. Hung.*, 2014, Vol. 101, no. 4, pp. 408-420.
9. Ito M. Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2001, Vol. 9, no. 3, pp. 71-78.
10. Khin P.P., Lee J.J. A Brief Review of the Mechanisms of β -Cell Dedifferentiation in Type 2 Diabetes. *Nutrients*, 2021, Vol. 13, no. 5, 1593. doi: 10.3390/nu13051593.
11. Puri S., Folias A.E., Hebrok M. Plasticity and Dedifferentiation within the Pancreas: Development, Homeostasis, and Disease. *Cell Stem Cell*, 2015, Vol. 16, no. 1, pp. 18-31.
12. Schindelin J. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 2012, Vol. 9, no. 7, pp. 676-682.
13. Sharma R. Experimental Models on Diabetes : A Comprehensive Review. *Int. J. Adv. Pharm. Sci.*, 2013, Vol. 4, pp. 1-8.
14. Stirling D.R. CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability. *BMC Bioinformatics*, 2021, Vol. 22, pp. 1-11.

Авторы:

Белуосова А.В. — научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия
Соколова К.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Belousova A.V., Research Associate, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation
Sokolova K.V., Senior Research Associate, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

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

Черешнева М.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Черешнев В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

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

Chereshneva M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Chereshnev V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief Research Associate, Laboratory of Immunophysiology and Immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 02.04.2024
Отправлена на доработку 04.04.2024
Принята к печати 25.04.2024

Received 02.04.2024
Revision received 04.04.2024
Accepted 25.04.2024

ДИНАМИКА МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОБОСТРЕНИЯ БРОНХОЛЕГОЧНОГО ПРОЦЕССА У ПАЦИЕНТОВ С НОРМАЛЬНЫМ И НАРУШЕННЫМ УГЛЕВОДНЫМ ОБМЕНОМ

Шмарин В.В.^{1,2}, Пухальская Д.А.¹, Красовский С.А.^{1,3},
Чудакова Ю.М.¹, Мартынов А.В.¹, Шмарина Г.В.^{1,4}

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

³ ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического
агентства, Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Резюме. Муковисцидоз (МВ) – одно из наиболее частых аутосомно-рецессивных наследственных заболеваний. Первичный генетический дефект при МВ связан с мутацией в гене *CFTR*, который кодирует белок клеточной мембраны, представляющий собой цАМФ-зависимый хлорный канал. Основными фенотипическими проявлениями МВ являются хроническая обструктивная болезнь легких с бронхоэктазами, персистирующей инфекцией (*St. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *B. ceracia*) и aberrантной воспалительной реакцией, а также недостаточность экзокринной функции поджелудочной железы с синдромом мальабсорбции, гипотрофией и замедлением роста. Дефицит функционального белка *CFTR* сопровождается расстройством метаболизма β-клеток поджелудочной железы, вызывающим расстройство углеводного обмена и развитие диабета, ассоциированного с МВ. Целью данной работы явилось сравнение динамики маркеров воспаления у больных муковисцидозом с нормальным и нарушенным углеводным обменом в период обострения бронхолегочного процесса. В исследовании принимали участие 10 больных с нарушением толерантности к глюкозе (группа 1) и 24 пациента с нормальным углеводным обменом (группа 2). Пациенты двух групп статистически значимо не различались между собой по демографическим признакам, по показателям функции внешнего дыхания и весоростового индекса, по количеству носителей мутации *F508del*, а также по количеству лиц, инфицированных *Ps. aeruginosa* и *B. ceracia* complex. Забор крови проводили дважды: до и после рутинного курса антибиотикотерапии. В полученных образцах плазмы крови определяли содержание антител к одно- и дву-цепочечной ДНК (ss-ДНК-IgG, ds-ДНК-IgG, соответственно), уровень гормонов (дегидроэпиандростерон (ДГЭА) и ДГЭА-сульфат), С-реактивного белка (СРБ) и Mn-зависимой супероксиддисмутазы (Mn-SOD), а также концентрацию цитокинов (фактор некроза опухолей-α (TNFα),

Адрес для переписки:

Шмарин Василий Викторович
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени
академика Н.П. Бочкова»
115522, Россия, Москва, ул. Москворечье, 1.
Тел.: 8 (985) 261-78-72.
E-mail: stary.kaschka@gmail.com

Address for correspondence:

Vasily V. Shmarin
N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics
1 Moskvorechye St
Moscow
115522, Russian Federation
Phone: +7 (985) 261-78-72.
E-mail: stary.kaschka@gmail.com

Образец цитирования:

В.В. Шмарин, Д.А. Пухальская, С.А. Красовский,
Ю.М. Чудакова, А.В. Мартынов, Г.В. Шмарина
«Динамика маркеров воспаления при лечении
обострения бронхолегочного процесса у пациентов
с нормальным и нарушенным углеводным обменом»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5.
С. 1045-1052.
doi: 10.15789/1563-0625-DOI-16825

© Шмарин В.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.V. Shmarin, D.A. Pukhalskaya, S.A. Krasovsky,
Yu.M. Chudakova, A.V. Martynov, G.V. Shmarina “Dynamics
of inflammatory markers in patients with normal and impaired
glucose metabolism during lung exacerbation treatment”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1045-1052.
doi: 10.15789/1563-0625-DOI-16825

© Shmarin V.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-DOI-16825

интерферон- γ (IFN γ), IFN α , тканевый фактор роста- β 1 (TGF- β 1), интерлейкин-4 (IL-4), IL-6, IL-10, IL-17A). Исследование перечисленных выше биомаркеров проводили с помощью коммерческих иммуноферментных наборов.

Полученные результаты показывают, что антибиотикотерапия не оказывала существенного влияния на уровень маркеров воспаления в группе пациентов с нарушением углеводного обмена. В то время как у пациентов с нормальным углеводным обменом лечение антибиотиками приводило к статистически значимому снижению провоспалительных факторов в плазме крови. Полученные результаты могут быть связаны как с низкой эффективностью антибиотикотерапии, так и развитием aberrантной воспалительной реакции у пациентов с нарушением толерантности к глюкозе.

Ключевые слова: aberrантное воспаление, нарушение толерантности к глюкозе, муковисцидоз, цитокины, бронхолегочный процесс, цитокины

DYNAMICS OF INFLAMMATORY MARKERS IN PATIENTS WITH NORMAL AND IMPAIRED GLUCOSE METABOLISM DURING LUNG EXACERBATION TREATMENT

Shmarin V.V.^{a, b}, Pukhalskaya D.A.^a, Krasovsky S.A.^{a, c},
Chudakova Yu.M.^a, Martynov A.V.^a, Shmarina G.V.^{a, d}

^a N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

^b I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^c Research Institute of Pulmonology, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation

^d P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Cystic fibrosis (CF) is one of the most common autosomal-recessive inherited diseases. The primary genetic defect in CF is aligned *CFTR* gene mutation which encodes a membrane protein functioning as cAMP-dependend chloride channel. Classic phenotypical manifestations of CF include chronic obstructive pulmonary disease with bronchiectasis, persisting infection (*St. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *B. cepacia*) and aberrant inflammatory response, as well as exocrine pancreatic insufficiency with malabsorption, hypotrophy and growth retardation. *CFTR* deficiency is also accompanied by β -cell pancreatic dysfunction, causing glucose metabolism disturbances and CF-related diabetes. The aim of the study was the comparison of inflammatory markers dynamics in patients with normal and disturbed glucose metabolism during pulmonary exacerbation treatment. The study included 10 patients with impaired glucose tolerance (Group 1) and 24 patients with normal carbohydrate metabolism (Group 2). Patients of the two groups did not significantly differ in demographic characteristics, pulmonary function test and body mass index parameters, as well as in the number of *F508del* mutation carriers and in the number of those who were infected with *Ps. aeruginosa* and *B. cepacia* complex. Blood sampling was performed twice: before and after a routine course of antibiotic therapy. Plasma levels of biomarkers including the antibodies to single- and double-stranded DNA (ss-DNA-IgG, ds-DNA-IgG, respectively), the hormones (dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate), C-reactive protein (CRP), Mn-dependent superoxide dismutase (Mn-SOD), and the cytokines (tumor necrosis factor- α (TNF α), interferon- γ (IFN γ), IFN α , tissue growth factor- β 1 (TGF- β 1), interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-10, IL-17A) were assessed using commercial immunoassay kits. Our study shows that antibiotic treatment did not have a sufficient influence on levels of inflammatory markers in patients with disturbances of glucose metabolism while patients with normal glucose tolerance demonstrated a significant reduction in inflammatory marker values after the therapy. The data may suggest both impaired effectivity of antibiotic treatment and aberrant inflammatory response in patients with glucose intolerance.

Keywords: aberrant inflammatory response, glucose intolerance, cystic fibrosis, cytokines, pulmonary exacerbation, cytokines

Введение

Муковисцидоз (МВ) — одно из наиболее распространенных аутосомно-рецессивных наследственных заболеваний. Первичный генетический дефект при МВ связан с мутацией гена *CFTR*,

который кодирует белок клеточной мембраны, представляющий собой цАМФ-зависимый анионный канал [1]. Показано, что белок *CFTR* не просто осуществляет транспорт хлоридов и бикарбонатов через апикальную поверхность эпителиальных клеток, но и регулирует другие ионные

каналы, включая внешние регуляторные каналы для ионов хлора, каналы для ионов натрия, калия и кальция [10]. Нарушение транспорта ионов хлора между клетками и межклеточной жидкостью приводит к повышенному всасыванию натрия и воды клетками эпителия, в результате чего повышается вязкость секретов респираторного тракта, кишечника, поджелудочной железы, почек и половых желез [10]. Дефицит ионов бикарбоната в секретах приводит к снижению pH и гиперпродукции слизи, что усугубляет нарушение локального гомеостаза слизистых оболочек и протоков экзокринных желез [2, 13]. Таким образом, основными фенотипическими проявлениями МВ являются хроническая обструктивная болезнь легких с бронхоэктазами, персистирующей инфекцией (*St. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *B. cepacia*) и aberrантной воспалительной реакцией, а также недостаточность экзокринной функции поджелудочной железы с синдромом мальабсорбции, гипотрофией и замедлением роста [1]. Дефицит функционального белка CFTR сопровождается расстройством метаболизма β -клеток поджелудочной железы, вызывающим нарушение углеводного обмена и развитие диабета, ассоциированного с МВ.

Нарушение регуляции углеводного обмена у пациентов с МВ связано не только с деструкцией β -клеток поджелудочной железы вследствие первичного генетического дефекта и локального воспаления [5, 6], но и с недостаточной секрецией инсулина и развитием инсулинорезистентности [7, 11]. Недостаточность секреции инсулина у больных МВ клинически проявляется как неспособность ответить на стимуляцию глюкозой немедленной продукцией адекватного количества гормона. У многих пациентов с МВ отмечается высокий уровень постпрандиальной гликемии, но нормальный уровень глюкозы натощак [3]. Исследование молекулярно-клеточных механизмов показало, что дефицит белка CFTR нарушает работу других ионных каналов (АТФ-зависимые калиевые каналы, Ca^{2+} -зависимый хлорный канал Аноктамин 1 (ANO1)) в β -клетках поджелудочной железы [4, 7]. В результате на стимуляцию высокими концентрациями глюкозы β -клетки пациентов с МВ отвечают неполной деполяризацией мембраны, нарушением примирования инсулиновых гранул и торможением их потенциал-зависимого экзоцитоза [4, 7].

Нарушения углеводного обмена существенно утяжеляют течение бронхолегочного процесса и усугубляют иммунологические отклонения у пациентов с МВ [8].

Целью данной работы явилось сравнение динамики маркеров воспаления у больных муковисцидозом с нормальным и нарушенным

углеводным обменом в период обострения бронхолегочного процесса.

Материалы и методы

Пациенты

В исследовании принимали участие 34 пациента с муковисцидозом (МВ) в возрасте 18–36 лет (средний возраст 25 лет). Все пациенты находились на активном диспансерном наблюдении в НИИ пульмонологии Минздравсоцразвития РФ, где регулярно (каждые 3–6 месяцев) обследовались и получали антибактериальную терапию. Диагноз «муковисцидоз» был поставлен на основании данных потовой пробы (уровень хлоридов пота более 60 мМ/л), типичных клинических симптомов заболевания и/или выявления мутаций гена *CFTR*. Среди участников исследования 22 пациента были гомо- или гетерозиготными носителями мутации *F508del*. У 12 пациентов были обнаружены менее распространенные мутации гена *CFTR*. Нарушение метаболизма углеводов определяли с помощью орального теста на толерантность к глюкозе, проведенного в соответствии с практическими рекомендациями Европейского Общества Муковисцидоза [12]. В зависимости от состояния углеводного обмена пациенты были разделены на 2 группы. В группу 1 входили 10 пациентов с муковисцидозом-зависимым сахарным диабетом или нарушением толерантности к глюкозе. Группа 2 включала пациентов без нарушений углеводного обмена ($n = 24$). Характеристика пациентов по группам приведена в таблице 1.

Забор крови и исследование маркеров воспаления проводили дважды: при поступлении пациента в клинику (до проведения рутинного курса антибиотикотерапии) и перед выпиской (после проведения курса антибиотикотерапии). Подробная схема исследования представлена на рисунке 1.

Определение уровня маркеров воспаления в образцах плазмы

Содержание антител к одно- и дву-цепочечной ДНК (ss-ДНК-IgG, ds-ДНК-IgG, соответственно), уровень гормонов (дегидроэпандростерон (ДГЭА) и ДГЭА-сульфат), С-реактивного белка (СРБ) и Mn-зависимой супероксиддисмутазы (Mn-SOD), а также концентрации цитокинов (фактор некроза опухолей- α (TNF α), интерферон- γ (IFN γ), IFN α , тканевый фактор роста- β 1 (TGF- β 1), интерлейкин-4 (IL-4), IL-6, IL-10, IL-17A) в плазме пациентов определяли с помощью коммерческих иммуноферментных наборов.

Статистический анализ

Различия между группами оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни и точного критерия Фишера.

ТАБЛИЦА 1. ДЕМОГРАФИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. DEMOGRAPHIC AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE PATIENTS

	Пациенты / Patients		p
	с нарушениями углеводного обмена with glucose metabolism disturbance (n = 10)	без нарушений углеводного обмена with normal glucose metabolism (n = 24)	
Возраст (годы) Age (years)	23,6±3,5	25,3±3,9	0,3860
Пол (М/Ж)* Sex (M/F)*	4/6	12/12	0,7146
Весо-ростовой индекс (кг/м²) Body mass index (kg/m ²)	18,0±1,6	18,5±1,4	0,4713
Носители мутации F508del* F508del carriers*	5/10 (50,0%)	17/24 (70,8%)	0,2713
Хроническое инфицирование Chronical infection with			
<i>P. aeruginosa</i>*	7/10 (77,0%)	15/24 (62,5%)	1,0000
<i>B. ceracia complex</i>*	2/10 (20,0%)	4/24 (16,7%)	1,0000
ФЖЕЛ (% от должного значения) FVC (% of the predicted value)	71,6±3,9	75,8±3,3	0,2801
ОФВ₁ (% от должного значения) FEV ₁ (% of the predicted value)	52,5±4,4	53,7±3,5	0,8860

Примечание. * – статистический анализ данных проводили с использованием точного критерия Фишера. Значения возраста, весо-ростового индекса, а также показателей функции внешнего дыхания представлены как среднее ± станд. ошибка; межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Манна–Уитни; ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких; ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за 1 секунду.

Note. *, the data were analyzed using Fisher exact test. Age, BMI, FVC and FEV1 values are shown as the mean ± standard error of the mean; the differences between the groups were assessed using Mann–Whitney U Test. BMI, body mass index; FVC, forced vital capacity (% of predicted values); FEV1, forced expiratory volume exhaled during the first second (% of predicted values).

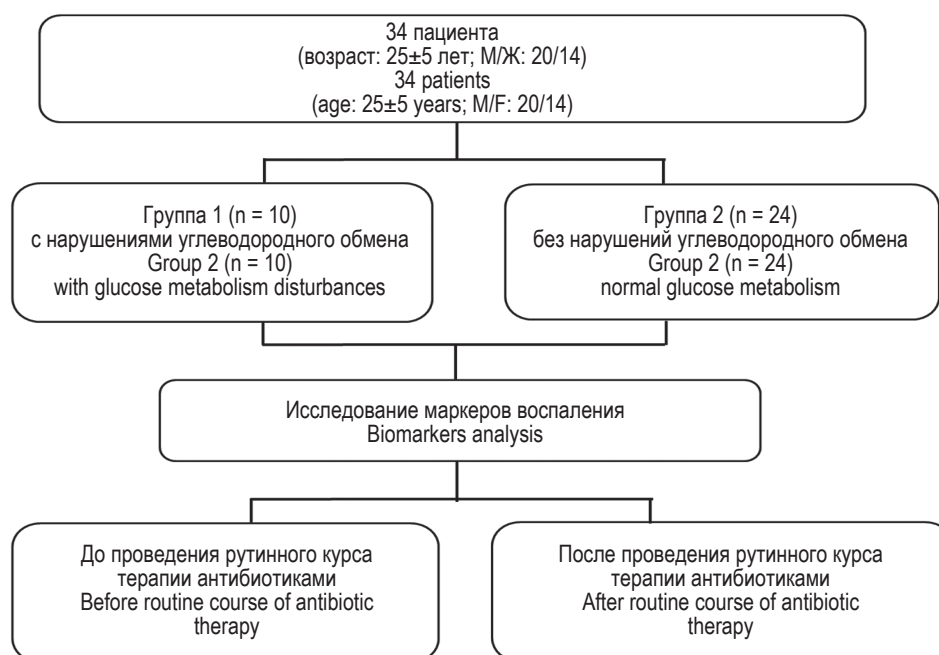


Рисунок 1. Схема исследования

Figure 1. Study design

Результаты и обсуждение

Как видно из данных, приведенных в таблице 1, группы пациентов статистически значимо не различались между собой по демографическим признакам, по показателям функции внешнего дыхания и весоростового индекса, по количеству носителей мутации *F508del*, а также по количеству лиц, инфицированных *P. aeruginosa* и *B. ceracia complex*. Исследование динамики маркеров воспаления в плазме показало, что лабораторные показатели пациентов с нормальным

углеводным обменом претерпевали существенные изменения в процессе курса антибиотикотерапии. Так, в образцах плазмы этих пациентов было отмечено умеренное, но статистически значимое повышение уровня ds-ДНК-IgG, а также существенное снижение концентрации маркеров воспаления (СРБ, IFN α , IL-6, TGF- β 1, Mn-SOD) и ДГЭА-S (табл. 2). У пациентов с нарушениями углеводного обмена было обнаружено статистически значимое снижение только двух параметров: СРБ и IFN α .

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

TABLE 2. PLASMA BIOMARKERS DYNAMICS IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

Биомаркеры / Biomarkers	Чувствительность / Sensitivity	Группа 1 / Group 1			Группа 2 / Group 2		
		До лечения / Before treatment	После лечения / After treatment	p	До лечения / Before treatment	После лечения / After treatment	p
СРБ / CRP	0,05 мг/л / 0.05 mg/L	5,4 \pm 0,9	1,1 \pm 0,1	0,0093	6,9 \pm 0,5	2,8 \pm 0,6	< 0,0001
ss-ДНК-IgG / ss-DNA-IgG	2 МЕ/мл / 2 IU/mL	9,8 \pm 0,2	10,0 \pm 0,3	0,9594	10,3 \pm 0,3	10,3 \pm 0,2	0,9544
ds-ДНК-IgG / ds-DNA-IgG	2 МЕ/мл / 2 IU/mL	42,8 \pm 14,1	51,3 \pm 17,5	0,7213	94,6 \pm 22,1*	88,1 \pm 26,4	0,0425
IFN α	5 пг/мл / 5 pg/mL	28,0 \pm 3,6	22,1 \pm 2,5	0,0166	33,0 \pm 3,8	29,2 \pm 4,1	0,0299
IFN γ	20 пг/мл / 20 pg/mL	283,0 \pm 188,6	148,5 \pm 70,1	0,5076	279,1 \pm 166,8	370,8 \pm 231,0	0,4929
TGF- β 1	8,6 пг/мл / 8.6 pg/mL	11749,9 \pm 4210,3	13308,7 \pm 2768,6	0,6465	17617,3 \pm 3415,5	9396,6 \pm 2245,6**	0,0056
IL-4	2 пг/мл / 2 pg/mL	18,2 \pm 2,4	18,0 \pm 2,2	0,9528	28,2 \pm 5,6	23,4 \pm 4,2	0,1985
IL-6	5 пг/мл / 5 pg/mL	16,2 \pm 4,6	10,4 \pm 4,4	0,1141	34,3 \pm 14,0	9,8 \pm 1,1	0,0027
IL-10	5 пг/мл / 5 pg/mL	11,0 \pm 1,5	9,9 \pm 1,5	0,2845	20,7 \pm 8,8	19,6 \pm 9,9	0,1161
IL-17A	20 пг/мл / 20 pg/mL	173,4 \pm 88,9	216,4 \pm 129,1	0,9594	195,7 \pm 95,7	212,6 \pm 111,7	0,8639
Mn-SOD	100 пг/мл / 100 pg/mL	263,9 \pm 30,9	223,0 \pm 24,5	0,4446	289,5 \pm 23,8	217,4 \pm 17,8	0,0066
ДГЭА / DHEA	0,15 нг/мл / 0.15 ng/mL	6,0 \pm 0,9	5,3 \pm 0,6	0,3863	4,9 \pm 0,4	5,7 \pm 0,9	0,8864
ДГЭА-S / DHEA-S	0,005 мкг/мл / 0.005 μ g/mL	2,0 \pm 0,4	2,4 \pm 0,8	0,3863	2,0 \pm 0,3	1,5 \pm 0,3	0,0011

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего. Внутригрупповые различия оценивали с помощью парного критерия Вилкоксона. * – p = 0,0553; ** – p = 0,0787 по сравнению с группой 1 (критерий Манна–Уитни). Группа 1 – пациенты с нарушением углеводного обмена, группа 2 – пациенты с нормальным углеводным обменом.

Note. The data are shown as the mean \pm standard error of the mean. Within-group changes were evaluated using Wilcoxon's paired test. *, p = 0.0553; **, p = 0.0787 in comparison to Group 1 (Mann-Whitney U Test). Group 1 includes patients with glucose metabolism disturbance, Group 2 includes patients with normal glucose tolerance.

Сравнение лабораторных показателей пациентов двух групп выявило устойчивую тенденцию ($p = 0,055$) к повышению уровня ds-ДНК-IgG у больных с нормальным углеводным обменом в точке «до лечения». В точке «после лечения» было обнаружено приближающееся к уровню статистической значимости снижение концентрации TGF- β 1 в группе 2 по сравнению с уровнем данного цитокина в группе 1 ($p = 0,0787$). Анализ динамики TGF- β 1 показал, что в группе пациентов с нормальным углеводным обменом уровень этого цитокина снижался после курса антибиотикотерапии. В группе больных с нарушениями углеводного обмена, напротив, значение медианы концентрации TGF- β 1 повышалось более чем в 2 раза. Однако данное изменение не достигало уровня статистической значимости. Высокий уровень TGF- β 1 у пациентов с хроническим бронхолегочным процессом прямо коррелирует с

интенсивностью фибротических процессов и является признаком «старения» иммунной системы [9].

Заключение

Таким образом, полученные результаты показывают, что уровень антител к одно- и двухцепочечной ДНК у пациентов с хроническим бронхолегочным процессом мало зависит от стадии обострения или ремиссии заболевания. У пациентов с нарушением углеводного обмена концентрация антител к ДНК ниже, чем у пациентов с нормальным углеводным обменом. Маркеры воспаления в группе пациентов с нарушением углеводного обмена менее чувствительны к антибиотикотерапии, чем соответствующие параметры в группе пациентов с нормальным углеводным обменом.

Список литературы / References

1. Bell S.C., Mall M.A., Gutierrez H., Macek M., Madge S., Davies J.C., Burgel P.R., Tullis E., Castaños C., Castellani C., Byrnes C.A., Cathcart F., Chotirmall S.H., Cosgriff R., Eichler I., Fajal I., Goss C.H., Drevinek P., Farrell P.M., Gravelle A.M., Havermans T., Mayer-Hamblett N., Kashirskaya N., Kerem E., Mathew J.L., McKone E.F., Naehrlich L., Nasr S.Z., Oates G.R., O'Neill C., Pypops U., Raraigh K.S., Rowe S.M., Southern K.W., Sivam S., Stephenson A.L., Zampoli M., Ratjen F. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir. Med.*, 2020, Vol. 8, no. 1, pp. 65-124.
2. Birket S.E., Chu K.K., Liu L., Houser G.H., Diephuis B.J., Wilsterman E.J., Dierksen G., Mazur M., Shastry S., Li Y., Watson J.D., Smith A.T., Schuster B.S., Hanes J., Grizzle W.E., Sorscher E.J., Tearney G.J., Rowe S.M. A functional anatomic defect of the cystic fibrosis airway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2014, Vol. 190, no. 4, pp. 421-432.
3. Costa M., Potvin S., Berthiaume Y., Gauthier L., Jeanneret A., Lavoie A., Levesque R., Chiasson J., Rabasa-Lhoret R. Diabetes: a major co-morbidity of cystic fibrosis. *Diabetes Metab.*, 2005, Vol. 31, no. 3, Pt 1, pp. 221-232.
4. Edlund A., Esguerra J.L., Wendt A., Flodström-Tullberg M., Eliasson L. CFTR and Anoctamin 1 (ANO1) contribute to cAMP amplified exocytosis and insulin secretion in human and murine pancreatic beta-cells. *BMC Med.*, 2014, Vol. 12, 87. doi: 10.1186/1741-7015-12-87.
5. Hart N.J., Aramandla R., Poffenberger G., Fayolle C., Thames A.H., Bautista A., Spigelman A.F., Babon J.A.B., deNicola M.E., Dadi P.K., Bush W.S., Balamurugan A.N., Brissova M., Dai C., Prasad N., Bottino R., Jacobson D.A., Drumm M.L., Kent S.C., MacDonald P.E., Powers A.C. Cystic fibrosis-related diabetes is caused by islet loss and inflammation. *JCI Insight*, 2018, Vol. 3, no. 8, e98240. doi: 10.1172/jci.insight.98240.
6. Khan D., Kelsey R., Maheshwari R.R., Stone V.M., Hasib A., Manderson Koivula F.N., Watson A., Harkin S., Irwin N., Shaw J.A., McClenaghan N.H., Venglovecz V., Ébert A., Flodström-Tullberg M., White M.G., Kelly C. Short-term CFTR inhibition reduces islet area in C57BL/6 mice. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, no. 1, 11244. doi: 10.1038/s41598-019-47745-w.
7. Koivula F.N.M., McClenaghan N.H., Harper A.G.S., Kelly C. Islet-intrinsic effects of CFTR mutation. *Diabetologia*, 2016, Vol. 59, no. 7, pp. 1350-1355.
8. Prentice B.J., Potter K.J., Coriati A., Boudreau V., Rusnell L., Kherani T., Senior P.A., Hameed S., Rabasa-Lhoret R. Cystic fibrosis-related diabetes: Clinical approach and knowledge gaps. *Paediatr. Respir. Rev.*, 2023, Vol. 46, pp. 3-11.
9. Ren L.L., Li X.J., Duan T.T., Li Z.H., Yang J.Z., Zhang Y.M., Zou L., Miao H., Zhao Y.Y. Transforming growth factor- β signaling: From tissue fibrosis to therapeutic opportunities. *Chem. Biol. Interact.*, 2023, Vol. 369, 110289. doi: 10.1016/j.cbi.2022.110289.
10. Saint-Criq V., Gray M.A. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2017, Vol. 74, no. 1, pp. 93-115.
11. Smerieri A., Montanini L., Maiuri L., Bernasconi S., Street M.E. FOXO1 content is reduced in cystic fibrosis and increases with IGF-I treatment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 15, no. 10, pp. 18000-18022.

12. Smyth A.R., Bell S.C., Bojcin S., Bryon M., Duff A., Flume P., Kashirskaya N., Munck A., Ratjen F., Schwarzenberg S.J., Sermet-Gaudelus I., Southern K.W., Taccetti G., Ullrich G., Wolfe S.; European Cystic Fibrosis Society. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *J. Cyst. Fibros.*, 2014, Vol. 13, Suppl. 1, pp. S23-S42.

13. Tang X.X., Ostedgaard L.S., Hoegger M.J., Moninger T.O., Karp P.H., McMenimen J.D., Choudhury B., Varki A., Stoltz D.A., Welsh M.J. Acidic pH increases airway surface liquid viscosity in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 126, no. 3, pp. 879-891.

Авторы:

Шмарин В.В. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»; студент 5-го курса ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Пухальская Д.А. — научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Красовский С.А. — к.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии» Федерального медико-биологического агентства; ведущий научный сотрудник НКО муковисцидоза биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Authors:

Shmarin V.V., Research Assistant, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics; 5th year student, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Pukhalskaya D.A., Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Krasovsky S.A., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute of Pulmonology, Federal Medical and Biological Agency; Leading Research Associate, Cystic Fibrosis Department, N. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Чудакова Ю.М. — к.б.н., научный сотрудник
лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-
генетический научный центр имени академика
Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Мартынов А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник
лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-
генетический научный центр имени академика
Н.П. Бочкова», Москва, Россия

Шмарина Г.В. — к.м.н., доцент, ведущий научный
сотрудник лаборатории молекулярной биологии
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени
академика Н.П. Бочкова»; доцент кафедры биологии
медицинского факультета ФГАОУ ВО «Российский
университет дружбы народов имени Патриса
Лумумбы», Москва, Россия

Chudakova Yu.M., PhD (Biology), Research Associate,
Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre
for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Martynov A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate,
Laboratory of Molecular Biology, N. Bochkov Research Centre
for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

Shmarina G.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Leading
Research Associate, Laboratory of Molecular Biology, N.
Bochkov Research Centre for Medical Genetics; Associate
Professor, Biology Department, Medical Faculty, P. Lumumba
Peoples' Friendship University, Moscow, 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

РОЛЬ MCP-1 И SDF-1 В НАРУШЕНИИ МОБИЛИЗАЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ИЗ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

**Чумакова С.П.¹, Денисенко О.А.¹, Уразова О.И.¹, Шипулин В.М.^{1,2},
Андреев С.Л.², Винс М.В.¹, Гладковская М.В.¹, Дёмин М.С.¹,
Дмитриева А.А.¹, Гуломженов А.Г.¹**

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

² Научно-исследовательский институт кардиологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Резюме. Актуальным является изучение медиаторов ангиогенеза и мобилизации ранних эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) из костного мозга у больных ишемической болезнью сердца (ИБС), страдающих и не страдающих ишемической кардиомиопатией (ИКМП).

Обследовано 52 больных ИБС: 30 человек, страдающих ИКМП, и 22 человека, не страдающих ИКМП, 15 здоровых доноров. Содержание ранних ЭПК (VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺) определяли в крови и в костном мозге у больных ИБС методом проточной цитофлуориметрии, концентрацию MCP-1, SDF-1, VEGF-A – методом мультиплексного анализа, HIF-1α – методом иммуноферментного анализа.

Содержание SDF-1 и HIF-1α в крови у больных ИБС без кардиомиопатии было выше, чем у здоровых лиц (соответственно 60,00 (50,00-80,00) пг/мл и 6,00 (5,00-6,20) нг/мл против 30,00 (5,00-45,00) пг/мл, $p = 0,049$ и 4,60 (3,28-5,11) нг/мл, $p = 0,049$), при ИКМП – соответствовало норме. При этом концентрация SDF-1 в костном мозге была больше, а уровень HIF-1α меньше, чем их содержание в кровотоке вне зависимости от наличия ИКМП (соответственно 130,0 (90,0-170,0) пг/мл, $p = 0,005$ и 0,97 (0,80-1,11) нг/мл, $p < 0,001$). Уровень MCP-1 в крови варьировал в пределах нормы у больных ИБС обеих групп исследования (190,0 (168,0-215,0) пг/мл), а в костном мозге был выше только у пациентов с ИКМП (406,5 (265,0-583,0) пг/мл, $p = 0,028$). Вне зависимости от наличия ИКМП содержание VEGF-A в крови у больных ИБС соответствовало норме (3,80 (1,00-6,50) пг/мл) и в миелоидной ткани. Численность ЭПК была повышенной в крови у больных ИБС без кардиомиопатии (0,70 (0,46-1,23) и 0,19 (0,13-0,32) %, $p < 0,001$) и соответствовала их количеству в костном мозге,

Адрес для переписки:

Чумакова Светлана Петровна
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (909) 539-51-09.
Факс: 8 (3822) 53-33-09.
E-mail: chumakova_S@mail.ru

Address for correspondence:

Svetlana P. Chumakova
Siberian State Medical University
2 Moskovsky Trakt
Tomsk
634050 Russian Federation
Phone: +7 (909) 539-51-09.
Fax: +7 (3822) 53-33-09.
E-mail: chumakova_S@mail.ru

Образец цитирования:

С.П. Чумакова, О.А. Денисенко, О.И. Уразова, В.М. Шипулин, С.Л. Андреев, М.В. Винс, М.В. Гладковская, М.С. Дёмин, А.А. Дмитриева, А.Г. Гуломженов «Роль MCP-1 и SDF-1 в нарушении мобилизации эндотелиальных прогениторных клеток из костного мозга при ишемической болезни сердца» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 1053-1060.
doi: 10.15789/1563-0625-TRO-16762

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

For citation:

S.P. Chumakova, O.A. Denisenko, O.I. Urazova, V.M. Shipulin, S.L. Andreev, M.V. Vins, M.V. Gladkovskaya, M.S. Demin, A.A. Dmitrieva, A.G. Gulomzhenov "The role of MCP-1 and SDF-1 in impaired mobilization of endothelial progenitor cells from the bone marrow in coronary heart disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1053-1060.
doi: 10.15789/1563-0625-TRO-16762

© Chumakova S.P. et al., 2024
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-TRO-16762

а у пациентов с ИКМП в крови регистрировались нормальные значения с накоплением этих клеток в миелоидной ткани (0,57 (0,45-0,98) %, $p = 0,019$).

Развитие ИКМП ассоциировано с аккумуляцией ранних ЭПК в миелоидной ткани вследствие повышенного их удержания избытком MCP-1 в костном мозге при слабовыраженном привлечении в кровотоки из-за отсутствия профицита SDF-1 и HIF-1 α в крови.

Ключевые слова: хемокины, гипоксия, эндотелиальные прогениторные клетки, ангиогенез, миграция, ишемическая кардиомиопатия

THE ROLE OF MCP-1 AND SDF-1 IN IMPAIRED MOBILIZATION OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS FROM THE BONE MARROW IN CORONARY HEART DISEASE

Chumakova S.P.^a, Denisenko O.A.^a, Urazova O.I.^a, Shipulin V.M.^a,
^b, Andreev S.L.^b, Vins M.V.^a, Gladkovskaya M.V.^a, Demin M.S.^a,
Dmitrieva A.A.^a, Gulomzhenov A.G.^a

^a Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^b Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Abstract. It is relevant to study of angiogenesis mediators and the mobilization of early endothelial progenitor cells (EPC) from bone marrow into the blood in patients with coronary heart disease (CHD), suffering and not suffering from ischemic cardiomyopathy (ICMP).

CHD patients: 30 people with ICMP and 22 people without ICMP, 15 healthy donors. The content of early EPC (VEGFR2⁺CD34⁺CD14⁺) was determined in the blood and bone marrow by flow cytometry, the concentration of MCP-1, SDF-1, VEGF-A – by multiplex analysis, of HIF-1 α – by ELISA.

The content of SDF-1 and HIF-1 α in peripheral blood in patients with CHD without cardiomyopathy was higher than in healthy individuals (respectively 60.00 (50.00-80.00) pg/mL and 6.00 (5.00-6.20) ng/mL versus 30.00 (5.00-45.00) pg/mL, $p = 0.049$ and 4.60 (3.28-5.11) ng/mL, $p = 0.049$), with ICMP corresponded to the norm. The concentration of SDF-1 in the bone marrow was higher, and the level of HIF-1 α was less than their content in the bloodstream, regardless of the presence of ICMP (respectively 130.0 (90.0-170.0) pg/mL, $p = 0.005$ and 0.97 (0.80-1.11) ng/mL, $p < 0.001$). The level of MCP-1 in the blood varied within the normal range in patients with CHD of both study groups (190.0 (168.0-215.0) pg/mL), and in the bone marrow was higher only in patients with ICMP (406.5 (265.0-583.0) pg/mL, $p = 0.028$). Regardless of ICMP presence, the content of VEGF-A in the blood of patients with CHD corresponded to the norm (3.80 (1.00-6.50) pg/mL) and in myeloid tissue. The number of EPC was increased in the blood of patients with CHD without cardiomyopathy (0.70 (0.46-1.23) and 0.19 (0.13-0.32) %, $p < 0.001$) and corresponded to their number in the bone marrow. And in patients with ICMP, normal values of the indicator were recorded in the blood with the accumulation of EPC in myeloid tissue (0.57 (0.45-0.98) %, $p = 0.019$).

The development of ICMP is associated with the accumulation of early EPC in myeloid tissue due to their increased retention by an excess of MCP-1 in the bone marrow with weak involvement in the bloodstream due to the lack of a surplus of SDF-1 and HIF-1 α in the blood.

Keywords: chemokines, hypoxia, endothelial progenitor cells, angiogenesis, migration, ischemic cardiomyopathy

Исследование выполнено за счет грантов Российского научного фонда: № 22-25-00821, <https://rscf.ru/project/22-25-00821/> (изучение иммунофенотипа клеток, MCP-1, SDF-1) и № 22-25-20038, <https://rscf.ru/project/22-25-20038/> и средств Администрации Томской области (изучение VEGF-A и HIF-1 α).

Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) сопровождается не только циркуляторной гипоксией,

но и атеросклеротическим поражением коронарных и других магистральных артерий, что закономерно должно индуцировать в организме формирование комплекса защитно-приспособительных реакций, направленных на активацию ангиогенеза и мобилизацию эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) из костного мозга в кровь [2, 3]. Стимуляция ангиогенеза при ИБС необходима для репарации пораженных артерий и формирования коллатеральных сосудов. Успешная реализации этих процессов замедляет

прогрессирование ишемии и сократительной дисфункции миокарда, что предотвращает развитие тяжелой сердечной недостаточности [8]. Между тем, треть больных ИБС, перенесших инфаркт миокарда, страдают ишемической кардиомиопатией (ИКМП), которая представляет собой диффузное поражение миокарда с формированием распространенной сократительной его дисфункции и проявляется дилатацией камер сердца в сочетании с тяжелой хронической сердечной недостаточностью. Патогенез ИКМП на сегодняшний день до конца не изучен и специфического лечения данной формы ИБС не существует, однако неуклонное прогрессирование болезни, продолжающееся даже после коронарного шунтирования, приводит в итоге к необходимости в трансплантации сердца [6, 7]. Наряду с этим в последние годы показано, что больные ИКМП имеют недостаточно развитое микроциркуляторное русло миокарда в виде уменьшения удельной площади микрососудов, содержащих гладкомышечные клетки, и формирования капилляров крайне малого диаметра [1]. Учитывая это и то, что ранние ЭПК имеют миелоидное происхождение, причиной недостаточного поступления ЭПК в кровь могут быть как нарушения мобилизации ЭПК из костного мозга, так и их генерации в костном мозге. Оба процесса контролируются гипоксия-индуцируемым фактором (HIF) и сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF) [5, 11], а мобилизация ЭПК в кровь – такими хемоаттрактантами, как моноцитарный хемотаксический белок (MCP)-1 и фактор стромальных клеток (SDF)-1 [8, 14]. В связи с выше изложенным целью исследования явилось установление роли MCP-1 и SDF-1 в комплексе с HIF-1 α и VEGF-A в образовании и мобилизации ранних и поздних эндотелиальных прогениторных клеток из костного мозга в кровь у больных ИБС, страдающих и не страдающих ИКМП.

Материалы и методы

В исследование вошло 52 больных ИБС со стенокардией напряжения II-IV класса и недостаточностью кровообращения II-III класса по NYHA, находившихся в отделении сердечно-сосудистой хирургии НИИ кардиологии – филиала ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»: 30 человек, страдающих ИКМП (27 мужчин и 3 женщины, 61,0 (57,0-64,5) лет) согласно критериям Felker G.M. и соавт. [7], и 22 человека, не страдающих ИКМП (17 мужчин и 5 женщин, 64,5 (58,5-68,0) лет). Группу контроля составили 15 практически здоровых доноров (13 мужчин и 2 женщины, средний возраст 57,63 \pm 8,12 лет), не имеющих каких-либо заболеваний сердечно-сосудистой системы. Больные ИБС, страдающие и не страдающие ИКМП, были сопоставимыми по возрасту, полу, индексу массы тела, продолжительности ИБС, функциональному классу стенокардии и

недостаточности кровообращения, частоте назначения ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента и статинов, что важно учитывать ввиду их противовоспалительного действия. Всем больным ИБС выполнялась операция коронарного шунтирования, при ИКМП – в сочетании с реконструкцией полости левого желудочка; все пациенты в анамнезе имели инфаркт миокарда.

Критериями исключения больных из исследования считали возраст старше 70 лет, наличие аутоиммунных заболеваний, аллергического процесса в стадии обострения, опухолевого процесса, гипопластической и мегалобластной анемий, вирусных гепатитов, сифилиса, ВИЧ-инфекции, проведение до операции курсов лечения железосодержащими препаратами, эритропоэтиновой или иммуносупрессивной терапии и наличие острых инфекционных заболеваний менее чем за 3 недели до операции, а также отказ пациента от исследования. Исследования проведены с разрешения локального этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 7981 от 16.12.2019 г.). У всех обследованных лиц было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Материалом исследования служила кровь из кубитальной вены и образцы красного костного мозга, стабилизированные гепарином (25 МЕ/мл). Периферическую кровь забирали в объеме 5 мл из кубитальной вены утром натощак как у здоровых доноров, так и у больных ИБС обеих групп исследования в день операции непосредственно перед индукцией в наркоз. Костный мозг получали только у больных ИБС в начале операции коронарного шунтирования из разреза грудины после выполнения доступа к сердцу путем срединной стернотомии. Цельную кровь и костный мозг использовали для определения численности ранних и поздних эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК); плазму крови и надосадок костного мозга (получали путем центрифугирования 10 мин при 300g) – для оценки концентрации MCP-1, SDF-1, HIF-1 α , VEGF-A.

Содержание ранних ЭПК CD14⁺CD34⁺VEGFR2⁺ в крови у больных ИБС обеих групп исследования и здоровых доноров, а также в костном мозге у больных ИБС исследуемых когорт определяли методом проточной цитофлуориметрии, используя лизирующий раствор FACS Lysingsolution (BD Biosciens, США) и моноклональные антитела Mouse Anti-Human CD14-FITC, CD34-PE, VEGFR2(KDR; CD309)-Alexa Fluor 647 согласно инструкциям производителя (BD Biosciens, США). Клетки инкубировали с антителами в течение 30 мин при температуре 4 °C в темноте. После этого клетки отмывали 2 раза в 2 мл Cell-WASH-solution BD (Becton Dickinson, США), центрифугировали 5 мин при 250 g. Для анализа клетки ресуспендировали в 300 мкл Stain-Buffer (Becton Dickinson, США). Для оценки жизнеспособности клеток использо-

вали 7-AAD (eBiosciens, Inc., США). Измерения интенсивности флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Accuri C6 с программным приложением BD Cell Quest for Mac OS® X (BD Biosciens, США). Результат представляли в %, пересчитывая количество ЭПК от доли всех VEGFR2⁺ клеток в биоматериале.

Плазму крови у больных ИБС обеих групп исследования и здоровых доноров, а также надосадок костного мозга у больных ИБС исследуемых когорт, аликвотировали и хранили при температуре -80 °С не более 12 месяцев. Концентрацию VEGF-A, SDF-1, MCP-1 определяли с помощью коммерческой тест-системы для мультиплексного анализа Magnetic Lumines Assay Kit for VEGFA, VEGFB, PDGF, SDF1, SCF, FGF1, TGFb1, MCP1 (Cloud-Clone-Corp, США) и автоматизированного анализатора Bio-Plex Protein Assay System (Bio-Rad, США), концентрацию HIF-1α — методом иммуноферментного анализа с помощью набора Human HIF-1α ELISA Kit (Cloud-Clone-Corp, США). Результат выражали для HIF-1α в нг/мл, для цитокинов — в пг/мл.

Статистический анализ данных был выполнен с помощью программы Statistica 10.0. Для статистического описания результатов вычисляли медиану, 25-й и 75-й перцентили. С целью сравнительного анализа выборочных данных применяли критерии Манна—Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок), используя поправку Бенджамини—Хохберга на множественные сравнения. Результаты статистического анализа считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование позволило зарегистрировать статистически значимые изменения всех изучаемых параметров крови (за исключением VEGF-A) у больных ИБС относительно либо физиологических значений, либо относительно показателей костного мозга, хотя в пределах одного типа биоматериала отличий между группами пациентов выявлено не было (табл. 1).

Содержание HIF-1α и SDF-1 в периферической крови было повышенным относительно показателей здоровых лиц только у больных ИБС без кардиомиопатии, а у пациентов с ИКМП соответствовало таковым (табл. 1). При этом концентрация SDF-1 в костном мозге была больше, но уровень HIF-1α, напротив, меньше, чем их содержание в кровотоке вне зависимости от наличия ИКМП. В то же время концентрация MCP-1 в крови варьировала в пределах нормы у больных ИБС обеих групп исследования (с отчетливой тенденцией к нарастанию у пациентов без ИКМП, $p = 0,105$), в костном мозге была сопоставимой между когортами больных, но в 2 раза выше, чем в крови у пациентов с ИКМП,

чего не отмечалось у больных ИБС без кардиомиопатии (табл. 1). Вне зависимости от наличия ИКМП содержание VEGF-A в крови у больных ИБС варьировало в физиологических пределах и соответствовало значениям в миелоидной ткани, демонстрируя у пациентов с ИКМП лишь тенденцию к накоплению VEGF-A в крови относительно нормы с некоторым превышением показателя относительно костного мозга у данной группы больных (табл. 1).

Содержание ранних ЭПК было повышенным в крови у больных ИБС без кардиомиопатии (в сравнении со здоровыми донорами) и соответствовало их количеству в костном мозге, а у пациентов с ИКМП, напротив, в крови регистрировались нормальные значения показателя с накоплением этих клеток в миелоидной ткани (относительно крови, табл. 1).

В дополнение к вышеописанным результатам важно обратить внимание на два факта. Во-первых, у пациентов с ИКМП содержание анализируемых клеточных и гуморальных факторов ангиогенеза в крови полностью соответствовало норме, в то время как у больных ИБС без кардиомиопатии большинство параметров превышали их уровень у здоровых доноров (табл. 1). Во-вторых, концентрация MCP-1 в крови у больных ИБС без кардиомиопатии достоверно не отличалась от нормы только вследствие использования поправки на множественные сравнения Бенджамини—Хохберга (табл. 1); при этом до ее введения результаты сравнительного анализа продемонстрировали статистически значимое увеличение параметра относительно показателей здоровых лиц ($p = 0,035$).

Проведенные исследования обнаружили увеличение численности ранних ЭПК в крови у больных ИБС без кардиомиопатии и физиологический их уровень у пациентов с ИКМП. Поскольку эти клетки активно участвуют в репарации эндотелия и ангиогенезе [2, 3], то профицит ранних ЭПК в крови у больных ИБС можно рассматривать как защитно-приспособительную реакцию организма в условиях хронического воспаления сосудистой стенки вследствие атеросклероза, как морфологического субстрата ИБС. Между тем, несмотря на равную степень выраженности коронарного атеросклероза по данным коронаровентрикулографии и повышенную в равной степени десквамацию эндотелия в системном кровотоке у больных ИБС, страдающих и не страдающих ИКМП [4], физиологический уровень ранних ЭПК у пациентов с ИКМП (табл. 1), очевидно, свидетельствует об отсутствии стимуляции ангиогенеза при данной патологии. Ранее нами продемонстрирована редукция микроциркуляторного русла у пациентов с ИКМП [1].

Ввиду того, что образование ранних ЭПК происходит в красном костном мозге [3], то не-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ГИПОКСИЯ-ИНДУЦИРУЕМОГО ФАКТОРА, ПРОАНГИОГЕННЫХ ЦИТОКИНОВ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И КОСТНОМ МОЗГЕ У БОЛЬНЫХ ИБС, СТРАДАЮЩИХ И НЕ СТРАДАЮЩИХ ИКМП, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. THE CONTENT OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR, PROANGIOGENIC CYTOKINES AND ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN PERIPHERAL BLOOD AND IN BONE MARROW IN CHD PATIENTS WITH AND WITHOUT ICMP, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Параметры Parameters	Здоровые доноры Healthy donors	Больные ИБС без ИКМП Patients CHD without ICMP		Больные ИБС с ИКМП Patients CHD with ICMP	
		кровь blood	костный мозг bone marrow	кровь blood	костный мозг bone marrow
MCP-1, пг/мл MCP-1, pg/mL	190,0 (168,0-215,0)	223,0 (180,0-297,0) p _к = 0,105	279,0 (206,0-341,0) p ₁ = 0,263	202,5 (170,5-249,8) p _к = 0,429 p ₂ = 0,685	406,5 (265,0-583,0) p ₁ = 0,028 p ₂ = 0,438
SDF-1, пг/мл SDF-1, pg/mL	30,00 (5,00-45,00)	60,00 (50,00-80,00) p _к = 0,049	120,0 (95,0-180,0) p ₁ = 0,003	49,00 (37,00-56,00) p _к = 0,087 p ₂ = 0,051	130,0 (90,0-170,0) p ₁ = 0,005 p ₂ = 0,944
VEGF-A, пг/мл VEGF-A, pg/mL	3,80 (1,00-6,50)	4,50 (3,00-8,00) p _к = 0,314	4,01 (3,55-4,58) p ₁ = 0,722	6,00 (3,00-9,50) p _к = 0,216 p ₂ = 0,502	4,00 (4,00-4,18) p ₁ = 0,180 p ₂ = 0,839
HIF-1α, нг/мл HIF-1α, ng/mL	4,60 (3,28-5,11)	6,00 (5,00-6,20) p _к = 0,049	1,08 (0,80-1,14) p ₁ < 0,001	5,40 (4,50-6,00) p _к = 0,209 p ₂ = 0,374	0,97 (0,80-1,11) p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,712
Ранние ЭПК, % Early EPCs, %	0,19 (0,13-0,32)	0,70 (0,46-1,23) p _к < 0,001	0,58 (0,49-1,36) p ₁ = 0,530	0,31 (0,15-0,64) p _к = 0,260 p ₂ = 0,427	0,57 (0,45-0,98) p ₁ = 0,019 p ₂ = 0,546

Примечание. ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИКМП – ишемическая кардиомиопатия; MCP – моноцитарный хемотаксический белок, SDF – фактор стромальных клеток, VEGF – фактор роста сосудистого эндотелия; HIF – гипоксия-индуцируемый фактор, ЭПК – эндотелиальные прогениторные клетки; p_к – уровень статистической значимости различий показателей по сравнению с содержанием медиаторов у здоровых доноров, p₁ – у больных ИБС в периферической крови, p₂ – у больных ИБС без кардиомиопатии.

Note. CHD, coronary heart disease; ICMP, ischemic cardiomyopathy; MCP, monocyte chemotactic protein; SDF, stromal cell-derived factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; EPC, endothelial progenitor cells; p_к, the level of statistical significance of the differences in indicators compared with the mediators content in healthy donors, p₁, in patients with coronary artery disease in peripheral blood, p₂, in patients with CHD without cardiomyopathy.

достаточное их содержание в крови может быть вызвано как снижением пролиферации и дифференцировки этих клеток в миелоидной ткани, так и нарушением их миграции из костного мозга в кровотоки. Согласно полученным данным численность ранних ЭПК в костном мозге у больных ИБС, страдающих и не страдающих ИКМП, не отличалась между группами пациентов, но при ИКМП содержание ЭПК в миелоидной ткани было больше, чем в кровотоке, а при ИБС без кардиомиопатии – равным значениям в крови (табл. 1). Следовательно, физиологический уровень ранних ЭПК в крови при ИКМП не связан с нарушением их генерации в костном мозге (где их больше, чем в крови) и обуславливается затруднением мобилизации этих клеток в кровь, что и объясняет аккумуляцию ранних ЭПК в миелоидной ткани относительно крови у пациентов с ИКМП (табл. 1). Так как ранние ЭПК являются

клетками моноцитарного иммунофенотипа, то элиминация их из костного мозга может контролироваться с помощью MCP-1. Поскольку они имеют эндотелиальный иммунофенотип, то этот процесс может быть также опосредован VEGF-A и, ввиду того, что это прогениторные клетки – при участии SDF-1 [11, 14, 15].

Несмотря на то, что VEGF-A представляет собой важный медиатор ангиогенеза [11, 16], в настоящем исследовании не было обнаружено особенностей его содержания в крови и костном мозге у больных ИБС двух групп исследования. Концентрация VEGF-A не отличалась между типами биоматериала в группах (табл. 1), а в миокарде она была повышенной в равной степени вне зависимости от ИКМП [4]. Отсутствие каких-либо отличий между группами больных ИБС в нескольких типах биоматериала можно объяснить повышающейся при воспалении экспрессией на

эндотелиоцитах и многих лейкоцитах рецептора типа I для VEGF (VEGFR1), который выступает в роли ловушки для VEGF-A, связывает данный цитокин, повышая проницаемость сосудов, и не дает ему взаимодействовать с VEGFR2, который опосредует проангиогенные реакции [16]. Вероятно, поэтому VEGF-A не определяет особенности ангиогенеза при ИКМП, что делает малоэффективной стратегию его стимуляции посредством VEGF-A.

Ключевым индуктором ангиогенеза служит HIF, который непосредственно синтезируются клетками, находящимися в условиях кислородного голодания, и далее активирует синтез как VEGF-A, так и SDF-1 [9, 11]. Продукция HIF-1 нарастает в условиях острой (1-2% O₂) или циклической гипоксии, а HIF-2 — в большей степени при хронической кислородной недостаточности (< 5% O₂) [5]. Это объясняет высокие концентрации HIF-1α у больных ИБС без кардиомиопатии (табл. 1), у которых в момент приступа стенокардии развивается, очевидно, острая гипоксия. Между тем, при наличии аналогичной по степени тяжести недостаточности кровообращения II-III класса по NYHA у пациентов с ИКМП определяется физиологический уровень HIF-1α в крови, который, очевидно, связан с редкими и слабовыраженными эпизодами острой гипоксии во время приступов стенокардии, но длительной кислородной недостаточностью вследствие редукции сосудистой сети миокарда [1, 7]. Примечательно, что в костном мозге концентрация HIF-1α определялась ниже, чем в крови, у больных обеих групп исследования (табл. 1), что позволяет сделать вывод о дистантном характере участия HIF-1α в гемопоэзе, т. е. о преимущественном его образовании вне костного мозга. Это согласуется с общеизвестным фактом о том, что при недостаточности кровообращения развивается циркуляторная гипоксия, наиболее выраженная в дистальных участках тела и нижних конечностей.

Известно, что HIF-1α связывается с промотором *SDF-1 (CXCL12)*, инициируя его транскрипцию и синтез SDF-1, который представляет собой пептид с массой 8 кДа. Он служит хемоаттрактантом для ЭПК, гемопоэтических стволовых клеток (СК), мезенхимальных СК, эндогенных СК сердца, регенеративных клеток жировой ткани для обеспечения их миграции и хоуминга, что определило успех использования SDF-1 в клеточной терапии ишемии [8, 15]. Согласно полученным данным концентрация SDF-1 в крови у больных ИБС без кардиомиопатии превышала норму (табл. 1), обеспечивая усиленную мобилизацию ЭПК из костного мозга и увеличение их числа в крови (табл. 1). Высокая концентрация SDF-1 у этих больных связана, очевидно, с ишемией тканей и органов, где данный пептид активно производится (в эндотелии сосудов, в строме сердца и кардиомиоцитах, в почках, печени, се-

лезенке, волокнах скелетных мышц и др.) [15]. Физиологический уровень SDF-1 в крови у пациентов с ИКМП, соответственно, обуславливал норму и для ранних ЭПК в кровотоке (табл. 1). Это может быть вызвано как анергией его продукции вследствие физиологической концентрации HIF-1α в крови у данной группы больных, так и повышенным разрушением SDF-1 дипептидилпептидазой-4 в положении 2-3 или матриксной металлопротеиназой-2 и -9 в положении 4-5 (деструкция в положении 4-5 приводит к потере способности SDF-1 связываться со своим рецептором CXCR4) [8, 15]. Экспрессия CXCR4 повышается непосредственно за счет HIF-1 и HIF-2, поскольку промотор гена CXCR4 содержит мотив HRE. Так, хроническая гипоксия под действием HIF-2 увеличивает экспрессию CXCR4 в эндотелиальных клетках-предшественниках и макрофагах, что привлекает их в очаг ишемии [9].

В костном мозге SDF-1 тоже активно синтезируется ретикулярными клетками с участием транскрипционного фактора Foxc1, обеспечивая фиксацию ЭПК, гемопоэтических и мезенхимальных СК [10, 15]. Вероятно, именно поэтому концентрация SDF-1 в миелоидной ткани была выше, чем в крови у больных ИБС обеих групп исследования (табл. 1). Дестабилизация контакта между CXCR4, экспрессируемым гемопоэтическими предшественниками, и SDF-1, синтезируемым стромальными клетками костного мозга, считается необходимой для отделения закрепленных предшественников от костномозговых ниш, что приводит к дальнейшей их мобилизации в кровотоки [10, 15]. Исходя из вышеизложенного, фиксация ранних ЭПК в костном мозге с участием SDF-1 при ИКМП не усилена, но, вероятно, имеет место недостаточная мобилизация этих клеток вследствие меньшего градиента этого пептида между кровью и костным мозгом.

Кроме индукции ангиогенеза HIF-1α ингибирует апоптоз кардиомиоцитов, активирует синтез ферментов гликолиза и (посредством NF-κB) образование провоспалительных цитокинов, в том числе MCP-1 [11]. Этим, вероятно, объясняется стойкая тенденция к увеличению концентрации MCP-1 в крови у больных ИБС без кардиомиопатии (табл. 1), что без введения поправки Бенджамини—Хохберга демонстрировало даже статистически значимые различия. Источниками MCP-1 являются эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, гладкомышечные клетки, моноциты/макрофаги, фибробласты, астроциты и клетки микроглии [13]. Поскольку ранние ЭПК имеют моноцитарный иммунофенотип, то они могут быть элиминированы из костного мозга в кровотоки под действием MCP-1, взаимодействующего со своим рецептором CCR2 [13, 14]. Моноциты в костном мозге малоподвижны и находятся вблизи с

Nestin⁺ стромальными клетками, которые после акцепции сигнала с Toll-подобного рецептора 4-го типа в результате его связывания с провоспалительными стимулами увеличивают продукцию MCP-1 и моноциты начинают смещаться [14]. При этом обсуждается 2 модели мобилизации моноцитов: модель хемокинеза – MCP-1 увеличивает подвижность моноцитов и вероятность их контакта с эндотелием кровеносных сосудов; модель хемотаксиса – MCP-1, продуцируемый вблизи сосудистых синусов, связывается с гликозаминогликанами и образует хемокиновый градиент, который привлекает моноциты к абминальной части эндотелия и затем направляет их трансмиграцию в кровотоки [12]. Вторая модель объясняет нарушение элиминации ранних ЭПК и аккумуляцию их в костном мозге у пациентов с ИКМП, у которых концентрация MCP-1 в миелоидной ткани была в 2 раза выше, чем в крови (табл. 1), вероятно, удерживая ранние ЭПК в костном мозге. Кроме того, воздействие MCP-1 приводит к снижению чувствительности моноцитов к SDF-1 в костном мозге, возможно, за счет интернализации комплексов их рецепторов CCR2-CXCR4, что с одной стороны ослабляет сигнал якоря CXCR4 [14], а с другой может ухудшать ответ клеток на внекостномозговую SDF-1 как хемоаттрактант.

Заключение

Развитие ИБС, осложненной и неосложненной ИКМП, характеризуется физиологической концентрацией VEGF-A в крови сопоставимой с таковой в костном мозге при наличии особенностей мобилизации ЭПК из миелоидной ткани и отсутствия нарушений образования этих клеток в ней. Формирование ИКМП ассоциировано с аккумуляцией ранних ЭПК в костном мозге вследствие повышенного их удержания избытком MCP-1 в данной ткани в сочетании со слабовыраженным привлечением ранних ЭПК в кровотоки из-за отсутствия профицита SDF-1 и HIF-1 α в крови. Развитие ИБС без кардиомиопатии, напротив, сопровождается активной мобилизацией ранних ЭПК из костного мозга вследствие избытка SDF-1 и HIF-1 α в крови при отсутствии отрицательного градиента для MCP-1 в костном мозге. Таким образом, при ИКМП отмечается анергия проангиогенного ответа организма на гипоксию и гранулематозное воспаление сосудистой стенки при атеросклерозе, что не позволяет обеспечить протекцию эндотелия, рост коллатералей, улучшение перфузии миокарда и его сократимости.

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

Список литературы / References

1. Чумакова С.П., Уразова О.И., Шипулин В.М., Суходоло И.В., Стельмашенко А.И., Денисенко О.А., Андреев С.Л., Демин М.С., Чурина Е.Г. Продукция медиаторов ангиогенеза и структура сосудистой стенки в сердце при ишемической кардиомиопатии // *Acta Biomedica Scientifica*, 2023. Т. 8, № 6. С. 81-90. [Chumakova S.P., Urazova O.I., Shipulin V.M., Sukhodolo I.V., Stelmashenko A.I., Denisenko O.A., Andreev S.L., Demin M.S., Churina E.G. Production of angiogenesis mediators and the structure of the vascular wall in the heart in ischemic cardiomyopathy *Acta Biomedica Scientifica = Acta Biomedica Scientifica*, 2023. Vol. 8, no. 6. pp. 81-90. (In Russ.)]
2. Calabrese E.J. Hormesis and endothelial progenitor cells. *Dose Response*, 2022, Vol. 20, no. 1, 15593258211068625. doi: 10.1177/15593258211068625
3. Chopra H., Hung M.K., Kwong D.L., Zhang C.F., Pow E.H.N. Insights into endothelial progenitor cells: origin, classification, potentials, and prospects. *Stem Cells Int.*, 2018, Vol. 2018, 9847015. doi: 10.1155/2018/9847015.
4. Chumakova S.P., Urazova O.I., Shipulin V.M., Andreev S.L., Denisenko O.A., Gladkovskaya M.V., Litvinova L.S., Bubenchikov M.A. Role of angiopoietic coronary endothelial dysfunction in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Biomedicines*. 2023, Vol. 11, no. 7, 1950. doi: 10.3390/biomedicines11071950.
5. Cowman S.J., Koh M.Y. Revisiting the HIF switch in the tumor and its immune microenvironment. *Trends Cancer*, 2022, Vol. 8, no. 1, pp. 28-42.
6. Del Buono M.G., Moroni F., Montone R.A., Azzalini L., Sanna T., Abbate A. Ischemic cardiomyopathy and heart failure after acute myocardial infarction. *Curr. Cardiol. Rep.*, 2022, Vol. 24, no. 10, pp. 1505-1515.
7. Felker G.M., Shaw G.M., O'Connor C.M. A standardized definition of ischemic cardiomyopathy for use in clinical research. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2002, Vol. 39, no. 2, pp. 208-210.
8. Jiang Q., Huang K., Lu F., Deng S., Yang Z., Hu S. Modifying strategies for SDF-1/CXCR4 interaction during mesenchymal stem cell transplantation. *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2022, Vol. 70, no. 1, pp. 1-10.
9. Korbecki J., Kojder K., Kapczuk P., Kupnicka P., Gawronska-Szklarz B., Gutowska I., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. The effect of hypoxia on the expression of CXC chemokines and CXC chemokine receptors – a review of literature. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 2, 843. doi: 10.3390/ijms22020843.
10. Nagasawa T. CXCL12/SDF-1 and CXCR4. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 301. doi: 10.3389/fimmu.2015.00301.
11. Sato T., Takeda N. The roles of HIF-1 α signaling in cardiovascular diseases. *J. Cardiol.*, 2023, Vol. 81, no. 2, pp. 202-208.
12. Shi C., Pamer E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 11, pp. 762-774.

13. Singh S., Anshita D., Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int. Immunopharmacol.*, 2021, Vol. 101, Part B, 107598. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107598.
14. Teh Y.C., Ding J.L., Ng L.G., Chong S.Z. Capturing the fantastic voyage of monocytes through time and space. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 834. doi: 10.3389/fimmu.2019.00834.
15. Zhong J., Rajagopalan S. Dipeptidyl peptidase-4 regulation of SDF-1/CXCR4 axis: implications for cardiovascular disease. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 477. doi: 10.3389/fimmu.2015.00477.
16. Zhou Y., Zhu X., Cui H., Shi J., Yuan G., Shi S., Hu Y. The Role of the VEGF family in coronary heartdisease. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2021, Vol. 8, 738325. doi: 10.3389/fcvm.2021.738325.

Авторы:

Чумакова С.П. — д.м.н., доцент, профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Денисенко О.А. — соискатель кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Уразова О.И. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Шипулин В.М. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; профессор кафедры госпитальной хирургии с курсом сердечно-сосудистой хирургии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Андреев С.Л. — к.м.н., врач — сердечно-сосудистый хирург, старший научный сотрудник отделения сердечно-сосудистой хирургии, Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Винс М.В. — к.м.н., доцент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Гладковская М.В. — очный аспирант и лаборант-исследователь кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Дёмин М.С. — аспирант кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Дмитриева А.А. — студент 6-го курса медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Гулумженов А.Г. — студент 6-го курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Authors:

Chumakova S.P., PhD, MD (Medicine), Assistant Professor, Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Denisenko O.A., Applicant of the Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Urazova O.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Shipulin V.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of Russia, Chief Research Associate, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Hospital Surgery with a Course of Cardiovascular Surgery, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Andreev S.L., PhD (Medicine), Cardiovascular Surgeon, Senior Research Associate, Department of Cardiology, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

Vins M.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Gladkovskaya M.V., Full-time Postgraduate Student and Laboratory Researcher, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Demin M.S., Postgraduate Student, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Dmitrieva A.A., 6th year Student of the Faculty of Medical Biology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Gulomzhenov A.G., 6th year Student at the Faculty of Medicine, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 30.03.2024
Отправлена на доработку 06.04.2024
Принята к печати 18.04.2024

Received 30.03.2024
Revision received 06.04.2024
Accepted 18.04.2024

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПОЛИПРЕНИЛФОСФАТА НАТРИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**Пронин А.В., Чекнев С.Б., Николаева Т.Н., Козлов В.В.,
Кожевникова Т.Н., Вострова Е.И., Григорьева Е.А., Сосновская О.Ю.,
Сарычева М.А., Востров Ф.В., Наровлянский А.Н., Санин А.В.**

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

Резюме. Цель работы – изучение популяционного состава лимфоидных клеток селезенки, функциональной активности лимфоцитов и оценка состояния микробиоты желудочно-кишечного тракта лабораторных животных при экспериментальном моделировании метаболического синдрома (МС).

Эксперименты выполнены на мышах C57Bl/6, самцах, массой 18-20 г.

Использовали модели МС и гиперлипидемии (ГЛ), основанные на длительном выпаивании животных 20% водным раствором фруктозы с добавлением в корм холестерина и внутрибрюшинном введении мышам поллоксамера 407, соответственно.

Оценку субпопуляционного состава спленоцитов проводили методом проточной цитометрии. Определение лептина, адипонектина, инсулина, IL-15, IL-22 в сыворотке крови – методом ELISA. Пролиферацию лимфоцитов оценивали в реакции бласттрансформации.

Микробиотический пейзаж дистального отдела толстого кишечника оценивали показателями микробных популяций кишечной флоры при посеве материала на дифференциально-диагностические среды.

Результаты моделирования свидетельствуют об изменении популяционного состава спленоцитов (снижение CD4⁺ и CD8⁺T-клеток, активация Treg-клеток CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), сопровождающемся снижением активности T-клеток и повышением пролиферации B-лимфоцитов, нарушением продукции IL-15 и IL-22, липидного и углеводного обмена (адипонектин, лептин, инсулин), что служит предпосылкой развития хронического воспаления, являющегося патогенетическим признаком МС.

Адрес для переписки:

*Кожевникова Татьяна Николаевна
ФГБУ «Национальный исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии имени почетного
академика Н.Ф. Гамалеи»
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел.: 8 (916) 686-84-09.
E-mail: tatiana140663@gmail.com*

Address for correspondence:

*Tatiana N. Kozhevnikova
N. Gamaleya National Research Centre
for Epidemiology and Microbiology
18 Gamaleya St
Moscow
123098 Russian Federation
Phone: +7 (916) 686-84-09.
E-mail: tatiana140663@gmail.com*

Образец цитирования:

*А.В. Пронин, С.Б. Чекнев, Т.Н. Николаева, В.В. Козлов,
Т.Н. Кожевникова, Е.И. Вострова, Е.А. Григорьева,
О.Ю. Сосновская, М.А. Сарычева, Ф.В. Востров,
А.Н. Наровлянский, А.В. Санин «Иммунобиологическая
эффективность нового лекарственного средства
на основе полипренилфосфата натрия для лечения
и профилактики метаболического синдрома в
эксперименте» // Медицинская иммунология, 2024.
Т. 26, № 5. С. 1061-1070.
doi: 10.15789/1563-0625-IEO-16729*

© Пронин А.В. и соавт., 2024

*Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*A.V. Pronin, S.B. Cheknev, T.N. Nikolaeva, V.V. Kozlov,
T.N. Kozhevnikova, E.I. Vostrova, E.A. Grigorieva,
O.Yu. Sosnovskaya, M.A. Sarycheva, A.V. Vostrov,
A.N. Narovlyansky, A.V. Sanin “Immunobiological efficacy
of a new sodium polyprenyl phosphate based medicine for
the treatment and prevention of experimenrtal metabolic
syndrome”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1061-1070.
doi: 10.15789/1563-0625-IEO-16729*

© Pronin A.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IEO-16729

Экспериментальные модели обнаруживали изменения микробиоты кишечника лабораторных животных, характерные для проявления метаболического дисбиоза – увеличение представленности в биоматериале бактерий *Firmicutes* (стафилококков, стрептококков, энтерококков), изменения содержания факультативной (*E. coli*) и транзитной (*Enterobacter*) микрофлоры.

С целью разработки нового средства терапии и профилактики ГЛ и МС использованы производные полиизопреноидов – биорегуляторы растительного происхождения в комбинации полипренилфосфата натрия (ППФ) и бета-ситостерина (БСС).

Результаты свидетельствуют о более выраженных изменениях популяционного состава спленоцитов и показателей активации Тreg-клеток при моделировании ГЛ по сравнению с моделью МС. Введение ППФ и БСС оказывает иммунокорректирующее действие в ходе лечения.

Лечебное действие препарата и профилактика симптомов заболевания сопровождаются нормализацией состояния микробиоты толстого кишечника – восстанавливается количество облигатных бактерий *E. coli lac+*, *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования ППФ и БСС для профилактики и лечения ГЛ и МС с целью воздействия на ведущие звенья патогенеза метаболической болезни.

Ключевые слова: метаболический синдром, экспериментальная модель, иммунный ответ, кишечная микробиота, полипренилфосфат натрия, лекарственное средство

IMMUNOBIOLOGICAL EFFICACY OF A NEW SODIUM POLYPRENYL PHOSPHATE BASED MEDICINE FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF EXPERIMENTAL METABOLIC SYNDROME

Pronin A.V., Cheknev S.B., Nikolaeva T.N., Kozlov V.V.,
Kozhevnikova T.N., Vostrova E.I., Grigorieva E.A., Sosnovskaya O.Yu.,
Sarycheva M.A., Vostrov A.V., Narovlyansky A.N., Sanin A.V.

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

Abstract. The aim of the research was to study the population composition of the splenic lymphoid cells, to assess the functional activity of lymphocytes as well as the state of the gastrointestinal tract microbiota in experimental modeling of metabolic syndrome (MS).

The studies were conducted using two experimental models of MS and hyperlipidemia (HL), based on prolonged drinking of animals with 20% aqueous fructose solution with added cholesterol and intraperitoneal administration of Poloxamer 407 to mice, respectively.

The results of the experiments indicate a change in the population composition of splenocytes (decrease in CD4⁺ and CD8⁺T cells, activation of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Thed cells), accompanied by a decrease in T cell activity and increased proliferation of B lymphocytes, impaired production of IL-15 and IL-22, as well as lipid and carbohydrate metabolism (adiponectin, leptin, insulin), which serves as a prerequisite for the development of chronic inflammation, which is a pathogenetic sign of MS.

We found changes in the intestinal microbiota of mice characteristic of the manifestation of metabolic dysbiosis – an increase in the representation of Firmicutes bacteria (staphylococci, streptococci, enterococci) in the biomaterial, changes in the content of facultative (*E. coli*) and transient (*Enterobacter*) microflora.

In order to develop a new kind of medicine for therapy and prevention of HL and MS, we used a combination of sodium polyprényl phosphate (PP) and beta-sitosterol (BSS), polyisoprenoid derivatives of plant origin.

More pronounced changes were found in the splenocyte population composition and activation parameters of Treg cells in HL modeling compared with the MS model. The introduction of PP and BSS has an immunocorrective effect during treatment.

The therapeutic effect of this drug, as well as the prevention of the MS symptoms, is accompanied by normalization of the microbiota state.

The data obtained indicate the prospects of using PP and BSS for the prevention and treatment of HL and MS in order to influence the leading links in the pathogenesis of metabolic disease.

Keywords: metabolic syndrome, experimental models, immune response, gut microbiota, sodium polyphenyl phosphate

Введение

Метаболический синдром (МС) – полиэтиологический симптомокомплекс дисбиотических, метаболических, гормональных нарушений и клинических проявлений, которые существенно повышают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза, диабета II типа и других патологических состояний.

Изменения жирового и углеводного обмена ведут к системному хроническому воспалению и метаболическим нарушениям, ассоциируются с изменениями архитектуры лимфоидной ткани, популяционного состава лимфоцитов, их фенотипа, сопровождаются изменениями иммунного ответа против патогенов, обуславливают аккумуляцию липидов в нежировой ткани, в том числе – в иммунокомпетентных органах, включая костный мозг, тимус, лимфатические узлы [7, 8]. Метаболические дисфункции сопровождаются изменениями кооперации, межклеточных взаимодействий в различных звеньях иммунной системы, клеточного и гуморального ответа, активации и координации систем врожденного и адаптивного иммунитета [3, 4, 5, 11].

Ассоциированная с кишечной стенкой лимфоидная ткань служит связующим звеном между интестинальной микрофлорой и жировой тканью, участвует в процессинге, презентации антигенов и широко представлена различными популяциями лимфоцитов – CD3, CD4, CD8. Дисбиоз, изменяя метаболизм микробиома, влияет на воспалительные реакции и адаптивный иммунитет, а также способствует развитию метаболических нарушений [9, 13, 14].

На экспериментальных моделях гиперлипидемии (ГЛ) и гипергликемии (ГГ), являющихся патогенетическими звеньями развития МС, исследовали показатели липидного и углеводного обмена, содержание пептидных гормонов, морфологические изменения ткани печени, популяционный и количественный состав микрофлоры содержимого дистального сегмента толстого кишечника. Изучены популяционный состав лимфоидных клеток и функциональная активность спленоцитов.

С целью разработки нового средства терапии и профилактики ГЛ и ГГ в симптомокомплексе МС, нормализации обменных процессов и купи-

рования хронического системного воспаления использованы производные полиизопреноидов – биорегуляторы растительного происхождения в комбинации полипиренилфосфата натрия (ППФ) и бета-ситостерина (БСС), представляющие собой естественные, ареактогенные, не проявляющие токсических свойств метаболиты, не обладающие способностью индуцировать в качестве антигенов нейтрализующие ответы организма. Эти соединения выполняют в организме роль промежуточных акцепторов сахаров в процессе гликозилирования белков и обладают широким спектром активности – от прямого противовирусного действия в отношении вирусов герпеса, гриппа, клещевого энцефалита, желтой лихорадки, кори до способности поляризовать иммунный ответ в сторону Th1 и оказывать адъювантное действие при вакцинации [10].

Использование инновационных фармацевтических и нутрицевтических продуктов для целенаправленного воздействия на ведущие звенья патогенеза метаболической болезни, контроля микробной колонизации и поддержания здорового микробного сообщества кишечника может предотвратить возникновение воспалительных процессов и метаболических расстройств.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на мышах C57Bl/6, самцах, массой 18–20 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных «Андреевка». Животных содержали при свободном доступе к воде и корму. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативным документам. Все процедуры по рутинному уходу выполнялись в соответствии с приказом Минздрава России № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Исследования у экспериментальных животных проведены на моделях, основанных на длительном выпаивании мышей 20% водным раствором фруктозы с добавлением в корм холестерина (модель ГГ – МС) или внутрибрюшинном введении мышам поллоксамера 407 (P407 – модель ГЛ) [1, 6].

Контрольная группа мышей получала стандартный полусинтетический корм и воду для питья в режиме *ad libitum*.

В качестве лекарственного средства (ЛС) использована новая оригинальная фармацевтическая композиция (комбинация полиизопреноидов) на основе ППФ и БСС в виде суспензии.

Введение ЛС проводили в течение 2-х месяцев 5 раз в неделю, интрагастрально через зонд по 0,2 мл суспензии на мышшь.

Содержание липопротеинов высокой и низкой (ЛПНП) плотности, общего холестерина, триглицеридов, глюкозы в плазме крови определяли на биохимическом анализаторе Beckman Coulter 680 (Beckman Coulter, США). Для определения лептина и адипонектина в сыворотке крови мышшей использовали коммерческие наборы фирмы AssayPro, инсулина – фирмы Ray-Biotech (США), измерения проводили методом ELISA на спектофотометре Multiskan FC Termo Fisher (Termo Fisher Scientific, США) с использованием программы SkanItSoftware 3.0 (Termo Fisher Scientific, США).

Микробиотический пейзаж дистального отдела толстого кишечника оценивали по количественным и родовым показателям микробных популяций: грам-положительные бактерии группы *Firmicutes*, включая *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, и грам-отрицательные бактерии рода *Enterobacter*, в том числе *E. coli lac+*, *E. coli lac-*, грибы *Candida*. Для оценки популяционного и количественного состава микробиоты исследуемый материал высевали на дифференциально-диагностические среды. Количество бактерий в биоматериале выражали в единицах lg(КОЕ/г) или lg(КОЕ/мл) [2].

Оценка субпопуляционного состава спленоцитов мышшей проведена методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител с флуоресцентными красителями Anti-Mouse CD19-PE (BD Biosciences, США) и Anti-Mouse CD4-APC, CD8-PE (eBioscience, США). Для оценки экспрессии транскрипционного фактора FoxP3 спленоциты метили конъюгатом моноклональных антител с флуоресцентными красителями Anti-Mouse CD4-FITC, Anti-Mouse CD25-APC и Anti-Mouse FoxP3-PE в соответствии с инструкцией производителя (eBioscience Mouse Regulatory T Cell Staining Kit). Рассчитывали средние значения экспрессии CD25 и транскрипционного фактора FoxP3 в CD4 T-клетках селезенки мышшей в группе.

Анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD Biosciences, США). Обработку данных осуществляли в программе FACSDiva 6.1.3 (BD Biosciences, США).

Функциональную активность спленоцитов оценивали в реакции бласттрансформации в присутствии конканавалина А (Sigma, США) в конечной концентрации 4,0 мкг/мл или липо-

полисахарида (Sigma, США) в дозе 200 мкг/мл по включению ³H-тимидина с активностью 1 мкКи/мл (Изотоп, Россия). Подсчет радиоактивности осуществляли на сцинтилляционном счетчике MicroBeta2 (Perkin-Elmer, США) в течение 1 мин.

Каждая группа животных включала 5-8 мышшей. Эксперименты проводили в двух-трех повторях.

При математической обработке результатов ($M \pm m$) достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований при моделировании МС у животных выявлен характерный симптомокомплекс нарушений. Результаты биохимических исследований свидетельствуют о выраженной дислипидемии в опытных группах животных. Обнаружены более глубокие нарушения липидного обмена при внутрибрюшинном введении мышам P407, о чем свидетельствует высокий уровень холестерина, триглицеридов, ЛПНП. По сравнению с контрольной группой, у мышшей, получавших фруктозу в комплексе с холестерином, в отличие от группы с P407, наблюдается существенный рост уровня глюкозы в сыворотке крови. Выявлены различия в содержании основных гормонов, регулирующих жировой и углеводный обмен: лептина, адипонектина и инсулина в сыворотке крови, дистрофические изменения и развитие признаков воспаления ткани печени мышшей опытных групп, по сравнению с контрольной.

Анализ экспрессии поверхностных антигенов спленоцитами показывает, что в группе мышшей с интрагастральным введением P407 (модель ГЛ) наблюдается снижение количества CD3, CD4 и увеличение CD8 T-клеток по сравнению с контрольной группой животных (рис. 1, $p < 0,05$). При этом отношение количества клеток CD4 к CD8 ниже показателей контрольной группы.

Анализ экспрессии маркеров T-регуляторных клеток свидетельствует, что количество CD4⁺T-клеток, экспрессирующих CD25, FoxP3 и CD25⁺FoxP3⁺, в группе животных с введением P407 (модель ГЛ) существенным образом не отличалось от показателей контрольной группы (рис. 2).

При введении мышам с ГЛ на фоне снижения количества CD4⁺T-клеток ЛС отмечено увеличение числа CD8⁺T-клеток, при этом количество CD4⁺T-клеток, экспрессирующих CD25, FoxP3, увеличивается по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует об активации Treg клеток (рис. 2).

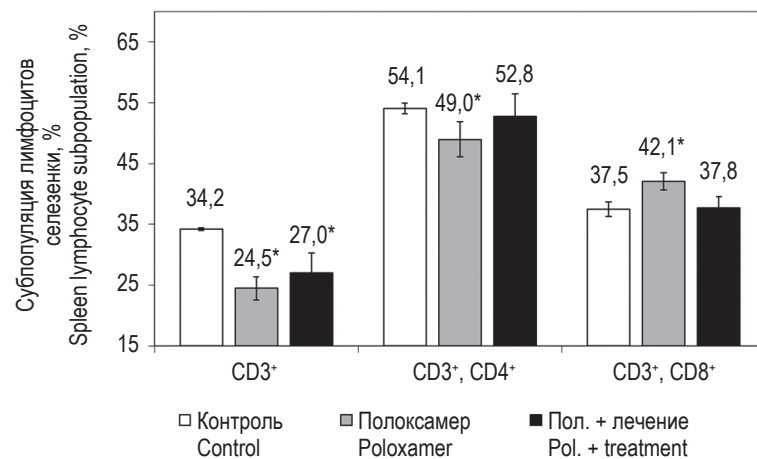


Рисунок 1. Субпопуляционный состав клеток селезенки мышей при введении Pol407 (M±m)

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем (p < 0,05).

Figure 1. Subpopulation composition of mouse spleen cells upon administration Pol407 (M±m)

Note. *, significance of differences compared to control (p < 0.05).

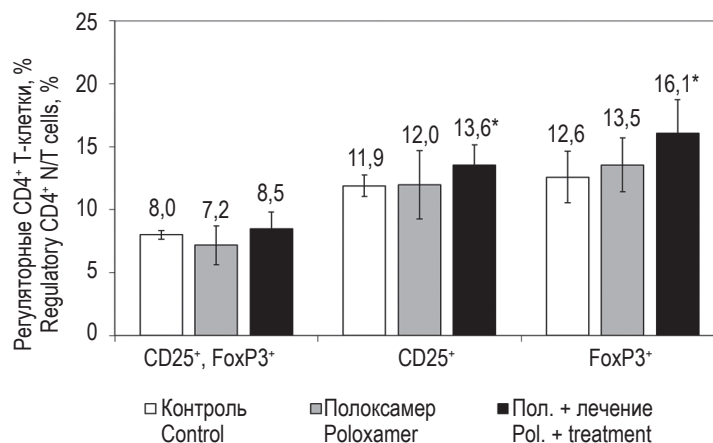


Рисунок 2. Уровень CD25 и транскрипционного фактора FoxP3 в CD4⁺Т-клетках селезенки мышей при введении Pol 407 (M±m)

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем (p < 0,05).

Figure 2. The level of CD25 and transcription factor FoxP3 in CD4⁺T cells of the mouse spleen upon administration Pol407 (M±m)

Note. *, significance of differences compared to control (p < 0.05).

Длительное выпаивание животных водным раствором фруктозы с добавлением в корм холестерина вызывает увеличение количества CD3⁺Т-клеток и снижение CD8⁺Т-клеток по сравнению с показателями контрольной группы (рис. 3). Не выявлено увеличения количества CD4⁺Т-клеток, экспрессирующих маркеры CD25, а также CD25⁺, экспрессирующих FoxP3 (CD25⁺FoxP3⁺) (рис. 4). Результаты свидетельствуют о более выраженных изменениях популяционного состава и активации Treg-клеток селезенки мышей при

моделировании ГЛ сравнительно с показателями на модели ГГ – МС.

Получены данные о развитии в патогенезе МС дисбиотических нарушений, проявляющихся увеличением количества бактерий группы *Firmicutes* – грам⁺ бактерий, участвующих в расщеплении углеводов (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*), представленности условно патогенной флоры *S.aureus*, грибов рода *Candida*, неферментирующих *E. coli lac-* и снижением содержания облигатной грам- флоры –

бактерий рода *Enterobacter* и *E. coli lac+*, необходимой для утилизации белковой и растительной пищи.

Указанные изменения служат предпосылкой развития хронического воспаления, выступающего одним из основных патогенетических проявлений метаболической болезни.

Для изучения терапевтического действия ЛС животным с экспериментальными ГЛ и ГГ в течение 2-х месяцев интрагастрально 5 раз в неделю вводили ЛС.

При лечебном введении ЛС наблюдаются снижение холестерина, триглицеридов, нормализация ЛПНП и активности АСТ, АЛТ.

При введении ЛС мышам группы 3 (ГГ – МС) отмечен рост количества облигатной флоры кишечника – *Bifidobacterium* и ферментирующих *E. coli lac+* ($p < 0,05$) на фоне снижения *E. coli lac-* ($p < 0,05$), а также непатогенных *S.epidermidis*. Выявлено снижение числа бактерий *Enterococcus* ($p < 0,05$). Содержание бактерий рода *Lactobacillus* и *Staphylococcus spp.*, в том числе *S.aureus*, грибов рода *Candida*, соответствует таковому в контрольной группе (табл. 1).

Введение ЛС мышам с ГЛ (группа 5 в табл. 1) восстанавливает состояние микробиоты ЖКТ, что проявляется нормализацией качественных и количественных показателей облигатной, транзитной и условно патогенной флоры:

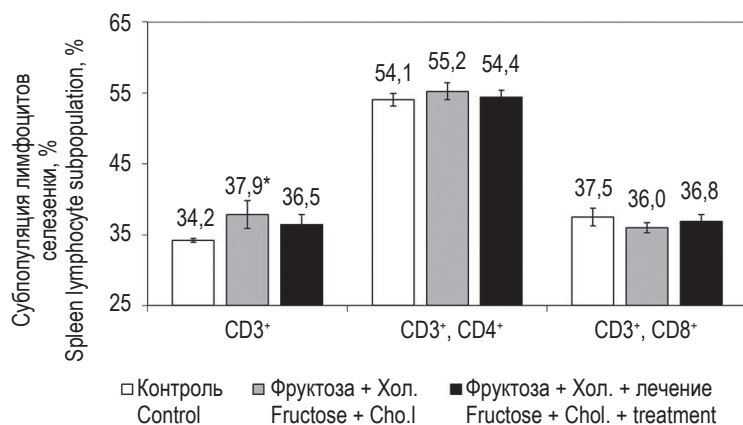


Рисунок 3. Субпопуляционный состав клеток селезенки мышей при выпаивании 20% фруктозой (M±m)

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Figure 3. Subpopulation composition of mouse spleen cells fed of 20% fructose (M±m)

Note. *, significance of differences compared to control ($p < 0.05$).

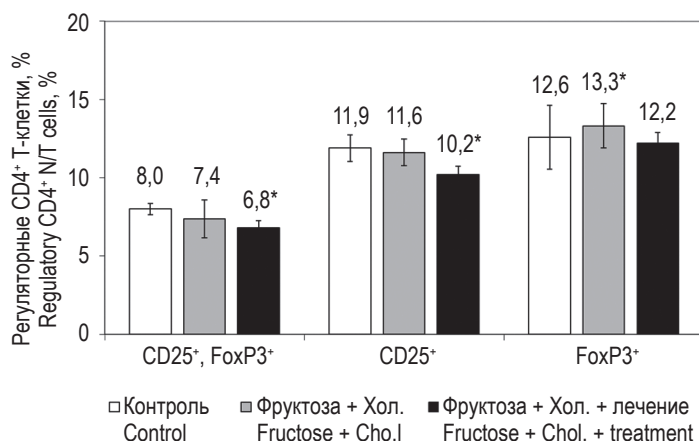


Рисунок 4. Уровень CD25 и транскрипционного фактора FoxP3 в CD4⁺Т-клетках селезенки мышей при выпаивании 20%фруктозой (M±m)

Figure 4. The level of CD25 and transcription factor FoxP3 in CD4⁺T cells of the mouse spleen fed 20% fructose (M±m)

ТАБЛИЦА 1. МИКРОФЛОРА БИОМАТЕРИАЛА ФЕКАЛИЙ МЫШЕЙ (lg (КОЕ/г), M±m)

TABLE 1. MICROFLORA OF MOUSE FECAL BIOMATERIAL (lg (CFU/g), M±m)

Бактерии Bacteria	Группа 1 Контроль Group 1 Control	Группа 2 выпаивание мышей 20%-ным раствором фруктозы с добавлением в корм холестерина Group 2 feeding 20% Fruct. + Chol.	Группа 3 выпаивание мышей 20%-ным раствором фруктозы с добавлением в корм холестерина + ЛС Group 3 feeding 20% Fruct. + Chol. + Treatment	Группа 4 внутрибрюшинное введение Р 407 Group 4 intrapériton. adm. P407	Группа 5 внутрибрюшинное введение Р 407 + ЛС Group 5 intrapériton. adm. P407 + Treatment
<i>E. coli lac+</i>	5,55±0,05	4,88±0,04*	6,01±0,05*	4,08±0,01*	4,74±0,22
<i>E. coli lac-</i>	3,56±0,06	5,92±0,06*	2,73±0,11*	4,92±0,04*	3,54±0,15*
<i>Bifidobacterium</i>	8,36±0,21	8,72±0,01	9,04±0,11*	7,89±0,04*	8,94±0,02
<i>Lactobacterium</i>	7,96±0,02	8,16±0,04*	7,80±0,06	8,25±0,04*	8,59±0,15*
<i>Enterococcus</i>	7,46±0,06	7,88±0,01*	6,91±0,07*	7,97±0,03*	6,94±0,01
<i>Staphylococcus spp.</i>	7,46±0,06	7,91±0,35	7,85±0,09	7,47±0,02	5,72±0,01*
<i>S. epidermidis</i>	6,39±0,02	6,68±0,01	7,57±0,03*	5,19±0,01*	6,11±0,12
<i>S. aureus</i>	1,88±0,04	4,62±0,03*	2,38±0,02	3,94±0,11*	2,46±0,32
Колиформы Coliforms	5,12±0,07	4,49±0,33*	4,81±0,05	3,84±0,12*	4,89±0,05
<i>Candida</i>	3,36±0,02	4,58±0,04*	3,76±0,07	4,98±0,02*	6,25±0,02*

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем (p < 0,05).

Note. *, significance of differences compared to control (p < 0.05).

грам- (*E. coli lac+*, *Bifidobacterium*, бактерий рода *Enterobacter*) и грам+ (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *S.epidermidis* и *S.aureus*) (табл. 1). Отмечено снижение количества неферментирующих *E. coli lac-* (p < 0,05), *Enterococcus* (p < 0,05), *S.aureus* (p < 0,05) по сравнению с группой животных, не получавших ЛС.

Как видно из представленных данных, введение животным ЛС приводит к нормализации качественного и количественного состава микробиоты. Восстанавливаются представительство и количественный состав грам+ и грам- облигатной флоры, транзитной флоры и условно патогенных бактерий. Количественные показатели *E. coli lac+*, *E. coli lac-*, *Enterococcus*, *S.epidermidis* и *S.aureus* соответствуют наблюдаемым в контрольной группе животных.

Таким образом, интрагастральное введение ЛС обуславливает нормализацию состояния ми-

кробиоты толстого кишечника, в том числе восстанавливается количество облигатных бактерий *E. coli lac+* и родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, при этом количество последних превышает показатели контрольной группы (p < 0,05).

На модели ГГ – МС апробировано профилактическое введение ЛС. С этой целью препарат вводили мышам 2 раза в неделю одновременно с выпаиванием животных 20% водным раствором фруктозы и добавлением в корм холестерина.

В толстом кишечнике мышей данной группы наблюдается снижение общей бактериальной обсемененности на фоне количественного роста комменсальных бактерий рода *Lactobacillus*. Отмечены существенно более низкие показатели уровня бактерий *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Enterobacter*, *E. coli lac+* по сравнению с показателями контрольной группы.

Лечение метаболического дисбиоза применением исследованного в работе экспериментального ЛС проявляется количественной и качественной коррекцией кишечного микробиотического пейзажа в сторону восстановления нормального, физиологического состава и функционального состояния кишечной микробиоты, нарушаемого в инициальной фазе развития патогенетических проявлений МС.

Введение выбранных комбинаций полиизопреноидов по профилактической схеме аналогично приводит к восстановлению состояния нормофлоры. Новое комплексное биологически активное соединение (лечебное средство) обладает противовоспалительной активностью, способностью нормализовать липидный обмен, перспективно в плане дальнейших исследований для коррекции первичных проявлений МС.

Введение ЛС приводило к снижению ряда показателей, характерных для развития симптомокомплекса МС, в обеих использованных модельных системах. Нами ранее было показано, что полиизопреноиды (фосфаты полипренолов хвои), стимулируя продукцию ИФН I типа, подавляют активность транскрипционного фактора SREBP2 (белка 2, связывающегося со стеролрегулирующими элементами) и, как следствие, синтез холестерина низкой плотности [12].

Создание подобных препаратов является актуальной задачей антимикробной терапии и медицинской микробиологии.

Получен патент на изобретение «Средство для профилактики и лечения метаболического синдрома».

Заключение

Таким образом, длительное выпаивание мышей 20%-ным водным раствором фруктозы с добавлением в корм холестерина и внутрибрюшинном введении мышам полоксамера 407 позволяет воссоздать экспериментальную модель метаболического синдрома и гиперлипидемии.

Изучение особенностей данной модели позволило выявить как изменение популяционного состава спленоцитов, так и нарушение продукции IL-15 и IL-22, а также липидного и углеводного обмена, что определяли по уровням адипонектина, лептина и инсулина. Выявленные изменения показательны для хронического воспаления, которое служит патогенетическим признаком метаболического синдрома.

Также с помощью данной модели удалось обнаружить характерные для проявления метаболического дисбиоза изменения микробиоты кишечника мышей.

Для коррекции указанных нарушений использовано комплексное лечебное средство, включающее в себя полипренилфосфат натрия и бета-ситостерин растительного происхождения. Применение данного лечебного средства способствовало как снижению признаков воспаления и нормализации липидного обмена, так и восстановлению состояния кишечной нормофлоры.

Полученные данные свидетельствуют о том, что данное комплексное средство может быть использовано для фармакокоррекции симптомокомплекса метаболического синдрома.

Список литературы / References

1. Макарова М.Н., Макаров В.Г. Диет-индуцированные модели метаболических нарушений, экспериментальный метаболический синдром // *Лабораторные животные для научных исследований*, 2018. № 1. С. 79-91. [Makarova M.N., Makarov V.G. Diet-induced models of metabolic disturbances. Report 2: experimental obesity. *Laboratornyye zivotnyye dlya nauchnykh issledovaniy = Laboratory Animals for Science*, 2018, no. 1, pp. 79-91. (In Russ.)]
2. Николаева Т.Н., Чекнёв С.Б., Кожевникова Т.Н., Вострова Е.И., Сосновская О.Ю., Сарычева М.А., Козлов В.В., Григорьева Е.А., Востров А.В., Санин А.В., Наровлянский А.Н., Пронин А.В. Сравнительная оценка состояния микробиоты кишечника, показателей липидного обмена и морфологических изменений печени на экспериментальных моделях метаболического синдрома // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*, 2023. № 217 (9). С. 117-124. [Nikolaeva T.N., Cheknev S.B., Kozhevnikova T.N., Vostrova E.I., Sosnovskaya O.Yu., Sarycheva M.A., Kozlov V.V., Grigorieva E.A., Vostrov A.V., Sanin A.V., Narovlyansky A.N., Pronin A.V. Microbiota state of the gastro-intestinal tract of laboratory animals with signs of metabolic dysbiosis during treatment with experimental medical drug. *Ekspериментalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2023, no. 217 (9), pp. 117-124. (In Russ.)]
3. Bekkering S., Domiguez-Andres J., Joosten L.A., Riksen N.P., Netea M.G. Trained Immunity in Health and Disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2021, Vol. 39, no. 1, pp. 667-693.
4. Chavakis T. Immunometabolism: Where Immunology and metabolism Meet. *J. Innate Immun.*, 2022, Vol. 14, pp. 1-3.
5. Ferreira A.V., Domiguez-Andres J., Netea M.G. The Role of Cell Metabolism in Innate Immune Memory. *J. Innate Immun.*, 2022, 14, pp. 42-50.

6. Johnston T.P. The P-407-induced murine model of dose-controlled hyperlipidemia and atherosclerosis: a review of findings to date. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2004, Vol. 43, no. 4, pp. 595-606.
7. Karlsson E.A., Sheridan P.A., Beck M.A. Diet-induced obesity in mice reduces the maintenance of influenza-specific CD8⁺ memory T cells. *J. Nutr.*, 2010, Vol. 140, pp. 1691-1697.
8. Lee Y.S., Olesfsky J. Chronic tissue inflammation and metabolic disease. *Genes Dev.*, 2021, Vol. 35, no. 5-6, pp. 307-328.
9. Magne F, Gotteland M., Gauthier L., Zazueta A., Pesoa S. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients. *Nutrients*, 2020, Vol. 12, no. 5, 1474. doi: 10.1530/JOE-20-0473.
10. Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Sanin A.V., Veselovsky V.V., Danilov L.L., Sedov A.M., Ershov F.I. Isoprenoids: Polyisoprenols and Polyisoprenyl Phosphates as Physiologically Important Metabolic Regulators. Nova Science Publishers, Inc, NY, USA, 2018.
11. Nobs S.P., Zmora N., Elinav E. Nutrition regulates innate immunity in health and disease. *Annu. Rev. Nutr.*, 2020, Vol. 40, pp. 189-219.
12. Pronin A.V., Danilov L.L., Narovlyansky A.N., Sanin A.V. Plant polyisoprenoids and control of cholesterol level. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2014, Vol. 62, no. 1, pp. 31-39.
13. Regnier M., van Hul M., Knauf C., Cani P.D. Gut microbiome, endocrine control of gut barrier function and metabolic diseases. *J. Endocrinol.*, 2021, Vol. 248, pp. R67-R82
14. Santos-Marcos J.A., Perez-Jimenez F. Camargo A. The role of diet and intestinal microbiota in the development of metabolic syndrome. *J. Nutr Biochem*, 2019, Vol. 70, pp. 1-27.

Авторы:

Пронин А.В. — д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Чекнев С.Б. — д.м.н., заместитель директора, заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Николаева Т.Н. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией естественного иммунитета ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Козлов В.В. — научный сотрудник лаборатории естественного иммунитета ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

Вострова Е.И. — научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Pronin A.V., PhD, MD (Biology), Professor, Deputy Director for Science, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Cheknev S.B., PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Science, Head, Laboratory of Cell to Cell Interactions, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Nikolaeva T.N., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Head, Laboratory of Natural Immunity, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Kozlov V.V., Research Associate, Laboratory of Natural Immunity, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Kozhevnikova T.N., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunity, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Vostrova E.I., Research Associate, Laboratory of Cell to Cell Interactions, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Григорьева Е.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории естественного иммунитета ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Сосновская О.Ю. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Сарычева М.А. — научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Востров Ф.В. — ведущий инженер лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

Санин А.В. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Grigorieva E.A., PhD, (Biology), Research Associate, Laboratory of Natural Immunity, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Sosnovskaya O.Yu., PhD, (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunity, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Sarycheva M.A., Research Associate, Laboratory of Cell to Cell Interactions, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Vostrov A.V., Leading Engineer, Laboratory of Cell to Cell Interactions, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Narovlyansky A.N., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Cytokines, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Sanin A.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Cellular Immunity, N. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.03.2024

Отправлена на доработку 05.04.2024

Принята к печати 22.04.2024

Received 29.03.2024

Revision received 05.04.2024

Accepted 22.04.2024

ВЛИЯНИЕ ПЕГИЛИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ФАГОЦИТАРНУЮ И ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА

**Бочкова М.С., Ракутина М.Н., Усанина Д.И., Тимганова В.П.,
Заморина С.А.**

*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. Научно-технический прогресс способствует открытию и производству инновационных материалов. Появление графена – яркий тому пример. Графен считается перспективным материалом для применения в нанобиомедицине и в нанобiotехнологиях, поэтому важно понимать, как он влияет на иммунные клетки человека.

Целью исследования было изучение эффектов 5 и 25 мкг/мл наночастиц оксида графена с латеральными размерами 100-200 нм и 1-5 мкм, модифицированных линейным и разветвленным полиэтиленгликолем, на функциональную активность нейтрофилов человека.

Образование активных форм кислорода исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа с использованием в качестве активатора хемилюминесценции люцигенина в микроварианте (96-луночный планшет) в течение 60 минут. Кроме того, исследовали эффект 60-минутной инкубации нейтрофилов с наночастицами пегилированного оксида графена на жизнеспособность этих клеток с окрашиванием их трипановым синим и 30-минутной инкубации – на поглощение нейтрофилами меченых флуоресцеином изоцианатом *E. coli* K-12 (лабораторный штамм). Пробы анализировали на проточном цитометре CytoFlex S. Определяли процент меченых флуоресцеином изоцианатом (поглотивших *E. coli*) нейтрофилов и индекс поглощения (медиана флуоресценции в гейте меченых флуоресцеином изотиоцианатом клеток, деленная на количество клеток в этом гейте). Образцы без добавления наночастиц служили контролем.

Было обнаружено снижение показателей люцигенин-усиленной хемилюминесценции нейтрофилов под влиянием двух типов наночастиц оксида графена: размером 1-5 мкм, покрытых линейным полиэтиленгликолем, и размером 100-200 нм, покрытых разветвленным полиэтиленгликолем, в концентрации 25 мкг/мл в стимулированном зимозаном варианте теста. Зависимости эффекта от разме-

Адрес для переписки:

Бочкова Мария Станиславовна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: krasnykh-m@mail.ru

Address for correspondence:

Mariya S. Bochkova
Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-77-94.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: krasnykh-m@mail.ru

Образец цитирования:

М.С. Бочкова, М.Н. Ракутина, Д.И. Усанина,
В.П. Тимганова, С.А. Заморина «Влияние
пегилированных наночастиц оксида графена на
фагоцитарную и окислительную активность
нейтрофилов человека» // Медицинская иммунология,
2024. Т. 26, № 5. С. 1071-1078.
doi: 10.15789/1563-0625-IOP-16732

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

For citation:

M.S. Bochkova, M.N. Rakutina, D.I. Usanina,
V.P. Timganova, S.A. Zamorina “Influence of pegylated
graphene oxide nanoparticles on the respiratory burst
and phagocytic activity of human neutrophils”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 5, pp. 1071-1078.
doi: 10.15789/1563-0625-IOP-16732

© Bochkova M.S. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IOP-16732

ра частиц и типа полиэтиленгликоля не обнаружено. Показатели спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов при добавлении наночастиц пегилированного оксида графена не изменялись.

Тридцатиминутная инкубация нейтрофилов человека при 37 °С с наночастицами пегилированного оксида графена с латеральными размерами 100–200 нм и 1–5 мкм не оказывала влияния на жизнеспособность этих клеток, а также на процент нейтрофилов, поглотивших *E. coli*. Однако модифицированный линейным полиэтиленгликолем оксид графена размером 1–5 мкм в концентрации 25 мкг/мл увеличивал количество поглощенных нейтрофилами *E. coli* из расчета на одну клетку.

Таким образом, при отсутствии цитотоксичности, частицы пегилированного оксида графена обладают разнонаправленными иммуномодулирующими эффектами на нейтрофилы. При этом важна именно их концентрация, а не размер частиц оксида графена и тип полиэтиленгликоля.

Ключевые слова: оксид графена, полиэтиленгликоль, люцигенин-зависимая хемилюминесценция, нейтрофилы, активные формы кислорода, фагоцитоз

INFLUENCE OF PEGYLATED GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON THE RESPIRATORY BURST AND PHAGOCYTTIC ACTIVITY OF HUMAN NEUTROPHILS

Bochkova M.S., Rakutina M.N., Usanina D.I., Timganova V.P., Zamorina S.A.

Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. Scientific and technological progress contributes to the discovery and production of innovative materials. The emergence of graphene is a clear example of this. Graphene is considered a promising material for use in nanobiomedicine and nanobiotechnology. It is therefore important to understand how it affects human immune cells. In a study, the effects of 5 and 25 µg/mL graphene oxide nanoparticles with lateral sizes of 100–200 nm and 1–5 µm, modified with linear and branched polyethylene glycol, on human neutrophils were investigated. The formation of reactive oxygen species was evaluated with a lucigenin as a chemiluminescence activator. In addition, we investigated the effect of a 60-minute incubation of neutrophils with pegylated graphene oxide nanoparticles on the viability of these cells by staining with trypan blue and a 30-minute incubation on the uptake of fluorescein isocyanate-labelled *E. coli*. The percentage of neutrophils which engulfed *E. coli* and the uptake index were determined. Samples without added nanoparticles served as controls.

A decrease in lucigenin-enhanced chemiluminescence of neutrophils was observed under the influence of two types of graphene oxide nanoparticles: 1–5 µm in size coated with linear polyethylene glycol, and 100–200 nm in size coated with branched polyethylene glycol, at a concentration of 25 µg/mL in the zymosan-stimulated version of the assay. No dependence of the effect on the particle size and the type of polyethylene glycol was observed. The indicators for spontaneous chemiluminescence of neutrophils did not change with the addition of PEGylated graphene oxide nanoparticles.

A thirty-minute incubation of human neutrophils at 37 °C with PEGylated graphene oxide nanoparticles with lateral dimensions of 100–200 nm and 1–5 µm had no effect on the viability of these cells and on the percentage of neutrophils that engulfed *E. coli*. However, 1–5 µm graphene oxide modified with linear polyethylene glycol at a concentration of 25 µg/mL increased the amount of *E. coli* engulfed by neutrophils per cell.

Thus, in the absence of cytotoxicity, PEGylated graphene oxide particles have multidirectional immunomodulatory effects on neutrophils. In this case, their concentration is decisive and not the size of the graphene oxide particles and the type of polyethylene glycol.

Keywords: graphene oxide, polyethyleneglycol, lucigenin-dependent chemiluminescence, neutrophils, reactive oxygen species, phagocytosis

Работа выполнена в рамках государственного задания №124021900006-5 с использованием оборудования ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

Введение

Графен — это двумерная структурная форма углерода, состоящая из одного атомного слоя. Благодаря своим структурным особенностям графен и его производные обладают рядом уникальных физических свойств, таких как высокая тепло- и электропроводность, механическая прочность и гибкость, способность к флуоресценции, и поэтому крайне перспективны для применения в биомедицинских исследованиях, например, в качестве наноносителя, компонента биосенсоров или подложки для тканевой инженерии [12].

В данной работе был использован оксид графена (GO), так как для него характерны: гидрофильность, высокая реакционная способность, возможность получения материала с заданным химическим составом [3]. Покрытие GO влияет на его поглощение клетками [6]. Модификация различными полимерами, в частности, полиэтиленгликолем (ПЭГ) позволяет существенно улучшить не только стабильность, но и биосовместимость GO [7]. Для функционализации наночастиц используют разные виды ПЭГ. Ранее Хи и коллеги [15] показали, что покрытие GO разветвленным ПЭГ обеспечивает лучшую коллоидную стабильность наночастиц по сравнению с линейным ПЭГ. Кроме того, «многорукие» молекулы на поверхности частицы увеличивают потенциал ее последующей функционализации. Размер наночастиц также является одним из факторов, критичным для их биосовместимости и определяющим, какие именно функции клетки они могут модулировать.

Нейтрофилы составляют примерно 50-70% от лейкоцитов крови человека и играют важную роль в защите хозяина от патогенов. При проникновении чужеродного объекта нейтрофилы немедленно мигрируют в участки инфекции.

Одним из основных способов уничтожения патогенов нейтрофилами является продукция активных форм кислорода (АФК), или их окислительная активность.

Ранее нами было изучено влияние GO и покрытого ПЭГ GO на люминол-зависимую хемилюминесценцию общей фракции лейкоцитов крови [1]. Люминол-зависимая хемилюминесценция отображает синтез всех АФК клетки, тогда как при помощи люцигенина можно детектировать, главным образом, супероксид-радикал, образование которого катализируется мембранной НАДФН-оксидазой (NOX) [14]. Поскольку супе-

роксид-радикал является «пусковым» анионом для синтеза вторичных АФК, а взаимодействие клеток с частицами определяется непосредственно мембраной, на которой и происходит сборка ферментативного комплекса NOX, представляется важным оценить именно люцигенин-зависимую хемилюминесценцию.

Известно, что нейтрофилы способны быстро поглощать частицы небиологической природы нано- и микрометрового размера, причем интенсивность поглощения зависит, в частности, от типа модификации поверхности частиц и от их размера [4]. Поэтому важно понимать, каким образом поглощение наночастиц GO разного размера и с разным типом поверхностной модификации может влиять на фагоцитоз биологических объектов.

Таким образом, целью данной работы стало определение влияния наночастиц GO с разными латеральными размерами и покрытых линейным и разветвленным ПЭГ на окислительную и фагоцитарную активность нейтрофилов человека.

Материалы и методы

Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на работу с образцами периферической крови было получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 30.08.2019. у всех пациентов было получено информированное согласие.

В работе использовали гепаринизированную кровь условно здоровых доноров ($n = 5$, возраст 24 ± 7 лет). Нейтрофилы выделяли центрифугированием в двойном градиенте плотности препаратов Histopaque® (Sigma-Aldrich, США): $\rho = 1,077$ г/см³ и $\rho = 1,119$ г/см³. Для этого разведенную раствором Хенкса в 2 раза кровь наслаивали на двойной градиент плотности Histopaque® и центрифугировали 40 минут при 400 g, 20 °С. Далее полученную суспензию нейтрофильных гранулоцитов дважды отмывали в растворе Хенкса (Биолот, Россия) по 15 минут при 350 g, 4°С. Супернатант сливали, затем нейтрофилы разводили в 1 мл раствора Хенкса, после этого подсчитывали количество клеток в камере Нейбауэра. Клетки использовали в концентрации 1×10^6 кл./мл.

В нашей работе мы использовали наночастицы GO двух латеральных размеров: 100-200 нм — GOs и 1-5 мкм — GOB (Ossila Ltd., Великобритания), покрытых линейным (P-) и восьмилучевым разветвленным (bP-) ПЭГ для того, чтобы сопоставить эффекты размера наночастиц и типа функционализации. Методика модификации наночастиц GO описана нами ранее в статье [11]. Частицы приобретены, модифицированы и оха-

рактированы в рамках выполнения проекта РФФИ № 19-15-00244.

Нейтрофилы инкубировали с bP/P-GO до достижения конечных концентраций наночастиц 5 и 25 мкг/мл в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), не содержащей фенолового красного, с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки в течение 60 минут в CO₂-инкубаторе (5% CO₂; +37 °C). По истечении 60 минут клетки окрашивали 1:1 с 0,4% трипановым синим и оценивали процент окрашенных (мертвых) клеток в камере Нейбауэра с помощью светового микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия).

Окислительную активность нейтрофилов человека, а именно образование супероксид-радикала (O²⁻) и активность NOX, определяли при помощи 96-луночного микроварианта теста люцигенин-усиленной хемилюминесценции (ЛюцХЛ). Стимуляцию окислительной активности нейтрофилов осуществляли опсонизированным зимозаном (O3) (Sigma-Aldrich, США), добавляя его к клеткам до конечной концентрации 1,5 мкг/мл. Люцигенин (синтезирован и любезно предоставлен д-ром Денисом Ларкиным, Москва, Россия) использовали в концентрации 5 мкМ. Также оценивали ЛюцХЛ в нестимулированном варианте теста, без добавления O3 к нейтрофилам.

Для оценки уровня ЛюцХЛ в лунки 96-луночного стерильного планшета для люминометра (Nunc, Дания) последовательно вносили раствор Хенкса, наночастицы GO, (контроль – спонтанная ЛюцХЛ), 10% пулированной инактивированной человеческой сыворотки, люцигенин, O3 и клеточную суспензию (10⁶ кл/мл). Интенсивность люминесценции измеряли в течение 60 минут с интервалом в 3 минуты на гибридном ридере “Synergy H1” (Bio Tek Instruments, США) при 37 °C. Оценивали изменение люминесценции в динамике, а также рассчитывали интегральный показатель: светосумму (S), характеризующую суммарный синтез АФК за 60 мин исследования и равную сумме всех значений интенсивности люминесценции для каждой пробы.

Эффект наночастиц P-GO на фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали при помощи проточной цитометрии. Объекты фагоцитоза готовили следующим образом: суспензию бактерий (лабораторный штамм *E. coli* K-12, любезно предоставлен к.б.н. И.Л. Масленниковой, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь) с концентрацией 1 × 10⁸ клеток/мл осаждали центрифугированием 10 000g 10 минут при 4 °C. Снимали супернатант, к осадку добавляли 2 мл 70% этилового спирта и ресуспендировали. Бактерии инкубировали при комнатной температуре 45 минут на ротаторе. После инактивации клетки отмывали центрифугирова-

нием 10 000 g 10 минут при 4 °C, раствором Дульбекко (ПанЭко, Россия). После чего к осадку добавляли 0,1 М карбонат-бикарбонатного буфера с добавлением флуоресцеина изоцианата (FITC, Sigma Aldrich, США) из расчета 50 мкг FITC на 100 000 клеток и инкубировали 60 минут в темноте на ротаторе при 37 °C. После этого проводили 4-кратную отмывку клеток от FITC центрифугированием в растворе Дульбекко (DPBS, Gibco, США) (10 минут, 4 °C, 10 000 g), хранили концентрированную суспензию FITC-*E. coli* в этом же растворе.

Выделенные нейтрофилы (2 × 10⁶ клеток/мл) в среде RPMI-1640 (Sigma Aldrich, США), не содержащей фенолового красного, с добавлением 10% эбриональной телячьей сыворотки смешивали в полипропиленовых пробирках с наночастицами P-GO до достижения конечных концентраций наночастиц 5 и 25 мкг/мл и инкубировали в течение 30 минут в термостате (+37 °C).

После 30-минутной инкубации нейтрофилов с P-GO в пробы добавляли FITC-*E. coli* (2 × 10⁷ клеток/мл) и инкубировали еще 30 минут при +37 °C. После этого все пробы одновременно погружали в лед на 10 минут для остановки фагоцитоза, однократно промывали 2 мл холодного фосфатно-солевого буфера без кальция и магния (DPBS, Gibco, США) с 0,5% БСА и 0,1% азида натрия при помощи центрифугирования 10 минут при 350 g и 4 °C. Затем пробы анализировали на проточном цитометре CytoFlex S (Beckman Coulter, США). Данные обрабатывали в программе CytExpert (Beckman Coulter, США). В каждом образце определяли процент FITC-позитивных (поглотивших FITC-*E. coli*) клеток в гейте нейтрофилов, предварительно выделенном на диаграмме светорассеяния (FSC/SSC). Индекс фагоцитоза определяли путем деления значения медианы флуоресценции гейта FITC⁺ клеток (линейный гейт, расположенный справа от пика аутофлуоресценции клеток в образце без *E. coli*), на количество клеток в нем (рис. 1). Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8 с использованием критерия Фридмана и критерия Данна для множественных сравнений. Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Различия считали значимыми при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Влияние наночастиц GO на жизнеспособность нейтрофилов оценивали через 60 минут совместного культивирования. Наночастицы не оказывали статистически значимого влияния на жизнеспособность нейтрофилов (табл. 1).

Таким образом, кратковременное воздействие наночастиц оксида графена, покрытых ПЭГ, в исследуемых концентрациях не оказывает токсического действия на нейтрофилы.

В научной литературе есть много данных, говорящих о наличии токсичности GO и редуцированного GO в отношении разных типов клеток [8]. Поскольку нейтрофилы являются короткоживущими фагоцитами, преобладающими в кровотоке, а способность этих клеток быстро нейтрализовать патогены и поглощать наночастицы разного происхождения может в ряде случаев сопровождаться их гибелью, например, с образованием внеклеточных нейтрофильных ловушек [10], при оценке безопасности наноматериалов в первую очередь необходимо уделять внимание этим клеткам. В случае с исследованными нами частицами пегилирование GO, как и в упомянутой нами ранее литературе, вероятно, привело к улучшению биосовместимости этого материала [7].

При исследовании влияния наночастиц GO разных размеров, покрытых разными типами полиэтиленгликоля, на поглощение бактерий, не было обнаружено статистически значимого

изменения процента фагоцитирующих клеток. Однако был выявлен стимулирующий эффект 25 мкг/мл P-GOb на индекс фагоцитоза, то есть на количество бактерий *E. coli*, поглощенных одним нейтрофилом (табл. 1).

К. Vabin и соавт. было показано, что наночастицы оксидов металлов (титана, цинка, церия) преимущественно в концентрациях 50, 100 и 150 мкг/мл усиливают фагоцитоз нейтрофилов за счет активации тирозинкиназы syk, что приводило к запуску фосфатидилинозитол-3-киназы, протеинкиназы C и других ферментов необходимых для полимеризации актина и ремоделирования мембраны, которые являются ключевыми факторами для поглощения частиц [2]. Возможно, и в нашем случае подобные механизмы лежат в основе повышения поглотительной активности нейтрофилов.

При исследовании влияния наночастиц P-GO на интенсивность спонтанной ЛюцХЛ, не было выявлено никаких эффектов (рис. 2А). Однако в стимулированном ОЗ варианте теста было отмечено снижение значений ЛюцХЛ на протяжении всей реакции (60 мин., данные не представлены) под влиянием наночастиц P-GOb, в concentra-

ТАБЛИЦА 1. ЭФФЕКТ НАНОЧАСТИЦ ПЕГИЛИРОВАННОГО GO НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И ПОКАЗАТЕЛИ НЕЙТРОФИЛЬНОГО ФАГОЦИТОЗА, n = 5; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. EFFECT OF PEGYLATED GO NANOPARTICLES ON NEUTROPHIL VIABILITY AND INDICATORS OF NEUTROPHIL PHAGOCYTOSIS, n = 5; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Контроль Control	P-GOs	bP-GOs	P-GOb	bP-GOb	
		5 мкг/мл 5 µg/mL				
% живых нейтрофилов % of viable neutrophils	99 (98,25-99,75)	98,5 (98-99)	99 (97,5-99,75)	99 (97,25-100)	99,5 (98,25-100)	
% фагоцитоза % of phagocytosis	58,37 (57,46-61,57)	62,02 (57,15-62,27)	60,74 (56,90-62,53)	63,77 (56,32-65,69)	62,53 (58,22-66,17)	
Индекс фагоцитоза Index of phagocytosis	75,75 (45,98-87,69)	63,06 (38,97-80,98)	58,47 (31,56-80,38)	76,77 (50,93-101,6)	74,26 (51,17-88,42)	
	Контроль Control	25 мкг/мл 25 µg/mL				
% живых нейтрофилов % of viable neutrophils	99 (98,25-99,75)	97,5 (92,5-98)	97,5 (96,25-98,75)	99,5 (98,25-100)	99 (98,25-99,75)	
% фагоцитоза % of phagocytosis	58,37 (57,46-61,57)	57,65 (56,59-60,13)	59,87 (56,25-62,54)	59,75 (55,57-61,19)	61,93 (58,34-71,92)	
Индекс фагоцитоза Index of phagocytosis	75,75 (45,98-87,69)	85,33 (48,75-97,72)	73,40 (49,68-89,34)	86,21 (57,39-95,66) p = 0,0311	60,49 (34,02-102,0)	

Примечание. Значение p указано только для p < 0,05.

Note. p value is only reported for p < 0.05.

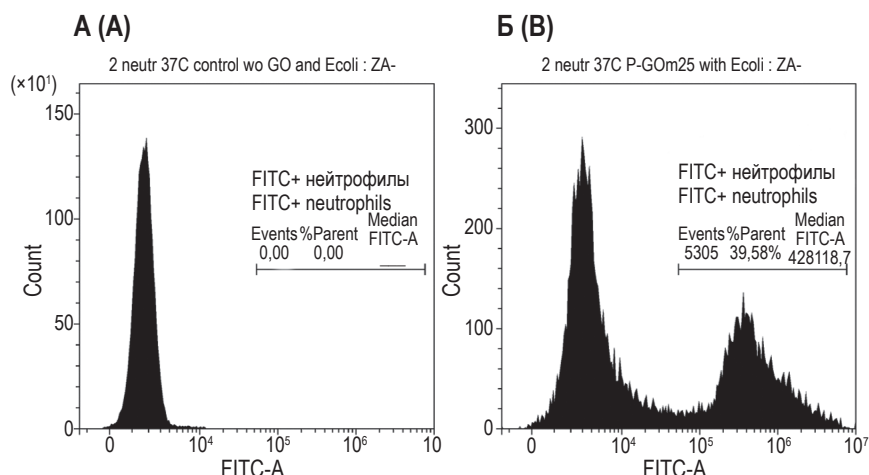


Рисунок 1. Гейтирование нейтрофилов, поглотивших FITC – *E. coli*

Примечание. А – контроль без FITC – *E. coli* и наночастиц GO. Б – проба с 25 мкг/мл P-GOs и FITC – *E. coli*. Над линейным гейтом приведены количество FITC⁺ событий (Events), процент фагоцитирующих FITC⁺ нейтрофилов (% Parent) и медиана флуоресценции гейта FITC⁺ нейтрофилов (Median FITC-A).

Figure 1. Gating of neutrophils that have engulfed FITC – *E. coli*

Note. A, control without FITC – *E. coli* and GO nanoparticles. B, sample with 25 µg/mL P-GOs and FITC – *E. coli*. The number of FITC⁺ events, the percentage of phagocytising FITC⁺ neutrophils (% Parent) and the median fluorescence of the FITC⁺ neutrophil gate (Median FITC-A) are shown above the linear gate.

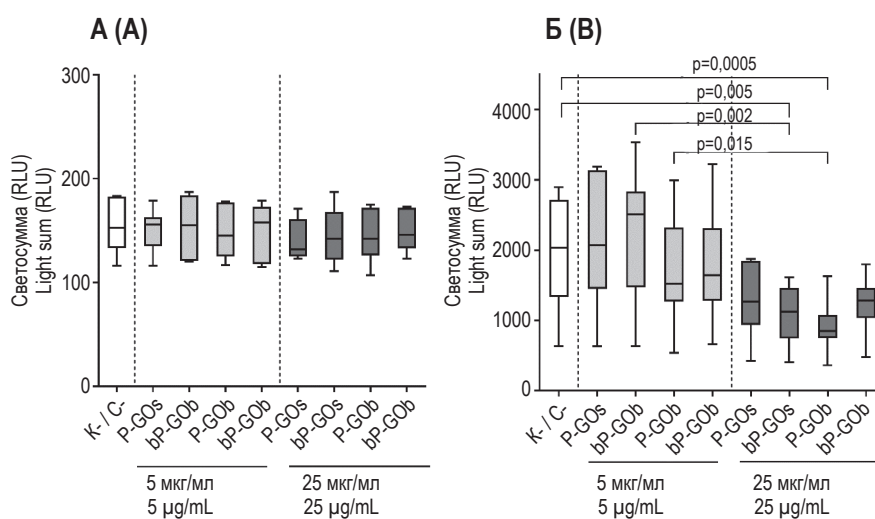


Рисунок 2. Влияние наночастиц P-GO/bP-GO с разными латеральными размерами на люцигенин-зависимую хемилюминесценцию в спонтанном (А) и стимулированном (Б) вариантах теста (n = 5, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), min и max)

Примечание. По оси x – разные концентрации наночастиц, по оси y – значение светосуммы в относительных световых единицах. К- – контроль без GO.

Figure 2. Effect of P-GO/bP-GO nanoparticles with different lateral sizes on lucigenin-dependent chemiluminescence in spontaneous (A) and stimulated (B) versions of the assay (n = 5, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), min и max)

Note: Along the x-axis, different concentrations of nanoparticles; along the y-axis, the value of the light sum in relative light units. K-, control without GO.

ции 25 мкг/мл, выразившееся и в снижении интегрального показателя ЛюцХЛ светосуммы. Как мы видим на графике, этот эффект был статистически значимым не только по отношению к контролю, но и по отношению к низкой концентрации этих же частиц (рис. 2Б).

Интересно, что аналогичные результаты выявлены и с «мелкими» наночастицами, покрытыми другим типом ПЭГ (bP-GOs) в той же концентрации (рис. 2Б). Статистически значимое снижение продукции супероксид-радикала наблюдалось и в пробах с двумя оставшимися типами частиц в

концентрации 25 мкг/мл, но только в отдельные временные точки снятия результатов (данные не представлены), что не выразилось в достоверном снижении значения светосуммы, однако и в этих пробах наблюдалась тенденция к снижению данного показателя (рис. 2Б).

Таким образом, нами не выявлено зависимости эффекта угнетения синтеза супероксид-радикала наночастиц от их размера и типа пришитого ПЭГ, но ясно видна его корреляция с концентрацией GO.

Углеродные наноматериалы обладают антиоксидантной активностью и могут использоваться в защите клеток, подвергшихся сильному окислительному стрессу. Оксид графена не является исключением. Например, в статье Qui et al. [13], приведены данные о высокой антиоксидантной активности GO в концентрации 10 мкг/мл и менее в отношении гидроксид-радикала, а также о его способности нейтрализовать супероксид-анион (в концентрации около 80 мкг/мл). Помимо этого, есть сведения, что антиоксидантная способность GO может быть усилена химическим восстановлением [5]. Кроме того, и покрывающий наночастицы полиэтиленгликоль может дополнять описанные свойства GO. В статье Karla Juarez-Moreno показано, что ПЭГ способен снижать продукцию гидроксильных радикалов [9].

В наших предыдущих исследованиях мы показали аналогичное снижение люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов под действием высоких концентраций немодифицированных и модифицированных линейным ПЭГ наночастиц GO размером 1-5 мкм [1]. Вновь полученные результаты подтвердили антиоксидантную активность P-GO и в отношении супероксид-радикала. Вероятно, антиоксидантные свойства P-GO могут найти применение в биомедицине, но нужно понимать, что в случае с нейтрофилами угнетение АФК-опосредованной бактерицидности может привести к негативным последствиям.

Заключение

Таким образом, наночастицы пегилированного оксида графена разных латеральных размеров, не оказывая токсического действия на нейтрофилы, способны разнонаправленно модулировать такие функции нейтрофилов как фагоцитоз и окислительная активность. При этом эффекты не зависят от размера наночастиц GO и типа ПЭГ. Решающим фактором является их концентрация.

Концентрация 5 мкг/мл всех четырех типов исследованных наночастиц P-GO не влияла на функциональную активность нейтрофилов человека и поэтому может считаться безопасной для применения в биомедицине.

Список литературы / References

1. Бочкова М.С., Тимганова В.П., Храпцов П.В., Ужвиюк С.В., Шардина К.Ю., Нечаев А.И., Раев М.Б., Заморина С.А. Изучение влияния наночастиц оксида графена на люминол-зависимую хемилюминесценцию лейкоцитов человека // Медицинская иммунология, 2020, Т. 22. № 5. С. 977-986. Bochkova M.S., Timganova V.P., Khramtsov P.V., Uzhviyuk S.V., Shardina K.Yu., Nechaev A.I., Raev M.B., Zamorina S.A. Study of the graphene oxide nanoparticles effect on luminol-dependent chemiluminescence of human leukocytes. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 977-986. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-SOT-2051.
2. Babin K., Goncalves D.M., Girard, D. Nanoparticles enhance the ability of human neutrophils to exert phagocytosis by a Syk-dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, Vol. 1850, pp. 2276-2282.
3. Bellier N., Baipaywad P., Ryu N., Lee J.Y., Park H. Recent biomedical advancements in graphene oxide- and reduced graphene oxide-based nanocomposite nanocarriers. *Biomater. Res.*, 2022, Vol. 26, 65. doi: 10.1186/s40824-022-00313-2.
4. Bisso P.W., Gaglione S., Guimarães P.P.G., Mitchell M.J., Langer R. Nanomaterial Interactions with Human Neutrophils. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2018, Vol. 4, no. 12, pp. 4255-4265.
5. Choe G., Kim S., Park J., Park J., Kim S., Kim Y.S., Lee J.Y. Anti-oxidant activity reinforced reduced graphene oxide/alginate microgels: Mesenchymal stem cell encapsulation and regeneration of infarcted hearts. *Biomaterials*, 2019, 119513. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119513.
6. Feng R., Yu F., Xu J., Hu X. Knowledge gaps in immune response and immunotherapy involving nanomaterials: Databases and artificial intelligence for material design. *Biomaterials*, 2021, Vol. 266, 120469. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120469.
7. Ghosh S., Chatterjee K. Poly (Ethylene glycol) functionalized graphene oxide in tissue engineering: A review on recent advances. *Int. J. Nanomed.*, 2020, Vol. 15, pp. 5991-6006.
8. Ghulam A.N., dos Santos O.A.L., Hazeem L., Pizzorno Backx B., Bououdina M., Bellucci S. Graphene Oxide (GO) Materials-Applications and Toxicity on Living Organisms and Environment. *J. Funct. Biomater.*, 2022, Vol. 13, no. 2, 77. doi: 10.3390/jfb13020077.

9. Juarez-Moreno K., Ayala M., Vazquez-Duhalt R. Antioxidant Capacity of Poly(Ethylene Glycol) (PEG) as Protection Mechanism Against Hydrogen Peroxide Inactivation of Peroxidases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, Vol. 177, no. 6, pp. 1364-1373.
10. Keshavan S., Calligari P., Stella L., Fusco L., Delogu L.G., Fadeel B. Nano-bio interactions: a neutrophil-centric view. *Cell Death Dis.*, 2019, Vol. 10, 569. doi: 10.1038/s41419-019-1806-8.
11. Khramtsov P., Bochkova M., Timganova V., Nechaev A., Uzhviyuk S., Shardina K., Maslennikova I., Rayev M., Zamorina S. Interaction of Graphene Oxide Modified with Linear and Branched PEG with Monocytes Isolated from Human Blood. *Nanomaterials*, 2022, Vol. 12, no. 1, 126. doi: 10.3390/nano12010126.
12. Malisz K., Świeczko-Żurek B. Graphene Production and Biomedical Applications: A Review. *Crystals*, 2023, Vol. 13, 1413. doi: 10.3390/cryst13101413.
13. Qiu Y., Wang Z., Owens A.C., Kulaots I., Chen Y., Kane A.B., Hurt R.H. Antioxidant Chemistry of Graphene-Based Materials and its Role in Oxidation Protection Technology. *Nanoscale*, 2014, Vol. 6, no. 20, pp. 11744-11755.
14. Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. Methods of estimation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 4, pp. 327-340. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340.
15. Xu Z., Wang S., Li Y., Wang M., Shi P., Huang X. Covalent Functionalization of Graphene Oxide with Biocompatible Poly(ethylene glycol) for Delivery of Paclitaxel. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, Vol. 6, pp. 17268-17276.

Авторы:

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Ракутина М.Н. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Усанина Д.И. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Тимганова В.П. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Заморина С.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Authors:

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Rakutina M.N., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Usanina D.I., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Timganova V.P., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Zamorina S.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 29.03.2024

Отправлена на доработку 31.03.2024

Принята к печати 26.04.2024

Received 29.03.2024

Revision received 31.03.2024

Accepted 26.04.2024

ВЛИЯНИЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ С ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ОКСАЛИПЛАТИНА *IN VITRO*

**Пашкина Е.А.^{1,2}, Быкова М.В.¹, Беришвили М.Т.², Чжан И.М.³,
Козлов В.А.¹**

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

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Новосибирск, Россия

³ Нанькайский университет, Тяньцзинь, Китай

Резюме. Одним из современных подходов к терапии онкозаболеваний является создание систем адресной доставки противоопухолевых препаратов, что позволяет увеличить концентрацию доставляемого вещества в нужном месте и препятствовать его накоплению в здоровых органах и тканях. При этом можно также ожидать повышения продолжительности и эффективности действия препаратов, а также снизить побочные эффекты при проведении терапии. Рецептор гиалуроновой кислоты CD44, который, согласно литературным данным, высоко экспрессируется при многих видах опухолей и регулирует метастазирование, является перспективной мишенью для осуществления адресной доставки противоопухолевых препаратов. Целью данного исследования была оценка влияния супрамолекулярной системы доставки на основе гиалуроновой кислоты с наноразмерным кавитантом циклодекстрином на противоопухолевые свойства оксалиплатина *in vitro*. В качестве опухолевых клеток были использованы клеточные линии 1301, SK-MEL-28 и B16. Клетки культивировались в присутствии системы доставки на основе гиалуроновой кислоты (HACD), оксалиплатина (OX) и их комплекса (HACD-OX) в различных концентрациях в полной культуральной среде RPMI-1640, содержащей 0,3% L-глутамин, 4% гентамицина и 10% инактивированной сыворотки FBS в течение 48 часов во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С. Оценка влияния исследуемых соединений на жизнеспособность клеточных культур проводилась с помощью WST-теста. Было показано, что в случае клеточной линии Т-клеточной лимфомы 1301 система доставки HACD не влияла на способность OX снижать жизнеспособность опухолевых клеток данной линии, действие свободного оксалиплатина

Адрес для переписки:

Пашкина Екатерина Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

Address for correspondence:

Ekaterina A. Pashkina
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 227-01-35.
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Пашкина, М.В. Быкова, М.Т. Беришвили,
И.М. Чжан, В.А. Козлов «Влияние супрамолекулярной
системы доставки на основе гиалуроновой кислоты
с циклодекстрином на противоопухолевые свойства
оксалиплатина *in vitro*» // Медицинская иммунология,
2024. Т. 26, № 5. С. 1079-1084.
doi: 10.15789/1563-0625-EOA-16814

© Пашкина Е.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Pashkina, M.V. Bykova, M.T. Berishvili, Y.M. Zhang,
V.A. Kozlov "Effect of a supramolecular delivery system
based on hyaluronic acid with cyclodextrin on the antitumor
properties of oxaliplatin *in vitro*", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5,
pp. 1079-1084.
doi: 10.15789/1563-0625-EOA-16814

© Pashkina E.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EOA-16814

и комплекса было сопоставимым. Однако в случае клеток меланомы (B16 и SK-MEL-28) комплекс HACD-DOX оказывает более выраженное противоопухолевое действие, вызывая статистически значимое снижение жизнеспособности клеток линии B16 и SK-MEL-28 по сравнению со свободным оксалиплатином. Таким образом, система доставки на основе гиалуроновой кислоты и циклодекстрина способна усиливать *in vitro* противоопухолевое действие оксалиплатина.

Ключевые слова: адресная доставка, гиалуроновая кислота, циклодекстрин, CD44, противоопухолевые свойства, оксалиплатин

EFFECT OF A SUPRAMOLECULAR DELIVERY SYSTEM BASED ON HYALURONIC ACID WITH CYCLODEXTRIN ON THE ANTITUMOR PROPERTIES OF OXALIPLATIN *IN VITRO*

Pashkina E.A.^{a, b}, Bykova M.V.^a, Berishvili M.T.^b, Zhang Y.M.^c, Kozlov V.A.^a

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

^b Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^c Nankai University, Tianjin, China

Abstract. One of the modern approaches to the treatment of cancer is the creation of targeted delivery systems for anticancer drugs, which allows increasing the concentration of the delivered substance in the right place and preventing its accumulation in healthy organs and tissues. At the same time, one can also expect an increase in the duration and effectiveness of the drugs, as well as a reduction in side effects during therapy. The hyaluronic acid receptor CD44, which, according to the literature, is highly expressed in many types of tumors and regulates metastasis, is a promising target for targeted delivery of anticancer drugs. The purpose of this study was to evaluate the effect of a supramolecular delivery system based on hyaluronic acid with nanosized cavitand cyclodextrin on the antitumor properties of oxaliplatin *in vitro*. Cell lines 1301, SK-MEL-28 and B16 were used as tumor cells. Cells were cultured in the presence of a delivery system based on hyaluronic acid (HACD), oxaliplatin (OX), and their complex (HACD-OX) at various concentrations in complete culture medium RPMI-1640 containing 0.3% L-glutamine, 4% gentamicin and 10% inactivated FBS serum for 48 hours in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. The effect of the studied compounds on the viability of cell cultures was assessed using the WST test. It was shown that in the case of the T-cell lymphoma cell line 1301, the HACD delivery system did not affect the ability of OX to reduce the viability of tumor cells of this line; the effect of free oxaliplatin and the complex was comparable. However, in the case of melanoma cells (B16 and SK-MEL-28), the HACD-DOX complex has a more pronounced antitumor effect, causing a statistically significant decrease in the viability of B16 and SK-MEL-28 cells compared to free oxaliplatin.

Keywords: targeted delivery, hyaluronic acid, cyclodextrin, CD44, antitumor properties, oxaliplatin

Выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта РНФ № 23-25-00375.

Введение

Одним из современных и активно развивающихся направлений на стыке химии, фармакологии и онкологии является так называемая супрамолекулярная химиотерапия, основанная на возможности формирования комплексов по типу «гость-хозяин» [2, 3, 8, 13]. Макроцикли-

ческие соединения, такие как кукурбитурилы, циклодекстрины, каликсарены и пр., являются идеальными платформами для построения химиотерапевтических платформ посредством супрамолекулярных взаимодействий, поскольку они содержат полости контролируемого размера, в которые могут проникать молекулы-«гости» [1, 11]. Супрамолекулярная химиотерапия, объединяющая нековалентные взаимодействия и традиционную химиотерапию, продемонстрировала ряд преимуществ, к примеру возможность повы-

шать растворимость и стабильность препаратов, снизить побочные эффекты, а также может быть использована для адресной доставки лекарств.

Как известно, суть адресной доставки состоит в том, что само лекарственное вещество, а чаще средство его доставки (вектор, контейнер) модифицируются молекулами, узнающими структуры на клетках-мишенях. В случае супрамолекулярных систем доставки в качестве лиганда может служить гиалуроновая кислота, участвующая в построении молекулярного каркаса данной системы [7, 9]. Гиалуроновая кислота способна связываться с различными рецепторами на поверхности клетки, в частности CD44, экспрессирующимся на высоком уровне на стволовых и опухолевых клетках. CD44 участвует в развитии и прогрессировании гематологических неоплазий за счет усиления апоптотической резистентности, инвазивности, а также регуляции хоуминга костного мозга и мобилизации иницирующих лейкемию клеток в периферическую кровь [5]. Повышенный уровень экспрессии CD44 может служить маркером худшего прогноза при большинстве злокачественных новообразований.

Комбинация гиалуроновой кислоты и макроциклов может не только поддерживать способность гиалуроновой кислоты нацеливаться на определенную мишень, но также наделять супрамолекулярную систему способностью доставлять химиотерапевтические препараты посредством множественных взаимодействий «гость-хозяин». Известно также и о иных системах доставки на основе гиалуроновой кислоты, в том числе в виде наночастиц и наногелей [4, 6]. Кроме того, конъюгат гиалуроновой кислоты и паклитаксела (Oncofid-P) в данный момент проходит III фазу клинических испытаний в качестве препарата для терапии злокачественной мезотелиомы.

Материалы и методы

Супрамолекулярная система доставки на основе циклодекстрина (CD) и гиалуроновой кислоты (HA) была любезно предоставлена сотрудником Химического колледжа Нанькайского университета профессором Ин-Мин Чжаном (Тяньцзин, Китай). Синтез, очистка и оценка физико-химических свойств данной системы доставки (HACD) осуществлялись аналогично протоколу, описанному ранее при использовании данной системы доставки для адиплатина [10]. Оксалиплатин (OX) использовали в концентрациях 40, 10, 2 и 0,5 мкг/мл. HACD добавляли к OX в пропорции 10:1.

Линия клеток 1301 Т-клеточного лейкоза человека была приобретена из Европейской

коллекции аутентифицированных клеточных культур, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Германия. Клетки меланомы линии B16 (меланома мыши) и SK-MEL-28 (меланома человека) были любезно предоставлены д.м.н., проф. С.В. Сенниковым (лаборатория молекулярной иммунологии НИИФКИ, г. Новосибирск, Россия).

Клетки культивировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂, культивировали в 96- либо 48-луночных планшетах в питательной среде RPMI-1640, содержащей 0,3% L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина, 25 мкг/мл тиенама и 10% инактивированной сыворотки FCS, в присутствии исследуемых соединений в течение 48 часов. Культивирование клеток проводили в присутствии в разных концентрациях оксалиплатина (OX), HACD и HACD-OX. Необработанные клетки использовали в качестве контроля. В качестве дополнительного контроля использовался 10%-ный DMSO, вызывающий в культуре гибель клеток в данной концентрации.

Оценку жизнеспособности клеточных культур *in vitro* проводили с помощью WST-теста: через 48 часов после культивирования, при этом к пробам добавляли по 10 мкл WST-1 и культивировали в CO₂-инкубаторе еще в течение 4 часов. После жизнеспособность оценивали в соответствии с протоколом производителя по количеству полученного формазанового красителя путем измерения оптической плотности спектрофотометрически на мультимодальном планшетном ридере LB 941 TriStar фирмы Berthold Technologies (Германия) на длине волны 450 нм, при этом измерение на длине волны 620 нм использовалось в качестве референса.

Все экспериментальные данные выражались в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего (SEM) или медианы с межквартильным размахом в случае непараметрического распределения данных. Анализ проводился с помощью GraphPad Prism 9.3.1 с использованием OnewayANOVA для параметрических выборок либо теста Фридмана с применением теста Данна в случае непараметрических выборок для множественных сравнений. Значение $p < 0,05$ считалось минимальным критерием для статистической значимости.

Результаты и обсуждение

При оценке влияния OX в свободной форме и в виде комплекса HACD-OX на жизнеспособность опухолевых клеток линии 1301 было показано, что комплекс и свободный препарат приводили к снижению жизнеспособности клеток данной линии, достоверных различий между

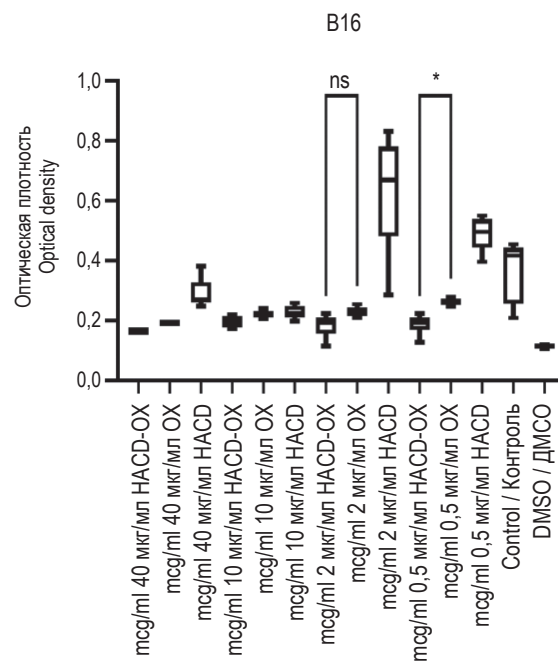
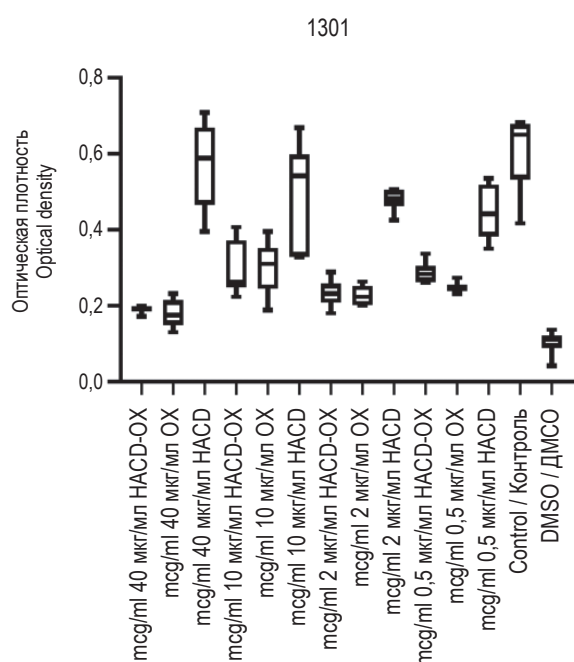


Рисунок 1. Оценка жизнеспособности клеток линии 1301 при сокультивировании с нагруженной оксалиплатином супрамолекулярной системой доставки на основе гиалуроновой кислоты

Примечание. Данные представлены в виде графиков «ящик с усами»: границы ящиков соответствуют 25-му и 75-му процентилю, горизонтальная линия соответствует медиане, усы простираются от максимума до минимума.

Figure 1. Assessment of the viability of 1301 cells when co-cultured with an oxaliplatin-loaded supramolecular hyaluronic acid-based delivery system

Note. Data are presented as box-and-whisker plots: box boundaries represent the 25th and 75th percentiles, the horizontal line represents the median, and the whiskers extend from maximum to minimum.

действием OX и HADC-OX, содержащего эквивалентное количество оксалиплатина, обнаружено не было (рис. 1).

Следующим этапом нами проводилась оценка комплекса HADC-OX и свободного оксалиплатина на жизнеспособность клеток меланомы (меланомы человека SK-MEL-28 и мышинной меланомы B16). HADC-OX и OX приводили к снижению жизнеспособности клеток линии SK-MEL-28 (рис. 2), при этом в концентрации оксалиплатина 10 мкг/мл препарат в комплексе оказывал более выраженный эффект по сравнению со свободным препаратом. В остальных исследуемых концентрациях достоверных различий между OX и HADC-OX не было показано.

В случае клеток меланомы мыши B16 (рис. 3) было показано, что комплекс HADC-OX силь-

Рисунок 2. Оценка жизнеспособности клеток линии B16 при сокультивировании с нагруженной оксалиплатином супрамолекулярной системой доставки на основе гиалуроновой кислоты

Примечание. Данные представлены в виде графиков «ящик с усами»: границы ящиков соответствуют 25-му и 75-му процентилю, горизонтальная линия соответствует медиане, усы простираются от максимума до минимума. * указывает на статистически значимые различия ($p < 0,05$), ns указывает на отсутствие статистически значимых различий.

Figure 2. Assessing the viability of B16 cells when co-cultured with an oxaliplatin-loaded hyaluronic acid-based supramolecular delivery system

Note. Data are presented as box-and-whisker plots: box boundaries represent the 25th and 75th percentiles, the horizontal line represents the median, and the whiskers extend from maximum to minimum. * indicates statistically significant differences ($p < 0.05$), ns indicates no statistically significant differences.

нее подавляет жизнеспособность опухолевых клеток по сравнению со свободным OX в самой низкой концентрации 0,5 мкг/мл, в остальных концентрациях OX и HADC-OX одинаково снижают жизнеспособность данных клеток. Таким образом, было продемонстрировано, что HADC не снижает способность OX подавлять жизнеспособность опухолевых клеток. При этом в случае меланомы HADC-OX оказывал более выраженное противоопухолевое действие, достоверно сильнее снижая жизнеспособность клеток.

Схожий подход с использованием систем доставки использовала другая группа авторов, взяв-

шая за основу наночастицы, нагруженные доксорубицином (DOX) [12]. Поверхность частиц была модифицирована гиалуроновой кислотой для осуществления адресной доставки. Было показано, что доксорубин, инкапсулированный в наночастицы гиалуроновой кислоты, поперечно сшитые с липоевой кислотой (LACHA-DOX), опосредовал высокоэффективное и целенаправленное ингибирование опуховых клеток человека, включая множественную миелому человека LP-1 и острый миелоидный лейкоз человека AML-2, при ксенотрансплантации клеток в организм мышей линии nude. Следовательно, подобные результаты говорят об эффективности действия систем доставки на основе гиалуроновой кислоты с противоопухолевыми препаратами.

Выводы

Нами была проведена оценка супрамолекулярной системы доставки, нагруженной оксалиплатином, на трех различных опухолевых линиях – 1301, B16 и SK-MEL. Было показано, что HACD-DOX оказывает более выраженное противоопухолевое действие, подавляя жизнеспособность клеток меланомы (B16 и SK-MEL) по сравнению со свободным оксалиплатином. Таким образом, система доставки на основе гиалуроновой кислоты и циклодекстрина усиливает противоопухолевое действие оксалиплатина.

Список литературы / References

1. Appel E.A., Barrio J.D., Loh X.J., Scherman O.A. Supramolecular polymeric hydrogels. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, Vol. 41, pp. 6195-6214.
2. Chen Y., Jing L., Meng Q., Li B., Chen R., Sun Z. Supramolecular chemotherapy: noncovalent bond synergy of cucurbit[7]uril against human colorectal tumor Cells. *Langmuir*, 2021, Vol. 37, no. 31, pp. 9547-955.
3. Chen Y., Sun Z. Supramolecular chemotherapy based on the host-guest complex of lobaplatin-cucurbit[7]uril. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2020, Vol. 3, no. 4, pp. 2449-2454.
4. Choi K.Y., Saravanakumar G., Park J.H., Park K. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: interfacial interactions with proteins in cancer. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2012, Vol. 99, pp. 82-94.
5. Hertweck M.K., Erdfelder F., Kreuzer K.A. CD44 in hematological neoplasias. *Ann. Hematol.*, 2011, Vol. 90, no. 5, pp. 493-508.
6. Salari N., Mansouri K., Valipour E., Abam F., Jaymand M., Rasoulpoor S., Dokaneheifard S., Mohammadi M. Hyaluronic acid-based drug nanocarriers as a novel drug delivery system for cancer chemotherapy: A systematic review. *Daru*, 2021, Vol. 2, pp. 439-447.
7. Singh P., Chen Y., Tyagi D., Wu L., Ren X., Feng J., Carrier A., Luan T., Tang Y., Zhang J., Zhang X. β -Cyclodextrin-grafted hyaluronic acid as a supramolecular polysaccharide carrier for cell-targeted drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 2021, Vol. 602, 120602. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120602.
8. Wang, J., Wang, D., Cen, M., Jing D., Bei J., Huang Y., Zhang J., Lu B., Wang Y., Yao Y. GOx-assisted synthesis of pillar[5]arene based supramolecular polymeric nanoparticles for targeted/synergistic chemo-chemodynamic cancer therapy. *J. Nanobiotechnol.*, 2022, Vol. 20, 33. doi: 10.1186/s12951-021-01237-0.
9. Xiong Q., Cui M., Bai Y., Liu Y., Liu D., Song T. A supramolecular nanoparticle system based on β -cyclodextrin-conjugated poly-l-lysine and hyaluronic acid for co-delivery of gene and chemotherapy agent targeting hepatocellular carcinoma. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2017, Vol. 155, pp. 93-103.

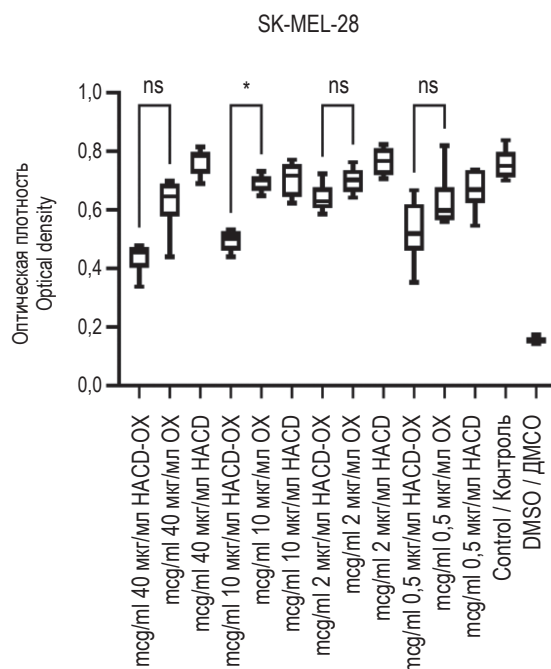


Рисунок 3. Оценка жизнеспособности клеток линии SK-MEL-28 при сокультивировании с нагруженной оксалиплатином супрамолекулярной системой доставки на основе гиалуроновой кислоты

Примечание. См. примечание к рисунку 2.

Figure 3. Assessment of the viability of SK-MEL-28 cells when co-cultured with an oxaliplatin-loaded supramolecular delivery system based on hyaluronic acid

Note. As for Figure 2.

10. Yang Y., Zhang Y.M., Chen Y., Chen J.T., Liu Y. Targeted polysaccharide nanoparticle for adamplatin prodrug delivery. *J. Med. Chem.*, 2013, Vol. 56, no. 23, pp. 9725-9736.
11. Yu G., Jie K., Huang F. Supramolecular amphiphiles based on host-guest molecular recognition motifs. *Chem. Rev.*, 2015, Vol. 115, no. 15, pp.7240-7303.
12. Zhong Y., Meng F., Deng C., Mao X., Zhong Z. Targeted inhibition of human hematological cancers in vivo by doxorubicin encapsulated in smart lipolic acid-crosslinked hyaluronic acid nanoparticles. *Drug Deliv.*, 2017, Vol. 24, no. 1, pp. 1482-1490.
13. Zhou J., Yu G., Huang F. Supramolecular chemotherapy based on host-guest molecular recognition: a novel strategy in the battle against cancer with a bright future. *Chem. Soc. Rev.*, 2017, Vol. 46, pp. 7021-7053.

Авторы:

Пашкина Е.А. — заведующая внебюджетной лабораторией регуляции иммунного ответа ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; доцент кафедры клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Быкова М.В. — лаборант-исследователь лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Бершвили М.Т. — студентка ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Чжан И.М. — PhD, профессор, кафедра химии, Нанькайский университет, Тяньцзинь, Китай

Козлов В.А. — д.м.н., академик РАН, профессор, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Pashkina E.A., Head, Extra-Budgetary Laboratory for Regulation of the Immune Eesponse, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Bykova M.V., Research Assistant, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Berishvili M.T., Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Zhang Y.M., PhD, Professor, Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin, China

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Scientific Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 31.03.2024
Отправлена на доработку 08.04.2024
Принята к печати 10.04.2024

Received 31.03.2024
Revision received 08.04.2024
Accepted 10.04.2024

НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ ВЛИЯНИЙ ЦИТОКИНОВ IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ НА АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩУЮ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ СУБПОПУЛЯЦИЮ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ГЕМАТОГЕННЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

Чудилова Г.А.¹, Нестерова И.В.^{1,2}, Тетерин Ю.В.¹, Мелконян К.И.¹, Атажахова М.Г.¹, Чапурина В.Н.¹, Чичерев Е.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Резюме. Дисфункции иммунной системы, в первую очередь нейтрофильных гранулоцитов (НГ), являются причиной возникновения и прогрессирования очага инфекции в костной ткани, костном мозге при остром гематогенном остеомиелите (ОГО). При колонизации кости *S. aureus* остеобласты, остеоциты и макрофаги секретируют хемоаттрактанты и цитокины, инициирующие приток к месту инфекции большого количества НГ, которые в свою очередь секретируют цитокины, создавая воспалительную микросреду, способствующую образованию остеокластов резорбирующих кость. Известно, что цитокин-активируемые НГ претерпевают функциональные и фенотипические изменения. В этой связи интерес представляет выявление цитокинов, приводящих к трансформации фенотипа НГ в антигенпрезентирующие клетки (АПК) при ОГО. Цель исследования – определить уровни нейтрофил-ассоциированных сывороточных цитокинов IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ и их взаимосвязь с количественными и фенотипическими характеристиками субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ НГ при местночаговой и септико-пиемической формах ОГО у детей.

Исследованы 28 детей 8-15 лет с ОГО: группа 1 – 20 детей с местночаговой формой; группа 2 – 8 детей с септико-пиемической формой; группа сравнения – 13 условно здоровых детей. Определяли количество НГ субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, плотность экспрессии рецепторов (MFI) (FC 500, МкАт Beckman Coulter, США); сывороточные цитокины IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ ИФА (ASCENT, Финляндия), тест-системы Cloud-Clone Corp. (США).

Показано появление в периферической крови (ПК) детей с различными формами тяжести ОГО двух активированных субпопуляций: CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ с фенотипом АПК, способных

Адрес для переписки:

Чудилова Галина Анатольевна
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
350063, Россия, г. Краснодар,
ул. Митрофана Седина, 4.
Тел.: 8 (918) 410-22-14.
E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Address for correspondence:

Galina A. Chudilova
Kuban State Medical University
4 Mitrofan Sedin St
Krasnodar
350063 Russian Federation
Phone: +7 (918) 410-22-14.
E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Образец цитирования:

Г.А. Чудилова, И.В. Нестерова, Ю.В. Тетерин, К.И. Мелконян, М.Г. Атажахова, В.Н. Чапурина, Е.А. Чичерев «Неоднозначность влияний цитокинов IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ на антигенпрезентирующую CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ субпопуляцию нейтрофильных гранулоцитов детей с острым гематогенным остеомиелитом» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 1085-1092.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16737

© Чудилова Г.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

G.A. Chudilova, I.V. Nesterova, Yu.V. Teterin, K.I. Melkonyan, M.G. Atazhakhova, V.N. Chapurina, E.A. Chicherev "Ambiguity of the influence of cytokines IL-8, IL-17A, TNF α , AND IFN γ on the antigen presenting CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ subpopulation of neutrophil granulocytes in children with acute hematogenous osteomyelitis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1085-1092.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-16737

© Chudilova G.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-AOT-16737

презентировать суперантиген *S. aureus* Т-лимфоцитам и субпопуляция с высокой цитотоксической активностью CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ на фоне высоких концентраций сывороточных цитокинов IFN γ , IL-17 и повышенного уровня TNF α . Исходя из того, что степень активации НГ коррелирует со степенью воспалительного разрушения тканей, в том числе костной ткани, определение уровня IFN γ , IL-17 может быть полезным для оценки степени тяжести ОГО, а также для возможного контроля за течением инфекционно-воспалительных процессов, происходящих в костной ткани.

Принимая во внимание ведущую роль НГ в реализации различных воспалительных реакций, определение экспрессии HLA-DR, с целью детекции появления в ПК пациентов субпопуляции АПК-НГ, может иметь диагностическое значение не только при ОГО, но и при других тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваниях.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, антигенпредставляющая субпопуляция, цитокины, острый гематогенный остеомиелит, местноочаговая форма, септико-пиемическая форма, дети

AMBIGUITY OF THE INFLUENCE OF CYTOKINES IL-8, IL-17A, TNF α , AND IFN γ ON THE ANTIGEN PRESENTING CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ SUBPOPULATION OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN CHILDREN WITH ACUTE HEMATOGENIC OSTEOMYELITIS

Chudilova G.A.^a, Nesterova I.V.^{a,b}, Teterin Yu.V.^a, Melkonyan K.I.^a, Atazhakhova M.G.^a, Chapurina V.N.^a, Chicherev E.A.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. Dysfunctions of the immune system, in turn, of neutrophil granulocytes (NG), are the cause of the emergence and progression of the focus of infection in bone tissue and bone marrow in acute hematogenous osteomyelitis (AHO). When colonizing bones, *S. aureus*, osteoblasts, osteocytes and macrophages secrete chemoattractants and cytokines, which initiate the influx of large amounts of NG into the site of infection, which, in turn, secrete cytokines and form an inflammatory microenvironment that promotes the formation of osteoclasts that resorb bone. It is known that NG activated by cytokines undergo functional and phenotypic changes. In this regard, detecting the cytokines that lead to the transformation of the NC phenotype into an antigen-presenting cell (APC) in AHO is of interest. Goal, to determine the levels of neutrophil-associated serum cytokines IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ and their relationship with numerous and phenotypic characteristics of subpopulations CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺NG in localized and septicopyemic forms of CSO in children.

Children (N = 28) aged 8-15 years with AHO were studied: group 1 – 20 children with a localized form; group 2 – 8 children with septicopyemic form; and a comparison group of 13 conditionally healthy children. The number of NG subpopulations CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, receptors mean expression intensity (MFI) (FC 500, mAb Beckman Coulter, USA); serum cytokines IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ ELISA (ASCENT, Finland), test systems Cloud-Clone Corp. (USA).

The appearance of two activated subpopulations in the peripheral blood (PB) of children with various forms of AHO severity were found: CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ with the APC phenotype, capable of presenting the *S. aureus* superantigen for T lymphocytes and a subpopulation with high cytotoxic activity CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ while concentrations of serum cytokines IFN γ , IL-17 are high and levels of TNF α are increased. Due to the fact that the NG activation range correlates with the range of inflammatory tissue damage, including bone tissue, determination of the level of IFN γ , IL-17 can be useful for assessing the severity of AHO, and also possibly for monitoring infectious and inflammatory processes occurring in the bone tissue.

Taking into account the leading role of NG in various inflammatory reactions, determining the expression of HLA-DR, in order to identify the manifestation of the APC-NG subpopulation in peripheral blood, may have diagnostic value not only for AHO, but also for other manifestations of infectious and inflammatory diseases.

Keywords: neutrophil granulocytes, antigen-presenting subpopulation, cytokines, acute hematogenous osteomyelitis, localized form, septicopyemic form, children

Введение

Неэффективность противобактериальной как локальной, так и системной иммунной защиты обуславливает возникновение острого гематогенного остеомиелита (ОГО) у иммунокомпрометированных детей. При этом может наблюдаться повышенная ломкость костей и их ремоделирование, изменение кровоснабжения за счет нарушения сосудистой сети, приводящее к ускоренному некрозу костей, образованию секвестров с возможной дальнейшей хронизацией инфекционного процесса и инвалидизацией пациентов [5, 10]. ОГО – инвазивный инфекционный процесс, вызванный гематогенным распространением *S. aureus*, поражающий кости и/или костный мозг, трудно диагностировать из-за гетерогенности патофизиологии и клинической картины [4, 10]. При колонизации кости *S. aureus* остеобласты, остециты и резидентные макрофаги (МФ) секретируют хемоаттрактанты, инициирующие приток к месту инфекции лейкоцитов, в первую очередь нейтрофильных гранулоцитов (НГ), моноцитов (МОН), Т- и В-лимфоцитов [4].

НГ могут элиминировать *S. aureus* посредством фагоцитоза, выработки активных форм кислорода (АФК), антимикробных пептидов, таких как кателицидин, лизоцим, азурицидин, выработки протеаз для прямого уничтожения патогенов (кателицидин G, эластаза, желатиназа и коллагеназа) и интернализации, активации деградационных ферментов и катионных пептидов в гранулах, образования внеклеточных ловушек NETs и презентации [8]. Однако *S. aureus* оказывает ряд негативных эффектов на НГ, нарушая хемотаксис, фагоцитарную и микробицидную функции, индуцируя процессы формирования NETs, что вызывает разрушение тканей и помогает бактериям выживать и распространяться в очаге инфекции [2].

НГ, МФ, ЛФ в микроокружение кости выделяют цитокины (IL-17, IL-10, IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-18, IL-4, IL-8 TNF α , INF γ , TGF- β), хемокины (CCL3), факторы роста (M-CSF, G-CSF), которые впоследствии привлекают и активируют еще больше НГ, создавая воспалительную среду, способствующую образованию остеокластов, резорбирующих кость [4]. НГ имеют многочисленные рецепторы к цитокинам IL-8, TNF α , IL-1, IL-2, IL-17, INF α , INF γ , G-CSF, GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-12, IL-15 и т. д., и было показано, что цитокин-активируемые НГ претерпевают функциональные и фенотипические изменения [12].

Показано, что при посттравматическом остеомиелите у взрослых в поврежденных костях количество остеокластов коррелирует с количеством инфильтрированных НГ, которые были

высоко активированы, о чем свидетельствовали экспрессия на поверхностной мембране рецепторов HLA-DR и способность этих НГ секретировать IL-8 [4]. Было установлено, что HLA-DR-позитивные НГ презентуют Т-хелперам (Th) суперантиген *S. aureus* посредством сшивки молекулы HLA-DR с вариабельной частью α -цепи TCR [7], возможно, компенсируя функции дендритных клеток (ДК), заблокированные фактором вирулентности *S. aureus* лейкоцидином AB, которые играют ключевую роль в презентации антигена и активации Th [13]. Ранее нами была выявлена и описана антигенпрезентирующая субпопуляция НГ – CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ у детей с ОГО [1].

В этой связи представило интерес определение цитокинов, приводящих к трансформации фенотипа НГ в АПК, а также установление взаимосвязи между уровнем цитокинового фона и количественными и фенотипическими характеристиками антигенпредставляющей субпопуляции НГ при различных по тяжести формах ОГО.

Поверхностные мембранные рецепторы CD16, CD66b, CD33 являются надежными маркерами НГ.

CD66b (CEACAM8) определяется только на НГ. Плотность экспрессии CD66b молекул повышается при активации НГ, участвующих в адгезии к эндотелиальным клеткам, дегрануляции и увеличении АФК [15]. Известно, что CD66b обеспечивает взаимодействие НГ с CD4⁺T-клетками памяти. Взаимодействия CD66b рецептор-лиганд галектин-3, экспрессируемый T-клетками памяти, инициируют экспрессию HLA-DR на мембране НГ [15]. В свою очередь, взаимодействие НГ-HLA-DR с TCR активирует T-лимфоциты, секретирующие цитокины, которые вызывают усиление экспрессии HLA-DR на мембране НГ. Образуется петля положительной обратной связи, которой принадлежит ведущая роль в индукции и поддержании презентации антигена НГ [7].

CD16 (Fc γ RIII) – маркер палочкоядерных и сегментированных НГ. Высокая плотность экспрессии CD16 на поверхностной мембране НГ – показатель гиперактивации НГ, тогда как сниженная экспрессия характерна для незрелых форм НГ или нарушении эффекторных функций НГ при тяжелых инфекционно-воспалительных процессах.

CD33 (Siglec-3) – маркер дифференцировки миелоидных клеток. CD33-рецепторы имеют в структуре ITIM ингибиторные мотивы на основе тирозина, которые могут снижать активность НГ при инфекциях или некрозах тканей [9].

HLA-DR выявляется на поверхности тканевых НГ при некоторых аутоиммунных заболеваниях – ревматоидный артрит, гранулематоз Ве-

генера, и не экспрессируется на циркулирующих НГ [11].

Особый интерес для исследования представляют нейтрофил-ассоциированные цитокины, которые регулируют функции НГ и синтезируются НГ: IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ .

IL-8 является основным цитокином, продуцируемым активированными НГ, поэтому существуют предположения, что при персистирующей инфекции инфильтрация НГ способствует индукции образования остеокластов, обеспечивая тем самым связь между воспалением и эрозией кости [4].

IFN γ – IFN типа II, продуцируется широким спектром клеток: NK-клетками, Т- и В-лимфоцитами и МОН / МФ, ДК и НГ. IFN γ регулирует активацию НГ и МФ, усиление эффекторных функций, индуцируя синтез iNOS и NADPH-оксидазы, протеина NRAMP-1, который повышает резистентность МФ к микроорганизмам [12].

IL-17A синтезируется Th17, CD8⁺Т-лимфоцитами, γ Т-клетками, NK-клетками и IL-С3, НГ. IL-17 действует как нейтрофильный цитокин, способствующий воспалению, образованию NETs и повреждению тканей при инфекции. Через синтез IL-17 НГ привлекают Th17, которые в свою очередь рекрутируют больше НГ [3, 6].

TNF α – многофункциональный провоспалительный цитокин, регулирующий иммунитет, клеточный апоптоз, является драйвером цитокинового шторма, вызванного суперантигеном [3].

Учитывая, что реакция на *S. aureus* в костях и костном мозге имеет уникальные особенности при сравнении с инфекционными процессами в других тканях, контроль воспаления, в частности с помощью провоспалительных сывороточных цитокинов или выявления активированных субпопуляций НГ, может быть ценным диагностическим вариантом для предотвращения хронизации процесса и ранней потери костной массы.

Цель исследования – определить уровни нейтрофил-ассоциированных сывороточных цитокинов IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ и их взаимосвязь с количественными и фенотипическими характеристиками субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ нейтрофильных гранулоцитов при местночаговой и септико-пиемической формах острого гематогенного остеомиелита у детей.

Материалы и методы

В исследование были включены 28 детей с ОГО, в возрасте 8-15 лет. На основе клинико-лабораторных данных были сформированы 2 группы исследования. В группу исследования 1 (ГИ1)

были включены 20 детей с местночаговой формой ОГО. В группу исследования 2 (ГИ2) вошли 8 детей 8-15 лет с септико-пиемической формой ОГО. Группу сравнения (ГС) составили 13 условно здоровых детей 8-15 лет.

Тестировалось количество НГ субпопуляций CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, плотность экспрессии рецепторов по интенсивности флуоресценции (MFI) (Cytometer FC 500, Beckman Coulter, МкАт, Beckman Coulter International S.A., Франция). Методом иммуноферментного анализа (ИФА) (ASCENT, Финляндия) определяли уровень сывороточных цитокинов IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ с использованием тест-систем Cloud-Clone Corp. (США).

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась в программе Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2020. После оценки нормальности распределения показателей проводился анализ по критерию Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы и квартильных интервалов – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование сыворотки крови детей с ОГО с местночаговой формой выявило статистически значимое повышение уровня исследуемых нейтрофил-ассоциированных цитокинов IL-8, IL-17A, TNF α , IFN γ .

Так, в ГИ1 отмечается повышение уровня IL-8 в 5 раз, IL-17A в 3,9 раз, в 2,2 раза TNF α в сопоставлении с показателями ГС ($p_{1-3} < 0,05$) (табл. 1). Наиболее высокие значения показателей по отношению к ГС были установлены для IFN γ , концентрация которого повышалась в 462 раза и составила 4308,2 (4047,3-4380,4) пг/мл против 9,32 (8,9-9,6) в ГС ($p < 0,05$).

В ГИ2 ОГО с септико-пиемической формой уровень IL-8 не отличался от значений ГС ($p > 0,05$) и был в 6,4 раза ниже чем в ГИ1 ($p < 0,05$). При этом уровень IL-17A был в 53 раза выше в сопоставлении с показателями ГС ($p < 0,05$) и в 14 раз в сравнении с ГИ1 ($p < 0,05$). Также выявлено повышение TNF α в 3,8 раз по отношению к ГС ($p < 0,05$) и в 1,8 раз против значений ГИ1 ($p > 0,05$). Уровень IFN γ в 376 раз был выше относительно ГС – 3505,3 (3481,6-4040,8) против 9,32 (8,9-9,6) ($p < 0,05$), однако был в 1,2 раза ниже, чем в ГИ1 – 4308,2 (4047,3-4380,4) ($p < 0,05$).

Сравнительный анализ исследуемых цитокинов показал, что для группы с мелкоочаговой формой характерно значимое повышение уровней IFN γ и IL-8, более умеренное повышение IL-17A; в группе с септико-пиемической формой ОГО также отмечался высокий уровень IFN γ ,

однако он был ниже, чем в ГИ1, и наблюдался высокий уровень IL-17A; в обеих группах была одинаково повышена концентрация TNF α . При этом в ГИ2 уровень IL-8 не отличался от показателей ГС.

Согласно литературным данным, под влиянием *in vitro* и *in vivo* цитокинов IFN γ , GM-CSF, IL-3, TNF α на НГ в КМ индуцируется HLA-DR, и при этом сохраняются все свойства НГ [9].

Для уточнения роли влияния цитокинового фона на НГ при ОГО проведено исследование субпопуляции, одновременно экспрессирующей рецепторы CD66b, CD16, CD33, HLA-DR, на фоне измененного профиля сывороточных нейтрофил-ассоциированных провоспалительных цитокинов IL-8, IL-17A, IFN γ , TNF α .

Показано, что в ГС в периферической крови 98,8 (98,0-100) % НГ представлены одной субпопуляцией CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻. Фенотип данной субпопуляции характеризуется низкой плотностью экспрессии рецепторов CD66b и CD33: MFI CD66b – 4,6 (4,2-5,0), MFI CD33 – 3,7 (3,3- 4,6), средним значением MFI CD16 – 81,45 (69,3-99,2).

При фенотипировании НГ в ГИ1 и ГИ2 с ОГО были выявлены две субпопуляции НГ: CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ и субпопуляция, экспрессирующая HLA-DR рецептор, приобретающая фенотип антигенпредставляющих клеток – CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ (табл. 2).

В ГИ1 субпопуляция CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ составляла 30,2 (16,4-34,9) %, с плотность экспрессии рецепторов по MFI HLA-DR – 2,2 (1,8-4,0), MFI CD66b – 6,9 (5,9-7,7), MFI CD16 – 117,8

(110,3-140,0) и MFI CD33 – 3,5 (3,3-4,2) (табл. 2). При этом было определено снижение в 1,4 раза доли НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ до 69,3 (61,25-76,8) % в сопоставлении с 98,8 (98,0-100) % в ГС (p < 0,05). Также отмечалось изменение фенотипа этой субпопуляции – увеличение MFI CD16 до 114,5 (100,3-139,0) против 81,45 (69,3-99,2) и CD66b до 6,23 (5,7-7,3) против 4,6 (4,2-5,0) (p_{1,2} < 0,05) и снижение MFI CD33 – до 2,9 (2,5-3,1) против 3,7 (3,3-4,6) (p > 0,05).

В ГИ2 количество НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ в 1,5 раза превышало содержание в ГИ1 (p < 0,05), но при этом было выявлено снижение плотности в 1,6 раз экспрессии MFI HLA-DR, в 1,2 раза MFI CD66b (p_{1,2} < 0,05), тенденция к снижению MFI CD16 (p > 0,05), при этом MFI CD 33 не отличался от ГИ1 (p > 0,05).

Наблюдалось также снижение содержания НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ в 8 раз при сопоставлении с ГС (p < 0,05) и в 1,5 раза в сравнении с ГИ1 (p < 0,05). Плотность экспрессии изучаемых рецепторов на данной субпопуляции не отличалась от величин, регистрируемых в ГИ1 (p > 0,05), при этом MFI CD66b, MFI CD16 были выше, а MFI CD33 ниже значений ГС (p₁₋₃ < 0,05).

Таким образом, в результате исследования установлено, что при ОГО у детей на системном уровне определяются высокие концентрации IFN γ при местноочаговой и септико-пиемической формах и IL-17A, более значимые при септико-пиемической форме. Кроме того, определены повышенные уровни TNF α при обеих формах ОГО и IL-8 при местноочаговой форме.

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ НЕЙТРОФИЛ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ОСТРОМ ГЕМАТОГЕННОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ У ДЕТЕЙ 8-15 ЛЕТ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF NEUTROPHIL-ASSOCIATED CYTOKINES IN ACUTE HEMATOGENOUS OSTEOMYELITIS IN CHILDREN 8-15 YEARS OLD, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Группа сравнения Comparison group	ГИ 1 ОГО местноочаговой формой Study group 1 acute hematogenous osteomyelitis localized form	ГИ2 ОГО септико-пиемической формой Study group 2 acute hematogenous osteomyelitis septicopyemic form
IL-17A, пг/мл IL-17A, pg/mL	9,1 (7,6-12,6)	35,1 (24,2-95,0)*	484,4 (305,20-2667,95)*^
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	5,6 (3,7-7,0)	28,3 (9,1-41,8)*	4,4 (3,5-16,4)^
IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	9,32 (8,9-9,6)	4308,2 (4047,3-4380,4)*	3505,3 (3481,6-4040,8)*^
TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	4,8 (2,2-5,9)	10,5 (7,2-29,1)*	18,2 (12,6-23,8)*

Примечание. * – значимые различия между показателями группы сравнения и группы исследования 1 (ГИ1), p < 0,05; ^ – значимые различия между показателями группы исследования 1 и группы исследования 2, p < 0,05.

Note. *, significant differences between the indicators of the comparison group and study group 1 (SG1), p < 0.05; ^, significant differences between the indicators of study group 1 and study group 2, p < 0.05.

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ И CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ОСТРОГО ГЕМАТОГЕННОГО ОСТЕОМИЕЛИТА, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. QUANTITATIVE AND PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF SUBSETS OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻ AND CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ IN DIFFERENT FORMS OF ACUTE HEMATOGENOUS OSTEOMYELITIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

	Группа сравнения Comparison group	ГИ 1 ОГО местноочаговой формой Study group 1 acute hematogenous osteomyelitis localized form	ГИ2 ОГО септико-пиемической формой Study group 2 acute hematogenous osteomyelitis septicopyemic form
% НГ % NG CD16 ⁺ CD66b ⁺ CD33 ⁺ HLADR ⁻	98,8 (98,0-100,0)	69,3 (61,25-76,8)*	47,6 (36,2-58,9)**^
MFI CD66b	4,6 (4,2-5,0)	6,2 (5,7-7,3)*	6,7 (5,3-7,0)*
MFI CD16	81,5 (69,3-99,2)	114,5 (100,3-139,0)*	106 (99,7-126,0)*
MFI CD33	3,7 (3,3-4,6)	2,9 (2,5-3,1)*	2,9 (2,1-3,0)*
% НГ % NG CD16 ⁺ CD66b ⁺ CD33 ⁺ HLADR ⁺	0	30,2 (16,4-34,9)	46,7 (36,2-48,1)**^
MFI CD66b	0	6,9 (5,9-7,7)	5,7 (5,0-6,0)^
MFI CD16	0	117,8 (110,3-140,0)	106,0 (99,7-126,0)
MFI CD33	0	3,5 (3,18-4,20)	3,4 (3,3-3,4)
MFI HLA-DR	0	2,2 (1,8-4,0)	1,4 (1,4-1,5)^

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Полученные результаты частично совпадают с данными, полученными другими исследователями, которые показали, что остеомиелит сопровождается изменениями местного и иногда системного уровня как провоспалительных IL-6, IL-1α, TNFα, IL-1β, так и противовоспалительных TGF-β цитокинов [5].

В ходе включения НГ в иммунный ответ под влиянием цитокинов в обеих исследуемых группах пациентов с ОГО на НГ индуцируется экспрессия HLA-DR рецепторов на 30,6% НГ в ГИ1 и на 46,7% НГ в ГИ2, плотность экспрессии, очевидно, зависит от комплексного влияния цитокинов в ГИ1 – от IFNγ, IL-8, а в ГИ2 – от IFNγ, IL-17A и соотношения их уровней.

Тот факт, что при наличии большего содержания НГ субпопуляции CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺ при более тяжелой форме ОГО плотность экспрессии HLA-DR была ниже, чем при более легкой форме, можно объяснить опубликованными недавно данными о том, что АПК НГ неоднородны и среди них при сепсисе определяется субпопуляция «стареющих АПК» НГ, которые лучше, чем обычные АПК НГ с соответствующим фенотипом, индуцировали клетки Th2 и Th17, продуцировали IL-4 и IL-17 [6].

Существуют данные, свидетельствующие о том, что при остеомиелитах TNFα, IL-1, IL-6, IL-21 и IL-23 усиливают экспрессию RORγt и ингибируют экспрессию FoxP3, что индуцирует дифференцировку Th в Th17 и супрессирует Т-регуляторные клетки (Treg) [14]. Th17 и Treg связаны с персистенцией остеомиелитического процесса и разрушением костей [14]. Th17 секретируют IL-17, способствующий воспалению, индуцирующий активированные НГ к образованию NETs и повреждению костной ткани. В свою очередь, НГ синтезируют и секретируют IL-17, привлекая Th17 [3], а те в свою очередь рекрутируют еще большее количество НГ в зону воспаления [6].

С другой стороны, под действием цитокинов на НГ субпопуляций как CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁻, так и CD66b⁺CD16⁺CD33⁺HLA-DR⁺, выявляется дополнительная транслокация внутриклеточных резервных пулов CD16, CD66b рецепторов на мембрану НГ, что проявляется в приросте количества высоко активированных НГ. Через CD16-рецепторы происходит активация цитотоксических функций НГ-дегрануляции, окислительного взрыва, антителозависимой клеточной цитотоксичности, фагоцитоза, что позволяет

НГ уничтожать опсонизированные патогены [1, 9]. Известно, что цитокины, особенно $IFN\gamma$, сохраняют экспрессию CD16, усиливают фагоцитарную активность и пролонгируют продолжительность жизни НГ [9].

В свою очередь, активация CD66b на поверхности НГ индуцирует функциональные реакции, такие как агрегация клеток, дегрануляция и активация протеинкиназ, увеличение продукции АФК. Кроме того, активация CD66b на мембране НГ способствует секреции предсинтезированного IL-8, который участвует в привлечении других НГ в зону воспаления [15].

Все вышеизложенное обуславливает целесообразность проведения дальнейших исследований роли сывороточных нейтрофил-ассоциированных цитокинов IL-8, IL-17, $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ и определения их ролевого участия в репаративно-воспалительных процессах в костной ткани.

Заключение

В настоящем исследовании показано появление в периферической крови детей с различными формами тяжести ОГО двух активированных

субпопуляций: $CD66b^+CD16^+CD33^+HLA-DR^+$ с фенотипом АПК, способных презентировать суперантиген *S. aureus* Т-лимфоцитам, и субпопуляция с высокой цитотоксической активностью $CD66b^+CD16^+CD33^+HLA-DR^-$ на фоне высоких концентраций сывороточных цитокинов $IFN\gamma$, IL-17 и повышенного уровня $TNF\alpha$. Исходя из того, что степень активации НГ коррелирует со степенью воспалительного разрушения тканей, в том числе костной ткани, определение уровня сывороточных цитокинов $IFN\gamma$, IL-17 может быть полезным для оценки степени тяжести ОГО, а также для возможного контроля за течением инфекционно-воспалительных процессов, происходящих в костной ткани.

Принимая во внимание ведущую роль НГ в реализации различных воспалительных реакций, определение экспрессии HLA-DR на этих клетках с целью детекции появления в периферической крови пациентов субпопуляции АПК-НГ может иметь важное диагностическое значение не только при ОГО, но и при других тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваниях, в возникновении которых могут участвовать патогенетически значимые суперантигены.

Список литературы / References

1. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Тетерин Ю.В., Чичерев Е.А., Чапурина В.Н., Митропанова М.Н. Антигенпрезентирующая субпопуляция гранулоцитов при остром остеомиелите у детей: иммуномодулирующие эффекты влияний иммунотропного гексапептида в экспериментальной $CD66b^+CD16^+CD33^+HLA-DR^+$ нейтрофильной системе *in vitro* // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 4. С. 899-906. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Teterin Yu.V., Chicherev E.A., Chapurina V.N., Mitropanova M.N. Antigen presenting subset of $CD66b^+CD16^+CD33^+HLA-DR^+$ neutrophilic granulocytes in acute osteomyelitis in children: Immunomodulating effects of immunotropic hexapeptide in an *in vitro* experimental system. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 4, pp. 899-906. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-APS-2776.
2. Chen Y., Liu Z., Lin Z., Lu M., Fu Y., Liu G., Yu B. The effect of Staphylococcus aureus on innate and adaptive immunity and potential immunotherapy for *S. aureus*-induced osteomyelitis. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1219895. doi: 10.3389/fimmu.2023.1219895.
3. Fajgenbaum D.C., June C.H. Cytokine Storm. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 383, no. 23, pp. 2255-2273.
4. Gaida M.M., Mayer B., Stegmaier S., Schirmacher P., Wagner C., Hansch G.M. Polymorphonuclear neutrophils in osteomyelitis: link to osteoclast generation and bone resorption. *Eur. J. Inflamm.*, 2012, no. 10, pp. 413-426.
5. Granata V., Possetti V., Parente R., Bottazzi B., Inforzato A., Sobacchi C. The osteoblast secretome in Staphylococcus aureus osteomyelitis. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1048505. doi: 10.3389/fimmu.2022.1048505.
6. Jin H., Aziz M., Murao A., Kobritz M., Shih A.J., Adelson R.P., Brenner M., Wang P. Antigen-presenting aged neutrophils induce $CD4^+$ T cells to exacerbate inflammation in sepsis. *J. Clin. Invest.*, 2023, Vol. 133, no. 14, e164585. doi: 10.1172/JCI164585.
7. Lin A., Loré K. Granulocytes: New members of the antigen-presenting cell family. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1781. doi: 10.3389/fimmu.2017.01781.
8. Lüthje F.L., Jensen L.K., Jensen H.E., Skovgaard K. The inflammatory response to bone infection – a review based on animal models and human patients. *APMIS*, 2020, no. 128, pp. 275-286.
9. Matsushima H., Geng S., Lu R., Okamoto T., Yao Y., Mayuzumi N., Kotol P.F., Chojnacki B.J., Miyazaki T., Gallo R.L., Takashima M. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 10, pp. 1677-1689.
10. Muthukrishnan G., Masters E.A., Daiss J.L., Schwarz, E.M. Mechanisms of immune evasion and bone tissue colonization that make staphylococcus aureus the primary pathogen in osteomyelitis. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 2019, no. 17, pp. 395-404.
11. Sandilands G.P., McCrae J., Hill K., Perry M., Baxter D. Major histocompatibility complex class II (DR) antigen and costimulatory molecules on *in vitro* and *in vivo* activated human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology*, 2006, Vol. 119, no. 4, pp. 562-571.

12. Tamassia N., Bianchetto-Aguilera F., Arruda-Silva F., Gardiman E., Gasperini S., Calzetti F., Cassatella M.A. Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the “dark side of the moon”. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2018, Vol. 48, Suppl. 2, e12952. doi: 10.1111/eci.12952.

13. Tekguc M., Wing J.B., Osaki M., Long J., Sakaguchi S. Treg-expressed CTLA-4 depletes CD80/CD86 by trogocytosis, releasing free PD-L1 on antigen-presenting cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2021, Vol. 118, no. 30, e2023739118. doi: 10.1073/pnas.2023739118.

14. Tyagi A.M., Yu M., Darby T.M., Vaccaro C., Li J.Y., Owens J.A., Hsu E., Adams J., Weitzmann M.N., Jones R.M., Pacifici R. The microbial metabolite butyrate stimulates bone formation via T regulatory cell-mediated regulation of WNT10B expression. *Immunity*, 2018, Vol. 49, no. 6, pp. 1116-1131.e7.

15. Yoon J., Terada A., Kita H. CD66b regulates adhesion and activation of human eosinophils. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, pp. 8454-8462.

Авторы:

Чудилова Г.А. — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Тетерин Ю.В. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Мелконян К.И. — к.м.н., заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Атажахова М.Г. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чапурина В.Н. — к.м.н., ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чичерев Е.А. — аспирант кафедры хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Chudilova G.A., DPhD, MD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory, Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Faculty of Continuing Medical Education of the Medical Institute, P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Teterin Yu.V., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Melkonyan K.I., PhD (Medicine) Head, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Atazhakhova M.G., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chapurina V.N., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chicherev E.A., Postgraduate Student, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

ВЛИЯНИЕ IL-7 И БЛОКАДЫ IL-7R НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

Блинова Е.А., Ангельская О.А., Козлов В.А.

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

Резюме. Псориатический артрит (ПсА) — это хроническое иммуноопосредованное воспалительное заболевание суставов, которое часто ассоциируется с псориазом. Центральное место в патогенезе ПсА занимают взаимодействия между иммунными клетками, главным образом Т-лимфоцитами, и клетками костно-суставной системы. Th1, Th17 цитокины, связанные с развитием ПсА, способствуют повышению уровня продукции цитокинов, хемокинов, матриксных металлопротеиназ, адгезионных молекул иммунными клетками, хондроцитами, фибробластами, индукции остеокластов, что приводит к разрушению хрящевой и костной ткани.

Среди цитокинов, потенциально вовлеченных в патогенез псориатического артрита, особый интерес вызывает IL-7. IL-7 известен как фактор выживаемости Т-клеток, однако, он может способствовать выработке IFN γ и TNF α Т-лимфоцитами. IL-7 может опосредованно способствовать созреванию остеокластов и деградации хряща. Целью данной работы было исследовать *in vitro* влияние IL-7 и блокады α -цепи рецептора IL-7 (IL-7R) на продукцию Т-клетками IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IFN γ , TNF α , IL-17A, IL-17F, IL-4, IL-22 в норме и при псориатическом артрите.

В исследование было включено 14 пациентов с ПсА в стадии обострения основного заболевания и 8 условно-здоровых доноров. Для определения концентрации цитокинов проводили мультиплексный анализ с помощью проточной цитофлуорометрии.

Показано, что *in vitro* IL-7 способствует усилению продукции Th1, Th2, Th17, Th22, Th9 цитокинов как у пациентов с ПсА, так и у здоровых индивидуумов. Исключение составила продукция IL-2 для обеих групп. При применении блокады α -цепи рецептора IL-7 с помощью моноклональных антител происходит увеличение уровня IL-6 и снижение продукции IFN γ , TNF α , IL-17F, IL-10, IL-5, IL-9 клетками доноров и продукции IFN γ , TNF α , IL-22, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-9 клетками пациентов с ПсА относительно продукции клеток, стимулированных IL-7. У доноров блокада способствовала изменению баланса Th1/Th2 цитокинов: уровень продукции IL-4, IL-13 не изменялся на фоне снижения продукции IFN γ , TNF α . У пациентов с ПсА в условии блокады рецептора IL-7 на повышенном

Адрес для переписки:

Блинова Елена Андреевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и фундаментальной иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: blinovaelena-85@yandex.ru

Address for correspondence:

Elena A. Blinova
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 227-01-35.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: blinovaelena-85@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Блинова, О.А. Ангельская, В.А. Козлов «Влияние IL-7 и блокады IL-7R на продукцию цитокинов клетками периферической крови пациентов с псориатическим артритом» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 1093-1098.
doi: 10.15789/1563-0625-EOI-16808

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

For citation:

E.A. Blinova, O.A. Angelskaya, V.A. Kozlov "Effect of IL-7 and IL-7R blockade on cytokine production by peripheral blood t cells from patients with psoriatic arthritis", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1093-1098.
doi: 10.15789/1563-0625-EOI-16808

© Blinova E.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOI-16808

уровне сохранялась продукция IL-10 и происходило уменьшение концентрации IFN γ , TNF α и IL-2, активно задействованных в механизме повреждения тканей. Полученные данные говорят о перспективе применения рецептора IL-7 в качестве таргетной мишени для терапии псориатических заболеваний.

Ключевые слова: IL-7, блокада альфа цепи рецептора интерлейкина-7, T-хелперы, цитокины, псориатический артрит, мультиплексный анализ

EFFECT OF IL-7 AND IL-7R BLOCKADE ON CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD T CELLS FROM PATIENTS WITH PSORIATIC ARTHRITIS

Blinova E.A., Angelskaya O.A., Kozlov V.A.

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

Abstract. Psoriatic arthritis (PsA) is a chronic immune-mediated inflammatory joint disease, often associated with psoriasis. Interactions between immune cells, mainly T lymphocytes, and cells of the osteoarticular system are central in the pathogenesis of PsA. Th1, Th17 cytokines associated with the development of PsA contribute to an increase in the production of cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases, adhesion molecules by immune cells, chondrocytes, fibroblasts, and induction of osteoclasts. That leads to the destruction of cartilage and bone tissue. Among the cytokines potentially involved in the pathogenesis of PsA, IL-7 is of particular interest. IL-7 is a T cell survival factor. However, it can promote the production of IFN γ and TNF α by T cells. IL-7 may indirectly promote osteoclast maturation and cartilage degradation. The aim was to investigate the effect of IL-7 and blockade of the α -chain of the IL-7 receptor (IL-7R) *in vitro* on the production of IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IFN γ , TNF α , IL-17A, IL-17F, IL-4, and IL-22 by T cells in norm and PsA.

The study included 14 patients with PsA in the acute stage of the disease and 8 healthy individuals. To determine cytokines concentration, multiplex analysis was performed using flow cytometry.

It was shown that IL-7 enhances the production of Th1, Th2, Th17, Th22, and Th9 cytokines in both patients with PsA and healthy individuals. The exception was IL-2 for both groups. Under the blockade of IL-7R with monoclonal antibodies, the level of IL-6 increases and production of IFN γ , TNF α , IL-17F, IL-10, IL-5, and IL-9 by donors' cells and production of IFN γ , TNF α , IL-22, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, and IL-9 by cells from patients with PsA decreases relative to production of cells stimulated with IL-7. In donors, the blockade contributed to a change in the balance of Th1/Th2 cytokines: level of IL-4, IL-13 did not change on the background of a decrease in production of IFN γ , TNF α . In patients with PsA, under blockade of IL-7R the production of IL-10 remained at an increased level and concentration of IFN γ , TNF α and IL-2, which are actively involved in the tissue damage mechanisms, decreased. The obtained data indicate the prospect of using the IL-7R as a target for the treatment of psoriatic diseases.

Keywords: IL-7, T helper cells, cytokines, blockade of alpha-chain of interleukine-7 receptor, psoriatic arthritis, multiplex analysis

Данная работа выполнена при поддержке Российского научного фонда и правительства Новосибирской области (региональный проект РНФ № 22-25-20212).

Введение

Псориатический артрит (ПсА) — это хроническое иммуноопосредованное воспалительное заболевание суставов, которое часто ассоциируется с псориазом. ПсА выявляется у 19,7% больных псориазом, и чаще у пациентов с умеренной

и высокой тяжестью псориаза — 24,6% [2]. ПсА характеризуется широким спектром проявлений, таких как периферический артрит, спондилит, энтезит и дактилит; может проявляться в виде серьезного воспаления, приводящего к значительному ограничению подвижности и ухудшению качества жизни пациентов.

Патогенез ПсА до конца не изучен и представляет собой сложный многоэтапный процесс, включающий взаимодействие генетических, иммунологических факторов и факторов окружаю-

шей среды [7]. Взаимодействия между иммунными клетками, главным образом Т-лимфоцитами, и структурными клетками костно-суставной системы, увеличение продукции ими множества провоспалительных медиаторов занимают центральное место в этиопатогенезе ПсА. Медиаторы воспаления являются мишенью не только для терапевтического вмешательства, но и прогностическими маркерами развития существенных структурных повреждений [12].

Провоспалительные цитокины IL-1, IL-6 и TNF α повышают уровень экспрессии RANKL на мезенхимальных стволовых клетках, что усиливает осеокластогенез. Провоспалительные цитокины могут напрямую активировать предшественники остеокластов, способствуя резорбции кости. IL-17 может усиливать экспрессию RANK в предшественниках остеокластов и дифференцировку остеокластов, который отрицательно регулируется остеопротегерином [11]. Сам IL-17A может взаимодействовать со стромальными клетками и макрофагами, дополнительно поддерживая экспрессию IL-1, IL-6 и TNF α , тем самым обеспечивая петлю положительной обратной связи для остеокластогенеза. IL-23 косвенно способствует остеокластогенезу благодаря своей способности индуцировать дифференцировку клеток в Th17 лимфоциты, а также путем индукции экспрессии RANK на предшественниках остеокластов. IL-1, TNF α , IL-6 и IL-17 индуцируют выработку матриксных металлопротеиназ (MMP) и агреканиз (ADAMTS) хондроцитами, фибробластами и нейтрофилами [8]. Эти ферменты разрушают внеклеточный матрикс кости и хряща, тем самым способствуя эрозиям и сужению суставной щели.

Имеются данные и о других цитокинах, участвующих в регуляции взаимодействия остеокластов и остеобластов и потенциально вовлеченных в патогенез псориатического артрита, таких как IL-5, IL-4, IL-13, IL-10 [3, 8], IL-9, IL-22, IL-15 [4, 8, 10], IL-2 [6]. Особый интерес представляет IL-7, известный как фактор дифференцировки и выживаемости Т-клеток [13]. Помимо своей роли Т-клеточного гомеостатического фактора, он также способствует выработке IFN γ и TNF α [9, 15]. IL-7 опосредованно через продукцию TNF α способствует деградации хряща за счет увеличения активности фибробластов, продуцирующих катаболические факторы, и созревания остеокластов из моноцитов [14]. Показано, что *in vitro* блокада α -цепи рецептора IL-7 приводит к снижению Th1 лимфоцитов [1], что говорит о вовлеченности данного цитокина в поддержание данной субпопуляции. Можно предположить, что IL-7 косвенно участвует в разрушении су-

ставной ткани посредством аутоиммунных механизмов, а также через воздействие на выработку Т-клетками других цитокинов. Действие цитокинов при этом будет синергитическим, направленным на сохранение хронического воспаления, характерного для аутоиммунного заболевания.

Целью данной работы было исследовать *in vitro* влияние IL-7 и блокады α -цепи рецептора IL-7 (IL-7R) на продукцию Т-клетками IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IFN γ , TNF α , IL-17A, IL-17F, IL-4, IL-22 в норме и при псориатическом артрите.

Материалы и методы

В исследование вошли 14 пациентов с псориатическим артритом в стадии обострения (средний возраст $56 \pm 3,2$ лет, 12 женщин и 2 мужчин) и 8 условно здоровых доноров (средний возраст $46 \pm 2,2$ лет, 7 женщин и 1 мужчина). Пациенты с ПсА получали терапию в ГБУЗ НСО ГБ № 3 (г. Новосибирск). Взятие образцов крови от пациентов осуществлялось после подписания информированного согласия. Пациенты преимущественно имели легкое и среднетяжелое течение псориаза и выраженный суставной болевой синдром.

Получение и культивирование клеток периферической крови

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,082$ г/л) (BioClot GmbH, Германия). МНК периферической крови культивировали во влажной атмосфере с 5% CO $_2$ при 37 °C в 48-луночном планшете (BioFil, Китай) в среде RPMI-1640 (ООО «ПанЭко»), дополненной антибиотиками гентамицином и тиенамом, 10% FCS (HyClone, США), с добавлением IL-7 (50 нг/мл) и с добавлением блокирующих антител к CD127 (10 мкг/мл) и IL-7 в течение 4 дней. В качестве контроля использовали клетки без стимуляции. На 3 сутки добавляли активаторы продукции цитокинов PMA (15 нг/мл; Sigma, США) и Ionomycin (2 мкг/мл; Sigma, США). Клетки инкубировали с PMA, Ionomycin в течение 20 часов, затем клетки собирали с планшета, центрифугировали. Супернатанты клеточных культур замораживали и хранили при -20 °C для последующего анализа цитокинов.

Определение цитокинов в супернатантах клеточных культур

Определение цитокинов в супернатантах культур производили мультиплексным методом идентификации с помощью набора LEGENDplex HU Th Cytokine panel (12-plex) (BioLegend, США), в который вошли 12 цитокинов (IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IFN γ , TNF α , IL-17A, IL-17F,

IL-4, IL-22), согласно инструкции производителя. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (Becton Dickinson, США) в программном обеспечении FACS Diva 6.0 (Becton Dickinson, США) и специализированном программном обеспечении LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite (BioLegend, США).

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 9.0 (GraphPad, США) с использованием методов непараметрической статистики (U-критерий Mann–Whitney, тест Friedman для множественных сравнений с последующим проведением теста Dunn). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Мы провели анализ содержания цитокинов основных Т-хелперных популяций в *in vitro* культурах МНК доноров и пациентов с ПсА. Концентрации всех цитокинов во всех вариантах культивирования были достоверно ниже у пациентов с ПсА по сравнению с концентрациями цитокинов у здоровых доноров, исключение составил уровень IL-5 в нестимулированных клетках (контроль), который достоверно не отличался между исследуемыми группами. Более низкий ответ на стимуляцию клеток пациентов с ПсА, которые находились в стадии обострения заболевания, может быть обусловлен активацией Т-клеток в организме, накоплением «истощенных» Т-клеток, что способствует более низкой цитокин-продуцирующей способности клеток при последующей активации [5].

Под влиянием IL-7 усиливалась продукция почти всех исследованных цитокинов в группах доноров и пациентов с ПсА (табл. 1) относительно продукции в нестимулированных клетках (контроль). Исключение составило IL-2 для обеих групп, а также не наблюдалось достоверного изменения в продукции IL-6 у доноров, и продукции TNF α у пациентов с ПсА. Отсутствие изменений в продукции IL-6 и TNF α больше связано с различным индивидуальным ответом клеток доноров и пациентов с ПсА на стимуляцию, что при статистической обработке привело к отсутствию достоверных различий. Мы получили увеличение продукции IFN γ и TNF α в присутствии IL-7 как в группе доноров, так и пациентов с ПсА, что подтверждает способность IL-7 индуцировать продукцию Th1 цитокинов. Схожие результаты были получены на культурах клеток доноров и пациентов с туберкулезом [15].

В условиях блокады α -цепи рецептора IL-7 (CD127) были получены различные результаты

по продукции цитокинов у доноров и пациентов с ПсА. Блокада способствовала снижению продукции IFN γ , TNF α , IL-17F, IL-10, IL-5, IL-9 клетками доноров и продукции IFN γ , TNF α , IL-22, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-9 клетками пациентов с ПсА относительно продукции клеток, стимулированных IL-7 (табл. 1). Под действием блокады происходило увеличение продукции IL-6 относительно продукции нестимулированными клетками (контроль) в обеих исследуемых группах. Тем не менее, несмотря на то, что блокада рецептора IL-7 у пациентов с ПсА не приводила к достоверному снижению продукции IL-17A, IL-17F, в культурах уровень продукции IL-10 сохранялся на повышенном уровне, а продукция IFN γ , TNF α и IL-2 снижалась. Что говорит о том, что блокада α -цепи рецептора IL-7 может влиять на патогенетические механизмы при псориатическом артрите. Интересно, что у доноров уровень продукции IL-2 не изменялся в ответ на IL-7 и в условиях блокады рецептора IL-7. Кроме того, поскольку у доноров при блокаде не изменялся уровень IL-4, IL-13 на фоне снижения продукции Th1 цитокинов, то можно говорить об изменении баланса цитокинов под действием блокады.

Заключение

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что *in vitro* IL-7 способствует усилению продукции цитокинов основными Т-хелперными популяциями (Th1, Th2, Th17, Th22, Th9) как у пациентов с ПсА, так и у здоровых индивидуумов. При применении блокады α -цепи рецептора IL-7 с помощью моноклональных антител происходит увеличение уровня IL-6 и снижение продукции ряда цитокинов клетками доноров и пациентов с ПсА. У доноров блокада способствовала изменению баланса Th1/Th2 цитокинов: уровень продукции IL-4, IL-13 не изменялся на фоне снижения продукции IFN γ , TNF α . У пациентов с ПсА в условиях блокады рецептора IL-7 на повышенном уровне сохранялась продукция IL-10 и происходило уменьшение концентрации IFN γ , TNF α и IL-2, активно задействованных в механизме повреждения тканей при псориатическом артрите. Полученные данные о воздействии на продукцию цитокинов Т-хелперными лимфоцитами говорят о перспективе применения рецептора IL-7 в качестве таргетной мишени для терапии псориатических заболеваний, которая может стать альтернативой существующей терапии генно-инженерными препаратами, представленной ингибиторами основных медиаторов воспаления.

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР *IN VITRO* У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ

TABLE 1. THE CONTENT OF CYTOKINES IN SUPERNATANTS OF *IN VITRO* CELL CULTURES IN HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH PSORIATIC ARTHRITIS

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/mL	Доноры Donors (n = 8)			Пациенты с ПсА Patients with PsA (n = 14)		
	к	IL-7	aCD127	к	IL-7	aCD127
INF γ	56248 (36498-60911)	63356 (59121-66912) [#]	57201 (48162-61610) [†]	9729 (3066-27602) [*]	28361 (15112-42977) ^{* #}	11424 (1773-29355) ^{* †}
TNF α	17304 (8705-22312)	27847 (16036-32686) [#]	8052 (4494-14862) [†]	391,1 (187,2-2669) [*]	1780 (662,5-3936) [*]	337,1 (31,6-2048) ^{* †}
IL-17A	479 (164,9-983,2)	1370 (694,5-2484) [#]	784 (489,5-1829)	8,0 (5,4-76,3) [*]	76,3 (33,77-137,1) ^{* #}	45,9 (24,2-257,5) [*]
IL-17F	29,66 (16,73-85,08)	170,1 (68,29-359,6) [#]	76,1 (26,99-156) [†]	3,5 (1,973-17,79) [*]	38,37 (19,62-123) ^{* #}	31,3 (11,9-65,0) [*]
IL-22	1197 (639,6-2536)	4860 (2297-13983) [#]	2803 (1788-8817)	120 (62,3-598,7) [*]	723,8 (299-1349) ^{* #}	333,7 (121,6-1007) ^{* †}
IL-6	5164 (3282-19643)	16724 (11039-26368)	41601 (30998-46015) [#]	454,6 (212,3-4235) [*]	9398 (4845-15441) ^{* #}	25935 (15313-36788) ^{* #}
IL-2	7964 (6042-10844)	7396 (6219-8237)	5975 (5417-8249)	3547 (2500-4016) [*]	3922 (3492-4199) [*]	2459 (470,8-3624) ^{* †}
IL-10	107,8 (45,4-198,8)	260,5 (209,1-701,9) [#]	141,3 (74,75-178,5) [†]	10,8 (4,2-45,1) [*]	40,7 (26,7-61,6) ^{* #}	21,1 (10,7-47,8) [*]
IL-4	82,5 (41,0-156,7)	379,9 (188,1-823,6) [#]	164 (110,9-252,1)	5,6 (4,0-30,5) [*]	64,9 (21,4-169,2) ^{* #}	20,6 (8,1-71,0) ^{* †}
IL-5	111,3 (30,6-697,2)	436,2 (127,8-1502) [#]	203 (98,9-622,6) [†]	14,4 (6,6-59,2)	68,44 (23,7-100,1) ^{* #}	16,8 (4,6-56,2) ^{* †}
IL-13	499,7 (147,3-1421)	3319 (1227-6273) [#]	922 (571,5-1864)	19,4 (8,6-123,6) [*]	514,4 (140,3-909,7) ^{* #}	72,2 (27,9-358,5) ^{* †}
IL-9	192,1 (43,7-549,4)	2676 (835,1-6175) [#]	179,2 (73,6-575,1) [†]	4,8 (3,6-13,7) [*]	90,9 (56,5-181,7) ^{* #}	8,8 (4,0-28,4) ^{* †}

Примечание. ПсА – псориатический артрит; к – клетки без стимуляции; IL-7 – клетки, стимулированные IL-7 (50 нг/мл); aCD127 – клетки, обработанные блокирующими антителами против CD127 (10 мкг/мл) и стимулированные IL-7 (50 нг/мл); * – достоверное отличие по сравнению с группой доноров, критерий Mann–Whitney ($p < 0,05$), # – достоверное отличие по сравнению с клетками без стимуляции (к), тест Dunn ($p < 0,05$); † – достоверное отличие по сравнению с клетками, стимулированными IL-7, тест Dunn ($p < 0,05$).

Note. PsA, psoriatic arthritis; k, cells without stimulation; IL-7, cells stimulated with IL-7 (50 ng/mL); aCD127, cells pretreated with blocking antibodies against CD127 (10 μ g/mL) and stimulated with IL-7 (50 ng/mL); *, significant difference compared to the donor group, Mann–Whitney test ($p < 0.05$); #, significant difference compared to cells without stimulation (k), Dunn's test ($p < 0.05$); †, significant difference compared to cells stimulated with IL-7, Dunn's test ($p < 0.05$).

Список литературы / References

1. Блинова Е.А., Ангельская О.А., Козлов В.А. Экспрессия рецептора IL-7 на Th1-, Th17-лимфоцитах у пациентов с псориатическим артритом // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 515-520. [Blinova E.A., Angelskaya O.A., Kozlov V.A. Expression of IL-7 receptor on Th1, Th17 lymphocytes in patients with psoriatic arthritis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 515-520. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-13982-EOI.
2. Alinaghi F., Calov M., Kristensen L.E., Gladman D.D., Coates L.C., Jullien D., Gottlieb A.B., Gisoni P., Wu J.J., Thyssen J.P., Egeberg A. Prevalence of psoriatic arthritis in patients with psoriasis: A systematic review and meta-analysis of observational and clinical studies. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2019, Vol. 80, no. 1, pp. 251-265.
3. Celis R., Planell N., Fernández-Sueiro J.L., Sanmartí R., Ramírez J., González-Álvaro I., Pablos J.L., Cañete J.D. Synovial cytokine expression in psoriatic arthritis and associations with lymphoid neogenesis and clinical features. *Arthritis Res. Ther.*, 2012, Vol. 14, R93. doi: 10.1186/ar3817.
4. Ciccía F., Guggino G., Ferrante A., Cipriani P., Giacomelli R., Triolo G. Interleukin-9 and T helper type 9 cells in rheumatic diseases. *Clin. Exp. Immunol.*, 2016, Vol. 185, no. 2, pp. 125-132.
5. Crawford A., Angelosanto J.M., Kao C., Doering T.A., Odorizzi P.M., Barnett B.E., Wherry E.J. Molecular and transcriptional basis of CD4⁺ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity*, 2014, Vol. 40, no. 2, pp. 289-302.
6. Diani M., Altomare G., Reali E. T cell responses in psoriasis and psoriatic arthritis. *Autoimmun Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 4, pp. 286-292.
7. Emmungil H., İlgen U., Direskeneli R.H. Autoimmunity in psoriatic arthritis: pathophysiological and clinical aspects. *Turk. J. Med. Sci.*, 2021, Vol. 51, no. 4, pp.1601-1614.
8. Lee B.W., Moon S.J. Inflammatory Cytokines in Psoriatic Arthritis: Understanding Pathogenesis and Implications for Treatment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 14, 11662. doi: 10.3390/ijms241411662.
9. Lee L.F., Axtell R., Tu G.H., Logronio K., Dilley J., Yu J., Rickert M., Han B., Evering W., Walker M.G., Shi J., de Jong B.A., Killestein J., Polman C.H., Steinman L., Lin J.C. IL-7 promotes T(H)1 development and serum IL-7 predicts clinical response to interferon- β in multiple sclerosis. *Sci. Transl. Med.*, 2011, Vol. 3, no. 93, 93ra68. doi: 10.1126/scitranslmed.3002400.
10. Mitra A., Raychaudhuri S.K., Raychaudhuri S.P. Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2012, Vol. 14, no. 2, pp. R65. doi: 10.1186/ar3781.
11. Sato K., Suematsu A., Okamoto K., Yamaguchi A., Morishita Y., Kadono Y., Tanaka S., Kodama T., Akira S., Iwakura Y., Cua D.J., Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 12, pp. 2673-2682.
12. Schett G. Structural bone changes in spondyloarthritis: mechanisms, clinical impact and therapeutic considerations. *Am. J. Med. Sci.*, 2011, Vol. 341, no. 4, pp. 269-271.
13. Schluns K.S., Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, no. 4, pp. 269-279.
14. Weitzmann M.N., Cenci S., Rifas L., Brown C., Pacifici R. Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines. *Blood*, 2000, Vol. 96, no. 5, pp. 1873-1878.
15. Yang X.M., Dong D.Q., Li C., Yang Y.H. The effect of interleukin-7 and interleukin-15 on the production of Th1 and Th2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from patients with tuberculosis. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 2006. Vol. 29, no. 6, pp. 403-406.

Авторы:

Блинова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Ангельская О.А. — аспирант лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Blinova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Angelskaya O.A., Postgraduate Student, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Medical Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 31.03.2024

Отправлена на доработку 08.04.2024

Принята к печати 10.04.2024

Received 31.03.2024

Revision received 08.04.2024

Accepted 10.04.2024

МОДЕЛИ ОПУХОЛИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Pan02, НЕСУЩЕЙ МАРКЕР GFP, НА МЫШАХ

**Акопов С.Б., Снежков Е.В., Коновалова М.В., Костромина М.А.,
Есипов Р.С., Свирщевская Е.В.**

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

Резюме. Поиски новых методов терапии рака являются одной из актуальных задач медицины. Модели рака на животных являются необходимым методом доклинических исследований препаратов и тактик терапии рака. Целью данной работы являлся анализ роста линии клеток рака поджелудочной железы (ПЖ) мышей Pan02, несущей маркер GFP, при введении подкожно (s. c.), внутривенно (i. p.) или ортотопически в ПЖ (ortho) мышей линии C57BL/6. Реперный ген GFP встраивали в клетки Pan02 с помощью лентивирусной конструкции. Мышам вводили по 200 тыс. клеток: s. c. в правый бок; i. p. шприцем в брюшную полость или ortho хирургически под капсулу ПЖ. В динамике роста опухолей определяли вес и летальность мышей, забирали сыворотку крови для анализа антительного ответа на реперный белок GFP. На 2-ю и 4-ю недели роста опухоли часть мышей забивали и анализировали методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии экспрессию опухолевыми клетками GFP, а также состав иммунных клеток в опухоли. Показали, что при различной локализации опухоль ПЖ растет с разной скоростью и летальностью. При введении опухоли i. p. мыши теряли вес при быстром росте опухоли. В ortho модели мыши увеличивали вес за счет быстрого роста опухоли. Летальность в группах s. c. и i. p. была сравнимой. Подкожная опухоль росла медленно до объема 200–400 мм³ и останавливалась в росте. Летальности в этой группе за 2 мес. не было. При всех схемах введения формировался антительный ответ на GFP. Субпопуляционный состав иммунных клеток сильно варьировал в различных группах. Независимо от типа иммунного ответа клетки Pan02-GFP *in vivo* быстро подавляли экспрессию гена GFP или элиминировались. Полученные данные показали, что опухоль ПЖ мыши Pan02 является иммуногенной и вызывает формирование адаптивного иммунного ответа. Независимо от наличия или отсутствия иммунного ответа и элиминации GFP⁺ клеток, опухоль продолжала расти в моделях i. p. и ortho, но не при введении опухолевых клеток s. c., и вызывала гибель мышей. При проведении доклинических исследований требуется использовать несколько путей введения опухолевых клеток для получения более объективного результата.

Ключевые слова: терапия рака, модели рака на животных, опухоль поджелудочной железы, Pan02, GFP, ортотопическая модель

Адрес для переписки:

Свирщевская 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. Svirshchetskaya
Shemyakin–Obchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences
16/10 Miklukho-Maklaya St
Moscow
117997 Russian Federation
Phone: +7 (910) 464-87-60.
E-mail: esvir@mail.ibch.ru

Образец цитирования:

С.Б. Акопов, Е.В. Снежков, М.В. Коновалова,
М.А. Костромина, Р.С. Есипов, Е.В. Свирщевская
«Модели опухоли поджелудочной железы Pan02,
несущей маркер GFP, на мышах» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 1099-1106.
doi: 10.15789/1563-0625-PPT-16858

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

For citation:

S.B. Akopov, E.V. Snezhkov, M.V. Konovalova,
M.A. Kostromina, R.S. Esipov, E.V. Svirshchetskaya “Pan02
pancreatic tumor models carrying the GFP marker in mice”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1099-1106.
doi: 10.15789/1563-0625-PPT-16858

© Akopov S.B. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-PPT-16858

Pan02 PANCREATIC TUMOR MODELS CARRYING THE GFP MARKER IN MICE

Akopov S.B., Snezhkov E.V., Konovalova M.V., Kostromina M.A., Esipov R.S., Svirshchevskaya E.V.

Shemyakin–Obchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Animal tumor models are used for preclinical studies of drugs and cancer therapy. The aim of this work was to analyze the growth of murine pancreatic tumor cells Pan02, carrying GFP marker, injected subcutaneously (s. c.), intraperitoneally (i. p.) or orthotopically into the pancreas (ortho) of C57BL/6 mice. Mice were injected with 2×10^5 cells: s. c. in the right flank; i. p. with a syringe into the abdominal cavity, or ortho surgically under the pancreas capsule. The weight of mice was determined in the dynamics of tumor growth, and blood serum was taken to analyze the antibody response to the GFP reference protein. At the 2nd and 4th weeks of tumor growth, some mice were slaughtered and the expression of GFP by the tumor cells, as well as the composition of the immune cells in the tumor, were analyzed by flow cytometry and confocal microscopy. It was shown that with the different localization, the pancreatic tumors grew at different rates and lethality. When the tumor was injected i. p., mice lost weight with rapid tumor growth. In the ortho model, the mice increased their weight. Mortality in the s. c. and i. p. groups was comparable. In the s. c. model, the tumor grew slowly to a volume of 200–400 mm³ and stopped growing. There was no mortality in this group during the follow-up period (2 months). The same antibody response to GFP was formed with all injection schemes. The subpopulation composition of immune cells varied greatly in the different models of tumor cell administration. Regardless of the type of immune response, Pan02-GFP cells rapidly suppressed GFP gene expression *in vivo*. The data obtained showed that murine pancreatic tumor Pan02 is immunogenic and causes the formation of an adaptive immune response. Regardless of the presence or absence of an immune response and elimination of GFP⁺ cells, the tumor continued to grow in the i. p. and ortho models, but not in the s. c. one, and caused the death of mice. When conducting preclinical studies, it is necessary to use several ways of tumor cell injection to obtain a more objective result.

Keywords: cancer therapy, animal cancer models, pancreatic tumor, Pan02, GFP, orthotopic model

Введение

Аденокарцинома поджелудочной железы (ПЖ) является смертельным заболеванием и второй по значимости причиной смерти от рака в ряде стран. Рак часто диагностируется на поздней стадии, что приводит к 2–10%-ной выживаемости в течение 5 лет. Карцинома ПЖ занимает последнее место среди всех локализаций рака с точки зрения прогноза выживаемости пациентов [8]. Его трудно диагностировать на ранней стадии, что связано с отсутствием специфических симптомов заболевания и непосредственной близостью крупных кровеносных сосудов, способствующих метастазированию опухоли [2]. В настоящее время хирургическая резекция является единственным методом лечения рака ПЖ. При этом частота рецидивов высока, а до 80–85% опухолей не поддаются резекции на момент их диагностики [3, 4, 9]. Разрабатываются методы комбинированного лечения, включающие хирургию и химиотерапию, а также различные протоколы адъювантной терапии резектабельного, погранично-резектабельного и местнораспространенного рака ПЖ.

Для снижения риска неудачи новых методов терапии используются модели на животных. В работе Вој и соавт. предложено использовать органоиды из нормальных и неопластических тканей ПЖ мыши и человека, полученные из удаленных опухолей и биоптатов [1]. Авторы показали, что ортотопически пересаженные органоиды воспроизводят полный спектр развития опухоли.

Экспериментальные модели на мышах сыграли центральную роль в понимании патобиологии рака ПЖ. Мышиные модели включают гетеротопические и ортотопические ксенотрансплантаты с использованием иммунодефицитных мышей; генно-инженерные сингенные модели с мутациями такими, как KRAS и включающие флуоресцентные метки, что позволяет моделировать молекулярные и патологические признаки рака ПЖ [7]. Сингенные мышиные модели используются для оценки эффективности иммунотерапии и изучения эффектов такой терапии на иммунную систему.

Целью данной работы было провести сравнительный анализ роста опухоли ПЖ мыши Pan02, ген-модифицированной зеленым флуоресцент-

ным белком GFP, при введении опухолевых клеток подкожно, внутривенно и ортотопически в ПЖ мыши.

Материалы и методы

Клеточные линии

В работе использовали линию клеток рака ПЖ Pan02 (коллекция ИБХ РАН). Клетки инкубировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной фетальной телячьей сыворотки (FCS), антибиотиков и L-глутамина (все от НПП «ПанЭко», Москва) в инкубаторе с 5% CO₂ при температуре 37 °С. Клетки пассировали путем трипсинизации с использованием раствора трипсин/ЭДТА (НПП «ПанЭко», Москва) два раза в неделю.

Трансдукция клеток Pan02 геном GFP

Для получения клеток со встроенным геном GFP использовали лентивирусную трансдукцию. Надсадок клеток (50 мкл), продуцирующих лентивирусы (ЗАО «Евроген», Москва), добавляли к клеткам Pan02, обработанных гексадиметрина бромидом (Sigma, США), и инкубировали 2 суток. После этого меняли среду и добавляли селективный антибиотик пурамицин (5 мкг/мл) (Sigma, США) и инкубировали 3 суток. Появление GFP⁺ клеток определяли с помощью конфокальной микроскопии. Полученную культуру сортировали на приборе BD FACSAria™ III Cell Sorter (США). Выделенную фракцию выращивали и использовали для перевивания мышам.

Мыши

Самки мышей линии C57BL/6 в возрасте 8-12 недель были получены из питомника «Столбовая» (Московская обл., Россия). Протокол одобрен Институтской ком. Иссией по уходу и использованию животных (IACUC) Центра исследований животных ИБХ РАН (протокол № 325 от 14.06.2021). Животных содержали по 5 мышей в клетки с неограниченным доступом к воде и корму.

Мышей делили на 4 группы по 10 мышей в группе. Группе 1 вводили опухолевые клетки Pan02-GFP (2×10^5 /мышь в 50 мкл культуральной среды) s. c. в правый бок. Шерсть в области инъекции предварительно удаляли депилятором. Группе 2 клетки в том же количестве вводили инсулиновым шприцом в брюшную полость. Группе 3 клетки вводили под капсулу ПЖ. Для этого мышам давали наркоз золетил/ксилонин, вскрывали в асептических условиях по средней линии кожу и брюшину (разрез 1 см), стерильной ватной палочкой вытягивали ПЖ и вводили клетки в 50 мкл под капсулу. Результат регистрировали по вздутию пузырька в месте введения. ПЖ возвращали на место, брюшину и кожу зашивали, обрабатывали оперативное место хлоргексидином

и йодом. Все прооперированные мыши вышли из наркоза.

До и каждую неделю после введения опухолевых клеток мышей взвешивали. На 2-ю и 4-ю неделю роста опухоли по 2 мыши из каждой группы забивали для выделения опухоли. Кровь забирала пункцией из сердца мышей, отделяли сыворотку и замораживали ее до анализа.

Культуры опухолевых клеток

Выделенные опухоли (300-500 мг) гомогенизировали в стерильных условиях на металлических ситечках, промывали фосфатным буфером (ФБ) 2 раза, переводили в полную культуральную среду и разносили по 6-луночным планшетах. Клетки культивировали до полной очистки от мертвых опухолевых, стромальных, иммунных клеток (1-2 недели), после чего трипсинили и анализировали экспрессию GFP.

Проточная цитометрия

Для анализа методом проточной цитометрии клетки из культур снимали трипсином, отмывали ФБ, переводили в ФБ с 1% бычьего альбумина и 0,05% азида натрия (ФБА) и анализировали на проточном цитометре FACsCalibur (BD, США). Результаты обработаны в программе FlowJo v. 10 (BD, Колумбус, Огайо, США).

Для анализа субпопуляций опухоли-ассоциированных лимфоцитов опухолевую ткань гомогенизировали в буфере, содержащем коллагеназу, диспазу и ДНКазу (Sigma-Aldrich, США), отмывали в ФР с 5%-ной бычьей сывороткой, переводили в ФБА и метили антителами к маркерам лимфоцитов CD4, CD8, CD19, CD11b, CD49b, PD1, прямомеченных флуорофорами (Miltenyi, Германия). Анализировали на проточном цитометре FACsCalibur.

Конфокальная микроскопия

Для проведения конфокальной микроскопии клеток, выделенных из опухолей, клетки высевали на стерильные покровные стекла, помещенные в 6-луночные планшеты (Costar, США) и инкубировали в течение ночи. Затем клетки промывали в ФБ, 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).

Иммуноферментный анализ

Для анализа продукции антител к белку GFP использовали готовый набор (ООО «БелкиАнтитела», Москва). Для блокирования неспецифического связывания использовали ФБ с 2% бычьего альбумина. Между всеми инкубациями планшет трижды промывали ФБ, содержащим 0,05% Твин-20. Сыворотки добавляли в разных

разведениях. Планшеты инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре. Для выявления IgG использовали вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена (Abcam, Кембридж, Великобритания). 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, превышающему 3 стандартных отклонения от фона. Результаты анализа показаны в виде оптической плотности (O.D. 450 нм).

Статистический анализ

Графики созданы с использованием программного обеспечения MS Excel и представлены как среднее значение \pm SEM 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

Потеря *in vivo* опухолевыми клетками гена GFP

Для получения флуоресцентно-меченых клеток ПЖ мыши Pan02-GFP использовали лентивирусную трансдукцию. После сортировки была получена стабильная линия клеток с высоким уровнем свечения (рис. 1А). Методом конфокальной микроскопии подтвердили флуоресценцию клеток Pan02-GFP (рис. 1Б).

Мышам перевивали клетки Pan02-GFP как описано в методах. По две мышки из каждой группы вскрывали на 2-ю и 4-ю недели роста опухоли. Начиная с 3-й недели в группах ortho и i. p., но не в группе s. c., начался падеж мышей. Поэтому на 5-ю неделю забили всех оставшихся мышей. В длительных культурах опухолей постепенно наблюдалась очистка культуры от мертвых

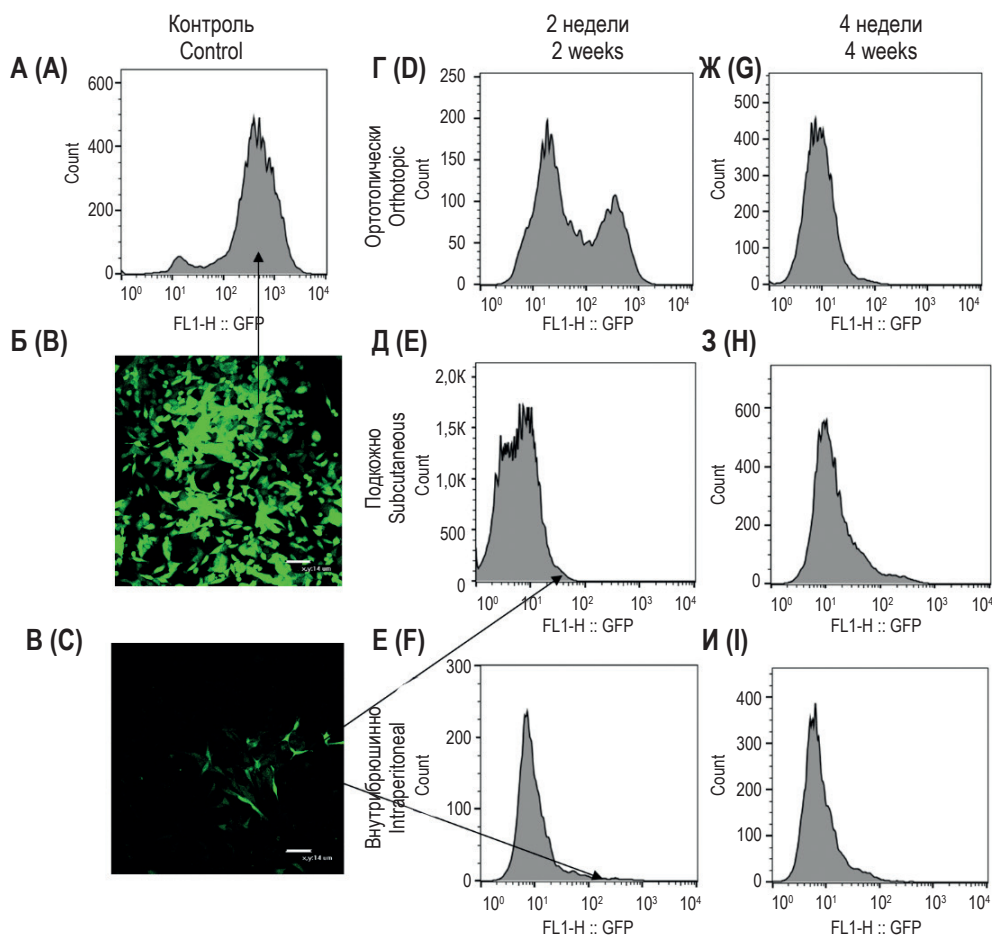


Рисунок 1. Экспрессия GFP клетками Pan02-GFP *in vitro* (А, Б) и *ex vivo* через 2 и 4 недели после начала роста опухоли в моделях перевивки ортотопически под капсулу поджелудочной железы (Г, Ж), подкожно (Д, З) и внутривнутрибрюшинно (В, Е, Д). Шкала 30 мкм.

Figure 1. Expression of GFP by Pan02-GFP cells *in vitro* (A, B) and *ex vivo* 2 and 4 weeks after the onset of tumor growth in models of transplantation orthotopically under the capsule of the pancreas (D, G), subcutaneously (E, H) and intraperitoneally (C, F, E). Scale 30 μ m.

и не пролиферирующих клеток. Анализ экспрессии GFP культурами клеток *ex vivo* показал практически полную потерю GFP⁺ клеток или подавление экспрессии гена GFP уже на 2-ю неделю в группах s. c. и i. p. (рис. 1Д, Е) и ~ 60% потерю в группе ortho (рис. 1Г). К 4 неделям во всех группах опухолевые клетки высевались *ex vivo*, пролиферировали, имели вид обычных клеток Pan02, но не экспрессировали GFP (рис. 1Ж, 3, И). Малая остаточная популяция GFP⁺ клеток в культурах опухолей s. c. и i. p. групп регистрировалась как методом проточной цитометрии (рис. 1, стрелки), так и методом конфокальной микроскопии (рис. 1В).

Иммуногенность Pan02-GFP

Мыши по-разному переносили рост опухоли. Поскольку объем ортотопических и внутрибрюшинных опухолей померить нельзя, то ориенти-

ровались на вес мышей. Для сравнения приводим вес интактных мышей (рис. 2А). Показали, что мыши из группы s. c. по весу не отличались от интактных мышей. Опухоль была маленькой и замедляла рост. Ранее мы анализировали рост клеток Pan02 без GFP в мышцах и показали, что опухоль также растет медленно [12]. Сравнение скорости роста при s. c. имплантации клеток Pan02 и Pan02-GFP не выявило различий.

В отличие от группы s. c., рост опухоли в брюшной полости и в ПЖ был бурным. При этом при большом объеме опухоли в брюшной полости мыши худели и, в конечном итоге, погибали (рис. 2А). Мыши с ортотопической опухолью выглядели значительно лучше, не отличались от интактных мышей по внешнему виду и поведению, но увеличивались в весе за счет быстрого роста опухоли (рис. 1А). Гибель мышей наступала так-

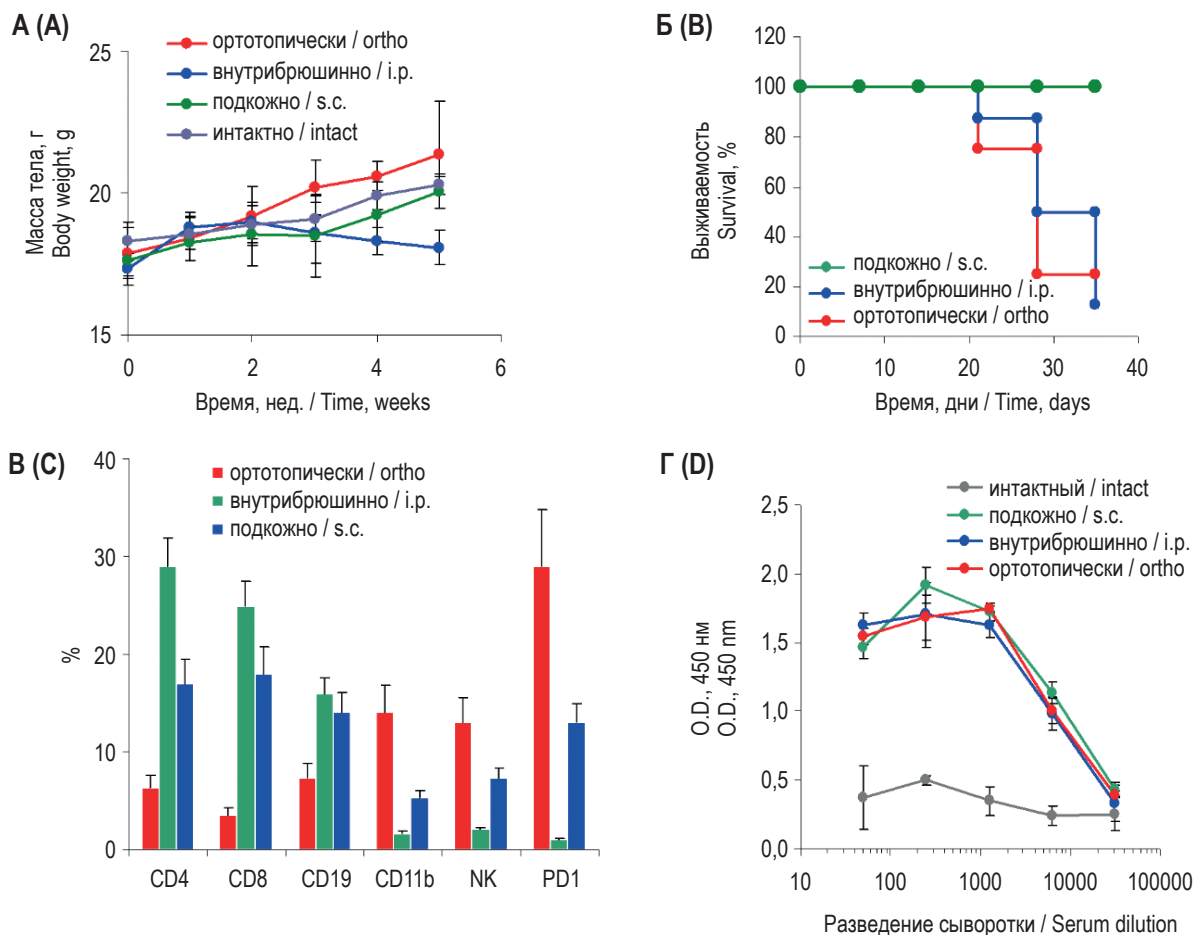


Рисунок 2. Характеристика роста клеток Pan02-GFP, перевитых ортотопически под капсулу поджелудочной железы (ortho), подкожно (s. c.) и внутрибрюшинно (i. p.). А – изменение массы тела мышей с момента начала роста опухоли. Б – выживание мышей в разных группах. В – субпопуляционный состав опухоли-ассоциированных лимфоцитов разных групп через 4 недели роста опухоли. Г – продукция антител к белку GFP в крови мышей разных групп.

Figure 2. Characteristics of the growth of Pan02-GFP cells transplanted orthotopically under the capsule of the pancreas (ortho), subcutaneously (s. c.) and intraperitoneally (i. p.). A, change in the body weight of mice after the onset of the tumor growth. B, survival of the mice in different groups. C, the subpopulation composition of tumor-associated lymphocytes in different groups after 4 weeks of tumor growth. D, production of antibodies to the GFP protein in the blood of mice from different groups.

же на 3-й неделе роста опухоли. На 5-ю неделю всех выживших к этому времени мышей забили, опухоли выделили и проанализировали субпопуляционный состав опухоли-ассоциированных лимфоцитов и экспрессию опухолевыми клетками GFP.

Показали, что максимальная летальность была в группе ortho; практически такая же летальность была в группе i. p.; все мыши выжили в группе s. c. (рис. 2Б).

Анализ инфильтрирующих опухоль лимфоцитов показал значительную гетерогенность популяций в разных группах. Максимальный Т-клеточный ответ зарегистрировали в группе i. p. (рис. 2В), где пул лимфоидных клеток до 50% состоял из CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов. В группе s. c. до 30% также составляли CD4⁺ и CD8⁺ лимфоциты. В группе ortho большую часть составляли макрофаги CD11b⁺ и натуральные киллеры CD49b⁺ (NK) (рис. 2В), что значительно отличается от двух других групп. Интересно, что на 30% лимфоидных клеток в ortho группе был экспрессирован белок клеточной смерти PD1, что, по-видимому, и объясняет отсутствие Т-клеток в ПЖ.

Анализ антител к GFP показал эффективный сравнимый иммунный адаптивный ответ во всех трех группах мышей (рис. 2Г). Продукция антител к реперному белку GFP показывает формирование адаптивного иммунного ответа на опухоль. Несмотря на это, опухоль продолжала расти в моделях ortho и i. p. и приводила к гибели мышей.

В последние годы терапия, направленная на белки клеточной смерти PD1 и его лиганд PD-L1, зарекомендовала себя как успешная для разных форм рака. Попытки использования антител к PD1 и PD-L1 при метастатическом раке ПЖ активно ведутся большими коллективами авторов [6, 10, 11, 13], но пока с ограниченным успехом. Полученные нами данные показывают, что моделирование рака при введении опухоли ортотопи-

чески и внутрибрюшинно позволит проанализировать эффекты анти PD1/PD-L1 терапии как на исходную опухоль, так и на метастазы. В работе Но и соавт. использовали клетки Pan02, введенные в селезенку для моделирования метастазирующего рака ПЖ [5].

Заключение

Аденокарцинома ПЖ остается одной из самых агрессивных форм рака, с поздней диагностикой, высокой летальностью и отсутствием эффективного лечения распространенного метастазирующего рака. Поиск новых химиопрепаратов, адъювантной терапии, иммунных методов предупреждения рака ПЖ является актуальной задачей медицины и биологии. В данной работе показано различие роста опухоли ПЖ при введении опухолевых клеток подкожно, внутрибрюшинно и ортотопически в ПЖ. Подкожное введение, наиболее часто используемое в биологических экспериментах, не отражает реальной клинической ситуации. Альтернативой может являться внутрибрюшинное введение, не требующее оперативного вмешательства для моделирования рака ПЖ. При ортотопическом и внутрибрюшинном введении нет возможности измерить объем опухоли, что осложняет работу исследователей, но во всех случаях можно ориентироваться на летальность мышей разных групп.

Нами показано, что опухоль Pan02-GFP является иммуногенной и вызывает адаптивный иммунный ответ, распознающий белки опухоли, в частности GFP. Элиминация или ингибирование экспрессии гена GFP показывает, что при раке ПЖ идет быстрый селективный процесс, что ассоциировано с метастазированием рака.

Благодарности

Выражаем благодарность Ольге Дмитриевне Коцаревой (ИБХ РАН, Москва) за помощь в работе с мышами.

Список литературы / References

1. Boj S.F., Hwang C.I., Baker L.A., Chio I.I., Engle D.D., Corbo V., Jager M., Ponz-Sarvis M., Tiriach H., Spector M.S., Gracanin A., Oni T., Yu K.H., van Boxtel R., Huch M., Rivera K.D., Wilson J.P., Feigin M.E., Öhlund D., Handly-Santana A., Ardito-Abraham C.M., Ludwig M., Elyada E., Alagesan B., Biffi G., Yordanov G.N., Delcuze B., Creighton B., Wright K., Park Y., Morsink F.H., Molenaar I.Q., Borel Rinkes I.H., Cuppen E., Hao Y., Jin Y., Nijman I.J., Iacobuzio-Donahue C., Leach S.D., Pappin D.J., Hammell M., Klimstra D.S., Basturk O., Hruban R.H., Offerhaus G.J., Vries R.G., Clevers H., Tuveson D.A. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*, 2015, Vol. 160, no. 1-2, pp. 324-338.
2. Canto M.I., Harinck F., Hruban R.H., Offerhaus G.J., Poley J.W., Kamel I., Nio Y., Schulick R.S., Bassi C., Kluijdt I., Levy M.J., Chak A., Fockens P., Goggins M., Bruno M.; International Cancer of Pancreas Screening (CAPS) Consortium. International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut*, 2013. Vol. 62, no. 3, pp. 339-347.
3. Crowley F., Gandhi S., Rudsteyn M., Sehmbhi M., Cohen D.J. Adherence to NCCN genetic testing guidelines in pancreatic cancer and impact on treatment. *Oncologist*, 2023. Vol. 28, no. 6, pp. 486-493.

4. Gugenheim J., Crovetto A., Petrucciani N. Neoadjuvant therapy for pancreatic cancer. *Updates Surg.*, 2022. Vol. 74, no. 1, pp. 35-42.
5. Ho T.T.B., Nasti A., Seki A., Komura T., Inui H., Kozaka T., Kitamura Y., Shiba K., Yamashita T., Yamashita T., Mizukoshi E., Kawaguchi K., Wada T., Honda M., Kaneko S., Sakai Y. Combination of gemcitabine and anti-PD-1 antibody enhances the anticancer effect of M1 macrophages and the Th1 response in a murine model of pancreatic cancer liver metastasis. *J. Immunother. Cancer*, 2020. Vol. 8, no. 2, e001367. doi: 10.1136/jitc-2020-001367.
6. Li K., Tandurella J.A., Gai J., Zhu Q., Lim S.J., Thomas D.L. 2nd, Xia T., Mo G., Mitchell J.T., Montagne J., Lyman M., Danilova L.V., Zimmerman J.W., Kinney-Köster B., Zhang T., Chen L., Blair A.B., Heumann T., Parkinson R., Durham J.N., Narang A.K., Anders R.A., Wolfgang C.L., Laheru D.A., He J., Osipov A., Thompson E.D., Wang H., Fertig E.J., Jaffee E.M., Zheng L. Multi-omic analyses of changes in the tumor microenvironment of pancreatic adenocarcinoma following neoadjuvant treatment with anti-PD-1 therapy. *Cancer Cell*, 2022, Vol. 40, no. 11, pp. 1374-1391.e7.
7. Mallya K., Gautam S.K., Aithal A., Batra S.K., Jain M. Modeling pancreatic cancer in mice for experimental therapeutics. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, 2021, Vol. 1876, no. 1, 188554. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188554.
8. McGuigan A., Kelly P., Turkington R.C., Jones C., Coleman H.G., McCain R.S. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J. Gastroenterol.*, 2018, Vol. 24, no. 43, pp. 4846-4861.
9. O'Reilly D., Fou L., Hasler E., Hawkins J., O'Connell S., Pelone F., Callaway M., Campbell F., Capel M., Charnley R., Corrie P., Elliot D., Goodburn L., Jewell A., Joharchi S., McGeeney L., Mukherjee S., Oppong K., Whelan P., Primrose J., Neoptolemos J. Diagnosis and management of pancreatic cancer in adults: A summary of guidelines from the UK National Institute for Health and Care Excellence. *Pancreatol.*, 2018, Vol. 18, no. 8, pp. 962-970.
10. Piper M., Hoen M., Darragh L.B., Knitz M.W., Nguyen D., Gadwa J., Durini G., Karakoc I., Grier A., Neupert B., van Court B., Abdelazeem K.N.M., Yu J., Olimpo N.A., Corbo S., Ross R.B., Pham T.T., Joshi M., Kedl R.M., Saviola A.J., Amann M., Umaña P., Codarri Deak L., Klein C., D'Alessandro A., Karam S.D. Simultaneous targeting of PD-1 and IL-2R β with radiation therapy inhibits pancreatic cancer growth and metastasis. *Cancer Cell*, 2023, Vol. 41, no. 5, pp. 950-969.e6.
11. Pushalkar S., Hundeyin M., Daley D., Zambirinis C.P., Kurz E., Mishra A., Mohan N., Aykut B., Usyk M., Torres L.E., Werba G., Zhang K., Guo Y., Li Q., Akkad N., Lall S., Wadowski B., Gutierrez J., Kochen Rossi J.A., Herzog J.W., Diskin B., Torres-Hernandez A., Leinwand J., Wang W., Taunk P.S., Savadkar S., Janal M., Saxena A., Li X., Cohen D., Sartor R.B., Saxena D., Miller G. The pancreatic cancer microbiome promotes oncogenesis by induction of innate and adaptive immune suppression. *Cancer Discov.*, 2018, Vol. 8, no. 4, pp. 403-416.
12. Svirshchevskaya E.V., Konovalova M.V., Snezhkov E.V., Poltavtseva R.A., Akopov S.B. Chemokine homeostasis in healthy volunteers and during pancreatic and colorectal tumor growth in murine models. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2022, Vol. 44, no. 10, pp. 4987-4999.
13. Yamamoto K., Venida A., Yano J., Biancur D.E., Kakiuchi M., Gupta S., Sohn A.S.W., Mukhopadhyay S., Lin E.Y., Parker S.J., Banh R.S., Paulo J.A., Wen K.W., Debnath J., Kim G.E., Mancias J.D., Fearon D.T., Perera R.M., Kimmelman A.C. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature*. 2020, Vol. 581, no. 7806, pp. 100-105.

Авторы:

Акопов С.Б. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории структуры и функций генов человека ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

Снежков Е.В. — к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории структуры и функций генов человека ФГБУН «Институт биоорганической химии имени 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 имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

Authors:

Akopov S.B., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of the Structure and Functions of Human Genes, Shemyakin–Obchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Snezhkov E.V., PhD (Chemistry), Senior Research Associate, Laboratory of the Structure and Functions of Human Genes, Shemyakin–Obchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Konovalova M.V., PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin–Obchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

Есипов Р.С. — д.б.н., заведующий лабораторией биофармацевтических технологий ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

Свиричевская Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

Kostromina M.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Biopharmaceutical Technologies, Shemyakin–Obchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Esipov R.S., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Biopharmaceutical Technologies, Shemyakin–Obchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Svirshchevskaya E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin–Obchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 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

СИНТЕТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК СПЕЦИФИЧЕСКИ ПОДАВЛЯЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ (IL-25 И TSLP) В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

Каганова М.М.¹, Шиловский И.П.¹, Тимотиевич Е.Д.¹, Юмашев К.В.¹,
Гурский Д.А.^{1,2}, Виноградова К.В.^{1,2}, Попова М.В.^{1,3}, Хаитов М.Р.^{1,3}

¹ ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Аллергический ринит (АР) – воспалительное заболевание верхних дыхательных путей (слизистой оболочки носовой полости). От АР в мире страдают до 40% населения, в Российской Федерации заболеваемость находится на уровне 18-30% в зависимости от региона. Несмотря на то, что АР не является тяжелой патологией, он наносит значительный экономический ущерб. Другая опасность этого заболевания состоит в том, что в 40% случаев у пациентов с АР впоследствии развивается более тяжелая инвалидизирующая патология – БА. Широкая распространенность и значительные экономические потери, обусловленные АР, определяют значимость разработки новых способов профилактики и контроля данного заболевания, так как существующих способов лечения недостаточно. Однако поиск новых способов терапии невозможен без детального изучения молекулярных механизмов патогенеза АР. Длительное время считалось, что данное аллергическое воспаление формируется по Th2-зависимому механизму с участием Th2-лимфоцитов, В-клеток и эозинофилов и выделяемых ими провоспалительных цитокинов: IL-4, IL-5 и IL-13. Однако на данный момент накоплены экспериментальные доказательства участия эпителиальных клеток респираторного тракта и выделяемых ими провоспалительных цитокинов (IL-25, IL-33 и TSLP) в патогенезе АР и БА. Было показано, что IL-25 индуцирует выработку IL-4, IL-5 и IL-13, направляя иммунный ответ по Th2-типу. При этом мыши с инактивированным IL-25 практически не развивают Th2-иммунный ответ. Инактивация IL-33 значительно снижает уровень воспаления (опосредованного эозинофилами) респираторно-

Адрес для переписки:

Каганова Мария Михайловна
ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.
Тел.: 8 (495) 441-67-10.
E-mail: mariya.kaganova.99@mail.ru

Address for correspondence:

Mariya M. Kaganova
National Research Center – Institute of Immunology,
Federal Medical-Biological Agency
24 Kashirskoe Highway
Moscow
115522 Russian Federation
Phone: +7 (495) 441-67-10.
E-mail: mariya.kaganova.99@mail.ru

Образец цитирования:

М.М. Каганова, И.П. Шиловский, Е.Д. Тимотиевич, К.В. Юмашев, Д.А. Гурский, К.В. Виноградова, М.В. Попова, М.Р. Хаитов «Синтетические молекулы малых интерферирующих РНК специфически подавляют экспрессию генов провоспалительных цитокинов (IL-25 и TSLP) в экспериментах *in vitro*» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 1107-1114. doi: 10.15789/1563-0625-SSI-16795

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

For citation:

M.M. Kaganova, I.P. Shilovskiy, E.D. Timotievich, K.V. Yumashev, D.A. Gurskii, K.V. Vinogradova, M.V. Popova, M.R. Khaitov “Synthetic small interfering RNAs selectively suppress the expression of proinflammatory cytokine genes (IL-25 and TSLP) in experiments *in vitro*”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1107-1114. doi: 10.15789/1563-0625-SSI-16795

© Kaganova M.M. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-SSI-16795

го тракта. Мыши, нокаутные по рецептору цитокина TSLP, не развивали назальную гиперреактивность в ответ на аллерген, однако уровень воспаления слизистой оболочки носа оставался высоким. Сейчас активно ведутся работы по созданию новых лекарственных средств, способных специфично блокировать активность перечисленных цитокинов; прежде всего лекарственных средств на основе нейтрализующих моноклональных антител. Однако существуют и другие технологии, при помощи которых можно регулировать активность генов, например технология, основанная на феномене РНК-интерференции. С ее помощью можно подавить экспрессию любого гена с известной нуклеотидной последовательностью, в том числе генов, кодирующих провоспалительные цитокины.

Учитывая вышесказанное, целью данной работы было проектирование синтетических молекул миРНК и изучение их способности специфически блокировать экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины IL-25 и TSLP, в экспериментах *in vitro*.

Ключевые слова: миРНК, РНК-интерференция, цитокины, воспаление, IL-25, IL-33, TSLP

SYNTHETIC SMALL INTERFERING RNAS SELECTIVELY SUPPRESS THE EXPRESSION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES (IL-25 AND TSLP) IN EXPERIMENTS *IN VITRO*

Kaganova M.M.^a, Shilovskiy I.P.^a, Timotievich E.D.^a, Yumashev K.V.^a, Gurskii D.A.^{a, b}, Vinogradova K.V.^{a, b}, Popova M.V.^{a, c}, Khaitov M.R.^{a, c}

^a National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

^b K. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Allergic rhinitis (AR) is an inflammatory disease of the upper respiratory tract (nasal mucosa). AR affects up to 40% of the world's population; in the Russian Federation, the incidence is 18% to 30%, depending on the region. Despite the fact that AR is not a severe pathology, it causes significant economic burden. Another threat associated with this disease is that in 40% of cases, patients with AR eventually develop a more severe disabling pathology – AD. Widespread prevalence and significant economic disadvantages caused by AR determine the importance of developing new ways of prevention and control of this disease, as the existing methods of therapy are insufficient. However, the search for new ways of therapy is impossible without a detailed investigation of the molecular mechanisms of AR pathogenesis. For a long time it was considered that this allergic inflammation is formed by Th2-dependent mechanism with involvement of Th2-lymphocytes, B-cells and eosinophils and pro-inflammatory cytokines: IL-4, IL-5 and IL-13. However, experimental evidence has now accumulated on the role of epithelial cells of the respiratory tract and the proinflammatory cytokines they secrete (IL-25, IL-33 and TSLP) in the pathogenesis of AR and AD. IL-25 has been shown to induce the production of IL-4, IL-5 and IL-13, directing a Th2-type immune response. At the same time, mice with inactivated IL-25 developed barely any Th2-immune response. Inactivation of IL-33 significantly reduces inflammation (mediated by eosinophils) of the respiratory tract. Mice knockout for the cytokine receptor TSLP did not develop nasal hyperreactivity in response to allergen, but the level of nasal mucosal inflammation remained high. Currently, work is actively progressing on the development of new drugs capable of specifically blocking the activity of the listed cytokines; first of all, drugs based on neutralizing monoclonal antibodies. However, there are other technologies that can be used to regulate the activity of genes, such as the technology based on the RNA interference. It can be used to suppress the expression of any gene with a known nucleotide sequence, including genes encoding pro-inflammatory cytokines.

Considering the above, the aim of this work was to design synthetic miRNA molecules and study their ability to specifically block the expression of genes encoding proinflammatory cytokines IL-25 and TSLP in experiments *in vitro*.

Keywords: siRNA, RNA interference, cytokines, inflammation, IL-25, IL-33, TSLP

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 23-45-10031).

Введение

Одними из самых распространенных аллергопатологий считаются аллергический ринит (АР) и бронхиальная астма (БА). От АР в мире страдают до 40% населения [3], в России – от 18-38% в зависимости от региона [1]. В отдельных странах заболеваемость БА достигает 18%, в России – около 7% [1]. Продолжающийся рост заболеваемости свидетельствует о том, что существующих способов лечения недостаточно, поэтому актуальна разработка новых безопасных и эффективных средств борьбы с этими заболеваниями [3], но она невозможна без детального изучения механизма патологии.

Патогенез обоих заболеваний (АР и БА) связан с развитием аллергического воспаления в верхних (в случае АР) и нижних (в случае БА) дыхательных путях. Длительное время считалось, что это воспаление формируется по Th2-зависимому механизму с участием Th2-лимфоцитов, В-клеток и эозинофилов и выделяемых ими провоспалительных цитокинов (IL-4, IL-5 и IL-13) [2]. На данный момент накоплены экспериментальные доказательства участия эпителиальных клеток респираторного тракта и выделяемых ими провоспалительных цитокинов (IL-25, IL-33 и TSLP) в патогенезе АР и БА [6].

Было показано, что IL-25 индуцирует выработку IL-4, IL-5 и IL-13, направляя иммунный ответ по Th2-типу [10]. Мыши с инактивированным IL-25 практически не развивают Th2-иммунный ответ. В то же время интраназальное введение рекомбинантного IL-25 мышам приводит к формированию аллергического воспаления даже в отсутствие Т- и В-клеток [4]. Множество исследований подтвердило значимость IL-33 в развитии аллергии. Его инактивация значительно снижает уровень воспаления (опосредованного эозинофилами) респираторного тракта [6]. TSLP также вовлечен в развитие аллергии. Мыши, нокаутные по рецептору этого цитокина, не развивали назальную гиперреактивность в ответ на аллерген, однако уровень воспаления слизистой оболочки носа оставался высоким [6].

Учитывая ключевую роль указанных провоспалительных цитокинов в патогенезе аллергического воспаления, активно ведутся работы по созданию новых лекарственных средств, способных специфично блокировать их активность; прежде всего лекарственных средств на основе нейтрализующих моноклональных антител [7].

Однако существуют и другие технологии, при помощи которых можно регулировать ак-

тивность генов, например технология, основанная на феномене РНК-интерференции. Под РНК-интерференцией понимают механизм негативной регуляции экспрессии генов при помощи молекул малых интерферирующих РНК (миРНК). Молекулы миРНК размером 21 п.н. специфически нацеливаются на мРНК генов-мишеней, после чего при помощи ферментов клетки осуществляется деградация мРНК, и подавляется экспрессия соответствующего гена [9]. При помощи РНК-интерференции можно подавить экспрессию любого гена с известной нуклеотидной последовательностью, в том числе генов, кодирующих провоспалительные цитокины.

Ранее нашим коллективом были созданы молекулы миРНК, способные подавлять экспрессию гена *IL33* мыши в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В модели вирус-индуцированных обострений БА у мышей ингаляционное введение миРНК против *IL33* приводило к уменьшению выраженности аллергического воспаления легких, опосредованного эозинофилами [8]. Эти результаты подтверждают перспективность применения технологии РНК-интерференции для разработки противовоспалительных препаратов.

Учитывая вышесказанное, **целью данной работы** было проектирование синтетических молекул миРНК и изучение их способности специфически блокировать экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины IL-25 и TSLP, в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы

Питательные среды и растворы

Полная среда DMEM (НПП «ПанЭко», Россия) содержала: 25 mM HEPES (НПП «ПанЭко», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 300 мг/л L-глутамин (НПП «ПанЭко», Россия) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США). Бессывороточная среда DMEM содержала 25 mM HEPES (НПП «ПанЭко», Россия), 300 мг/л L-глутамин (НПП «ПанЭко», Россия) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США).

Лизирующий буфер готовили путем растворения в 100 мл дистиллированной воды 42,7 г гуанидин-тиоцината (Biochemica, Германия). Данным буфером лизировали клетки для последующего выделения общей РНК и постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Проектирование молекул миРНК против генов, кодирующих IL-25 и TSLP мыши

Для проектирования миРНК использовалась программа OligoWalk (программное обеспечение второго поколения) и последовательности генов *IL25* и *Tslp*, опубликованные в базе данных GeneBank (BC120568.1; AF232937.1). Было

спрогнозировано 19 различных вариантов молекул миРНК против разных частей гена *IL25* и 96 против *Tslp*, из которых для синтеза и тестирования было отобрано 5 вариантов миРНК против гена *IL25* мыши и 6 вариантов против гена *Tslp* мыши. Синтез спроектированных молекул осуществлено твердофазным методом в компании ООО «Синтол» (Россия).

Скрининг биологической активности миРНК *in vitro*

Скрининг биологической активности синтезированных миРНК проведен на культуре клеток L929 (фибробласты мыши) и дополнительно на культуре клеток NIH3T3 (эмбриональные фибробласты мыши), конститутивно экспрессирующих целевые гены *IL25* и *Tslp*.

Клеточную линию фибробластов мыши L929 (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) культивировали в полной среде DMEM (НПП «ПанЭко», Россия). Клетки высевали в 24-луночные культуральные планшеты в количестве 1×10^5 клеток/лунку в полной среде DMEM и культивировали (37 °C, 5% CO₂) в течение 24 ч. Клетки трансфецировали 1 мкг миРНК, с использованием Lipofectamine 3000 (Life Technologies, США) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве отрицательного контроля использовали миРНК против гена *gfp*, кодирующего зеленый флуоресцирующий белок (siGFP). Через 24 ч после трансфекции собирали лизаты клеток для оценки уровня экспрессии генов *IL25* и *Tslp* с помощью количественной ПЦР. Аналогично проводили трансфекцию клеток линии NIH3T3.

Количественная ПЦР-РВ

Уровень экспрессии мРНК генов *IL25* и *Tslp* оценивали методом ПЦР-РВ. Для этого из лизатов клеток L929 и NIH3T3 выделяли общую РНК с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с рекомендацией производителя. Полученную РНК использовали в реакции обратной транскрипции для синтеза библиотеки кДНК с применением набора реактивов «Реверта Л» (ООО «Амплиценс», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР-РВ проводили с использованием набора реактивов «2,5× Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (ООО «Синтол», Россия), специфических праймеров и зонда (см. ниже) и амплификатора DPrime 5 (ООО «НПО ДНК-технология», Россия). В качестве выравнивающего гена использовали *Hprt* мыши. Последовательность праймеров и зонда для *IL25*: прямой – CACACCCACCACGCAGAAT, обратный – CAACTCATAGCTCCAAGGAGAGATG, зонд – (ROX) CCAGCAAGGATGGCCCCCTCA (RTQ2). Для

Tslp: прямой – AGCTTGTCTCCTGAAAATCGAG, обратный – CTTGTTCTCCGGGCAAATG, зонд – (ROX) GCTGCCCTCACTCCCCGAC (RTQ2). Для *Hprt*: прямой – GCACTGAATAGAAATAGTGATAGATCC, обратный – CAGTTAAAGTTGAGAGATCATCTCC, зонд – (ROX) CAGACTGAAGAGCTACTGTAATGATCAGTCAAC (RTQ2).

Статистический анализ данных

Для всех количественных данных вычисляли среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Определяли межгрупповые различия с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты и обсуждение

Проектирование оптимальных последовательностей миРНК

С использованием программы OligoWalk было спроектировано 19 вариантов миРНК против гена *IL25* и 96 вариантов против гена *Tslp* мыши. Из них для синтеза было отобрано 5 вариантов миРНК против гена *IL25* мыши и 6 вариантов против гена *Tslp* (табл. 1). Спроектированные варианты миРНК против обоих генов таргетируют центральную кодирующую часть мРНК генов-мишеней.

Отбор спроектированных миРНК для дальнейшего синтеза производился на основании теоретических расчетов, осуществляемых программой OligoWalk и рекомендаций, приведенных в других исследовательских работах. Программное обеспечение OligoWalk относится к 2-му поколению и позволяет не только проектировать миРНК, но и рассчитывать их теоретическую эффективность (табл. 1). Поэтому для дальнейшего синтеза отбирались варианты, характеризующиеся высокой теоретически предсказанной эффективностью.

В ряде публикаций также описаны некоторые рекомендации по выбору оптимальных миРНК. Эльбашир и др. показали, что миРНК длиной 19–21 нуклеотидов с двумя нуклеотидными выступами на 3'-конце блокируют экспрессию генов. Кроме того, показано, что длинные молекулы миРНК (более 21 пн) менее стабильны, а также они вызывают неспецифическую активацию врожденной иммунной системы [5]. Поэтому мы проектировали миРНК размером 19 нуклеотидов, а на 3'-конец добавляли динуклеотид ТТ.

Длинные молекулы миРНК (более 21 пн) активируют врожденную иммунную систему, стимулируя рецепторы TLR [11]. Для уменьшения вероятности неспецифической активации врожденного иммунного ответа мы проектировали молекулы миРНК минимально возможного размера – 21 пн.

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ МОЛЕКУЛ МИРНК ПРОТИВ ГЕНА *Ii25* И *Ts/p* МЫШИ И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКИ
TABLE 1. SEQUENCES AND CHARACTERISTICS OF siRNA MOLECULES AGAINST THE MOUSE *Ii25* AND *Ts/p* GENES

№ No.	Название Name	Цепь Strand	Последовательность 5-3 Subsequence 5-3	ДНК-мишень 5-3 Target DNA 5-3	Теор. эфф. Theor. eff.	Идентичность по отношению к другим генами мыши, % Identity according to other mouse genes, %
1	simiL-25-255	S	GUUGGACAGGGACUUGAAUtt	GTTGGACAGGGACTTGAAT	83	74
		aS	AUUC AAGUCCCGUCCAActt			
2	simiL-25-234	S	CAUCUCUCCUUGGAGCUAutt	CATCTCTCCTTGGAGCTAT	72	84
		aS	AUAGCUCCAAGGAGAGAUGtt			
3	simiL-25-17	S	CAUUCUUGGCAAU GAUCGUtt	CATTCTTGGCAATGATCGT	65	79
		aS	ACGAUCAUUGCC AAGAAUGtt			
4	simiL-25-175	S	CACACCCACCCAGCAGAAUtt	CACACCCACCCAGCAGAAUtt	61	84
		aS	AUUCUGCGUGGUGGUGtt			
5	simiL-25-368	S	UCCACAUUACCCACAACCatt	TCCCACCTTACCACAACCA	59	84
		aS	UGGUUGUGGUAAGUGGGatt			
6	simTSLP-310	S	ACUGAGAGAAAUGACCGUAtt	ACTGAGAGAAAATGACGGTA	92	84
		aS	UACCGUCAUUUCUCUCAGUtt			
7	simTSLP-78	S	CUUCACGUCAAUUACGAAAtt	CTTCACGTC AATTACGAAA	91	79
		aS	UUUCGUAAUUGACGUGAAGtt			
8	simTSLP-405	S	CAUGCAAUCUC CAGAAUAAtt	CATGCAATCTCCAGAAATAA	89	79
		aS	UUAUUCUGGAGAUUGCAUGtt			
9	simTSLP-188	S	GUCUCCUGAAAUCGAGUAtt	GTCTCCTGAAAATCGAGTA	89	74
		aS	UACUCGAUUUUCAGGAGACtt			
10	simTSLP-374	S	CCUCACAAAUCUAAGAUUtt	CCTCACAAAATCTAAGATT	88	84
		aS	AAUCUUAAGAAUUUGAGGtt			
11	simTSLP-131	S	GAGAUUUGAAA GGGCUAAtt	GAGATTTGAAA GGGGCTAA	88	84
		aS	UUAGCCCCUUUC AAAUCUctt			

Примечание. Теор. эфф. – теоретически предсказанная активность (от 0 до 100%). S – смысловая цепь. aS – антисмысловая цепь.

Note. Theor. eff., theoretically predicted activity (from 0 to 100%). S, sense strand. aS, antisense strand).

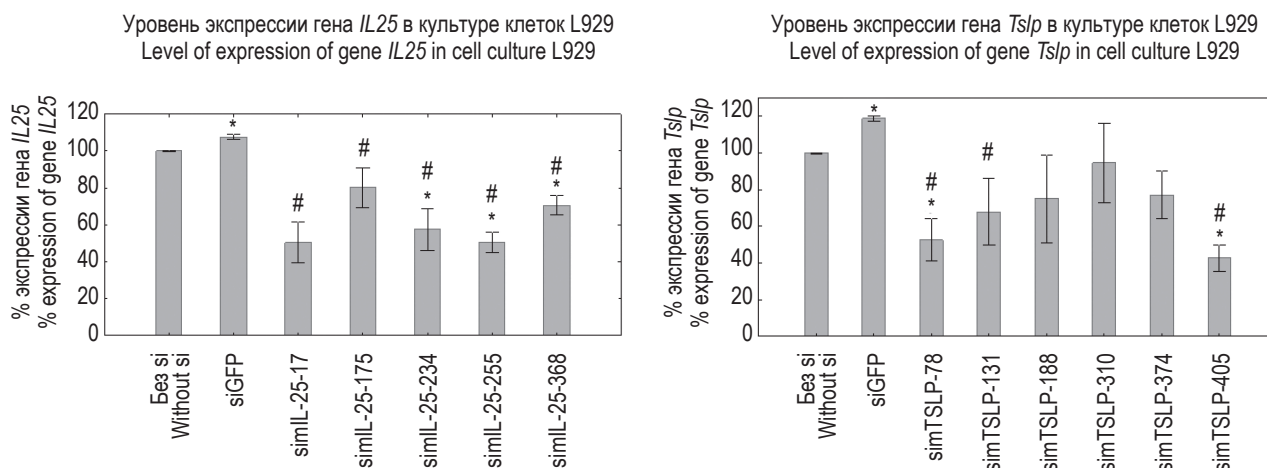


Рисунок 1. Биологическая активность миРНК против генов *IL25* и *Tslp* в культуре клеток L929

Примечание. Представлены средние значения ± стандартная ошибка. * – статистически значимое отличие от группы «без si». # – статистически значимое отличие от группы «siGFP». Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса. Отличия считались значимыми при $p \leq 0,05$, $n = 5$.

Figure 1. Activity of siRNAs against *IL25* and *Tslp* genes in L929 cell culture

Note. Means ± standard errors are presented. *, statistically significant difference vs [without si]. #, statistically significant difference vs [siGFP]. Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal–Wallis test. Differences were considered significant at $p \leq 0,05$, $n = 5$.

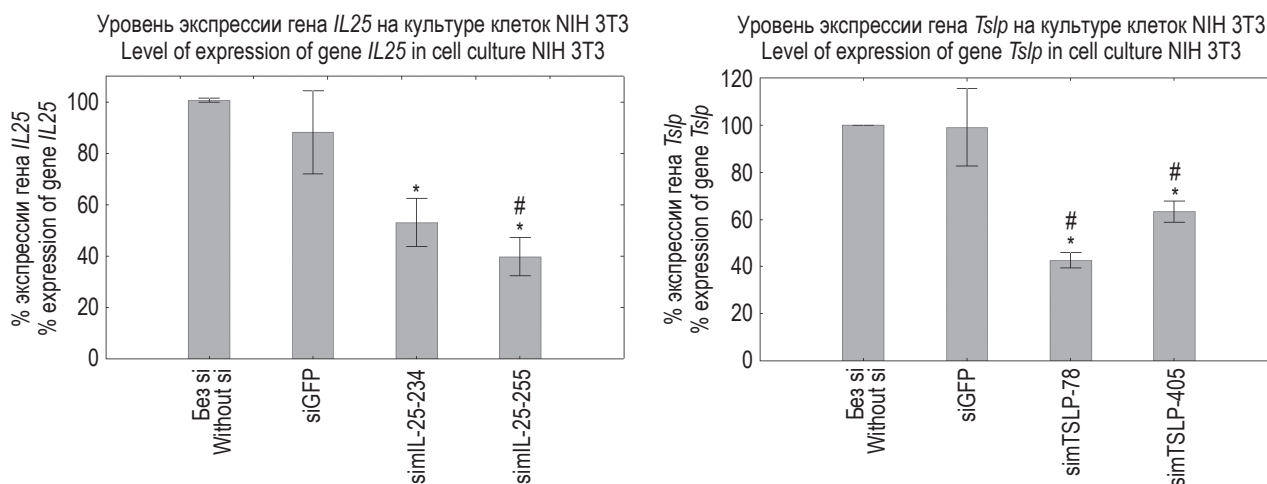


Рисунок 2. Биологическая активность миРНК против генов *IL25* и *Tslp* в культуре клеток NIH3T3

Примечание. Представлены средние значения ± стандартная ошибка. * – статистически значимое отличие от группы «без si». # – статистически значимое отличие от группы «siGFP». Статистический анализ проведен с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллиса. Отличия считались значимыми при $p \leq 0,05$, $n = 6$.

Figure 2. Activity of siRNAs against *IL25* and *Tslp* genes in NIH3T3 cell culture

Note. Means ± standard errors are presented. *, statistically significant difference vs [without si]. #, statistically significant difference vs [siGFP]. Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal–Wallis test. Differences were considered significant at $p \leq 0,05$, $n = 6$.

Учитывалось также положение участка отжига миРНК на мРНК гена-мишени; он не должен находиться ближе 50-150 пн относительно стартового кодона гена, т. к. в данном участке мРНК инициируется трансляция белка, которая сопряжена с привлечением различных белковых факторов, что снижает пространственную доступность дан-

ного участка для молекул миРНК и, как следствие, понижает их активность.

Также при проектировании миРНК следует учитывать так называемые off-target-эффекты, когда молекула миРНК может нацеливаться сразу на несколько генов, имеющих сходную последовательность. Учитывая это, для синтеза миРНК мы отбирали варианты, которые отличаются от

последовательностей других генов мыши на 16% и более (т. е. идентичность последовательности миРНК к другим генам составляет не более 84%) (табл. 1).

Биологическая активность молекул миРНК в экспериментах *in vitro*

После отбора подходящих вариантов миРНК против генов *IL25* и *Tslp* было проведено их тестирование в экспериментах *in vitro* на культуре клеток L929. Активность миРНК оценивали по их способности подавлять экспрессию целевого гена, которая оценивалась методом ПЦР-РВ.

Наиболее активными оказались варианты *simIL-25-234* и *simIL-25-255*, которые подавляли экспрессию гена *IL25* на 43% и 49% соответственно, по сравнению с неспецифическими миРНК (*siGFP*). Варианты миРНК *simTSLP-78* и *simTSLP-405* подавляли экспрессию гена *Tslp* на 54% и 56% по сравнению с неспецифическими миРНК (*siGFP*) (рис. 1). Неспецифические миРНК (*siGFP*) в проведенных экспериментах практически не влияли на экспрессию целевых генов; экспрессия *IL25* и *Tslp* в клетках L929 трансфицированных *siGFP* была сопоставима с таковой в клетках необработанных миРНК (рис. 1). Эти данные подтверждают, что подавление экспрессии *IL25* и *Tslp* вариантами *simIL-25-234*, *simIL-25-255*, *simTSLP-78* и *simTSLP-405* было сиквенс-специфичным.

Было проведено дополнительное исследование биологической активности спроектированным миРНК на культуре клеток NIH3T3. В этих дополнительных экспериментах с целью выявить наиболее активную миРНК мы оценили активность двух вариантов против гена *IL25* (*simIL-25-234* и *simIL-25-255*) и двух вариантов против гена *Tslp* (*simTSLP-78* и *simTSLP-405*).

В результате экспериментов было продемонстрировано, что наибольшую активность проявлял вариант *simIL-25-255*; он подавлял экспрессию гена *IL25* на 60% в сравнении с *siGFP*. Вариант *simTSLP-78* в наибольшей степени (на 57%) подавлял экспрессию гена *Tslp* (рис. 2).

Заключение

Таким образом, были спроектированы молекулы миРНК против генов *IL25* и *Tslp* мыши и изучена их биологическая активность в экспериментах *in vitro*. Наиболее активные варианты миРНК подавляли экспрессию гена *IL25* на 60% (вариант *simIL-25-255*), а гена *Tslp* (вариант *simTSLP-78*) на 57%. Указанные варианты миРНК (*simIL-25-255* и *simTSLP-78*) могут быть в дальнейшем использованы в экспериментах *in vivo* в моделях аллергического воспаления у мышей с целью выявить их противовоспалительный потенциал и оценить перспективность разработки противовоспалительных средств на основе миРНК.

Список литературы / References

1. Козулина И.Е., Курбачева О.М., Ильина Н.И. Аллергия сегодня. Анализ новых эпидемиологических данных. Российский аллергологический журнал // Российский аллергологический журнал, 2014. Т. 3. С. 3-10. [Kozulina I.E., Kurbacheva O.M., Ilyina N.I. Allergy today. Analysis of new epidemiological data. *Rossiyskiy allergologicheskii zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2014, Vol. 3, pp. 3-10. (In Russ.)]
2. Bernstein D.L., Schwartz G., Bernstein J.A. Allergic rhinitis: mechanisms and treatment. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2016, Vol. 36, pp. 261-278.
3. Bousquet J., Anto J.M., Bachert C., Baiardini I., Bosnic-Anticevich S., Walter Canonica G., Melén E., Palomares O., Scadding G.K., Togias A., Toppila-Salmi S. Allergic rhinitis. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2020, Vol. 6, no. 1, 95. doi: 10.1038/s41572-020-00227-0.
4. Deng C., Peng N., Tang Y., Yu N., Wang C., Cai X., Zhang L., Hu D., Ciccio F., Lu L. Roles of IL-25 in Type 2 Inflammation and Autoimmune Pathogenesis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 691559. doi: 10.3389/fimmu.2021.691559.
5. Elbashir S. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 2002, Vol. 26, pp. 199-213.
6. Hong H., Liao S., Chen F., Yang Q., Wang D.Y. Role of IL-25, IL-33, and TSLP in triggering united airway diseases toward type 2 inflammation. *Allergy*, 2020, Vol. 75, pp. 2794-2804.
7. Muñoz-Bellido F.J., Moreno E., Dávila I. Dupilumab: A review of present indication. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2022, Vol. 32, pp. 97-115.
8. Nikonova A., Shilovskiy I., Galitskaya M., Sokolova A., Sundukova M., Dmitrieva-Posocco O., Mitin A., Komogorova V., Litvina M., Sharova N., Zhernov Y., Kudlay D., Dvornikov A., Kurbacheva O., Khaitov R., Khaitov M. Respiratory syncytial virus upregulates IL-33 expression in mouse model of virus-induced inflammation exacerbation in OVA-sensitized mice and in asthmatic subjects. *Cytokine*, 2021, Vol. 138, 155349. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155349.
9. Traber G.M., Yu A.M. Special section on non-coding RNAs in clinical practice: from biomarkers to therapeutic tools—minireview RNAi-based therapeutics and novel RNA bioengineering technologies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2023, Vol. 384, pp. 133-154.

10. Wang C., Liu Q., Chen F., Xu W., Zhang C., Xiao W. IL-25 Promotes Th2 Immunity responses in asthmatic mice via nuocytes activation. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 9, e0162393. doi: 10.1371/journal.pone.0162393.

11. Weber C., Müller C., Podszuweit A., Montino C., Vollmer J., Forsbach A. Toll-like receptor (TLR) 3 immune modulation by unformulated small interfering RNA or DNA and the role of CD14 (in TLR-mediated effects). *Immunology*, 2012, Vol. 136, pp. 64-77.

Авторы:

Каганова М.М. — младший научный сотрудник лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Шиловский И.П. — д.б.н., заместитель директора по науке и инновациям ФГБУ «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Тимофеевич Е.Д. — младший научный сотрудник лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Юмашев К.В. — младший научный сотрудник лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Гурский Д.А. — студент ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина»; лаборант лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Виноградова К.В. — студентка ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина»; лаборант лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Попова М.В. — студентка МБФ ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ; лаборант лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр “Институт иммунологии”» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Хаитов М.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор ФГБУ «ГНИЦ Институт иммунологии» ФМБА России; заведующий кафедрой иммунологии МБФ ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Kaganova M.M., Junior Research Associate, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Shilovskiy I.P., PhD, MD (Biology), Deputy Director on Science and Innovation, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Timotievich E.D., Junior Research Associate, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Yumashev K.V., Junior Research Associate, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Gurskii D.A., Student, K. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology; Laboratory Assistant, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Vinogradova K.V., Student, K. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology; Laboratory Assistant, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Popova M.V., Student of MBF, N. Pirogov Russian National Research Medical University; Laboratory Assistant, Antiviral Immunity Laboratory, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Khaitov M.R., PhD, MD (Medicine) Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; Head, Immunology Department, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 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

ЭКСПРЕССИЯ TIM-3 НА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ МОНОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Черных Е.Р.

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

Резюме. Ингибиторный чекпойнт-рецептор TIM-3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing molecule-3), являющийся одним из важнейших рецепторов, регулирующих реакции клеточного иммунитета, был идентифицирован как рецептор негативной регуляции Т-клеток. Исследования последнего времени продемонстрировали, что TIM-3 экспрессируется на клетках врожденного иммунитета, в том числе и на дендритных клетках (ДК), причем даже на более высоком уровне по сравнению с Т-клетками. Значительная часть ДК в зоне опухолевого микроокружения имеет моноцитарное происхождение. У человека моделями для изучения таких ДК *in vitro* являются культуры ДК, генерированные из моноцитов в присутствии ростовых факторов. Настоящее исследование было направлено на изучение экспрессии TIM-3 в IFN α -индуцированных ДК моноцитарного происхождения (ИФН-ДК), а также влияния активации ДК на экспрессию TIM-3. ДК генерировали путем культивирования прилипающей фракции мононуклеарных клеток здоровых доноров в течение 4 суток в присутствии GM-CSF и IFN α с последующим созреванием в течение 24 ч с ЛПС. В качестве активационного стимула в культуры интактных ИФН-ДК на этапе созревания совместно с ЛПС добавляли препарат на основе двуцепочечной ДНК человека (dsDNA, 5 мкг/мл). Уровень экспрессии мембранной формы TIM-3 определяли методом проточной цитофлюориметрии, уровень экспрессии мРНК TIM-3 – методом RT-PCR в режиме реального времени с обратной транскрипцией.

Получены данные о том, что интактные ИФН-ДК доноров на высоком уровне экспрессировали мембранную форму TIM-3 (более 70% клеток). Добавление ЛПС в качестве созревающего стимула снижало почти в два раза экспрессию TIM-3 ($p_w < 0,05$), не влияя при этом на экспрессию мРНК HAVCR2/TIM-3. Экзогенная dsDNA (совместно с ЛПС) увеличивала более чем в три раза экспрессию мРНК HAVCR2/TIM-3 ($p_w = 0,05$) на фоне снижения количества TIM-3⁺ДК ($p_w = 0,003$), что свидетельствует о наличии механизмов, поддерживающих экспрессию данного ингибиторного чекпойнт-рецептора в условиях активации ДК.

Дальнейшие исследования регуляции экспрессии TIM-3 дендритными клетками моноцитарного происхождения позволят расширить представления о биологической значимости ингибиторных рецепторов на ДК с точки зрения иммунного ответа, а также в перспективе повысить эффективность уже существующих подходов в лечении опухоли с помощью ИФН-ДК и ингибиторов чекпойнт-молекул.

Ключевые слова: дендритные клетки, чекпойнт-молекулы, TIM-3, IFN α , липополисахарид, двуцепочечная ДНК

Адрес для переписки:

Тыринова Тамара Викторовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
E-mail: tyrinova@bk.ru

Address for correspondence:

Tamara V. Tyrinova
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 228-21-01.
E-mail: tyrinova@bk.ru

Образец цитирования:

Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, Е.Р. Черных «Экспрессия
TIM-3 на дендритных клетках моноцитарного
происхождения» // Медицинская иммунология, 2024.
Т. 26, № 5. С. 1115-1120.
doi: 10.15789/1563-0625-TEO-16647

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

For citation:

T.V. Tyrinova, O.Yu. Leplina, E.R. Chernykh “TIM-3
expression on monocyte-derived dendritic cells”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 5, pp. 1115-1120.
doi: 10.15789/1563-0625-TEO-16647

© Tyrinova T.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-TEO-16647

TIM-3 EXPRESSION ON MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS

Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Chernykh E.R.

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

Abstract. The T cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing molecule-3 (TIM-3), an inhibitory checkpoint receptor, has been identified as a crucial regulator of cellular immune responses. TIM-3 has been discovered as a receptor involved in the negative regulation of T cells. Recent studies have demonstrated that TIM-3 is expressed on innate immune cells, including dendritic cells (DCs), even at a higher level than T cells. In the tumor microenvironment, the majority of DCs have a monocytic origin. Models for studying such DCs *in vitro* are DC cultures generated from monocytes in the presence of growth factors. The present study aimed to investigate the expression of TIM-3 in IFN α -induced monocyte-derived DCs (IFN-DCs) and the impact of DC activation on TIM-3 expression. DCs were obtained by culturing the adherent fraction of mononuclear cells from healthy donors for 4 days in the presence of GM-CSF and IFN α , followed by LPS addition for 24 hours. Human double-stranded DNA (dsDNA, 5 μ g/mL) was added as an activation stimulus to intact IFN-DCs at the stage of maturation, along with LPS. Expression of the membrane TIM-3 molecule was determined by flow cytometry, and the level of expression of TIM-3 mRNA – by real-time RT-PCR with reverse transcription. Intact donor IFN-DCs expressed the membrane TIM-3 molecule at a high level (more than 70% of cells). The addition of LPS as a maturation stimulus almost halved the expression of TIM-3 ($p_w < 0.05$) without affecting the expression of HAVCR2/TIM-3 mRNA. Exogenous dsDNA (along with LPS) increased the expression of HAVCR2/TIM-3 mRNA by more than three times ($p_w = 0.05$) with a decrease in the number of TIM-3+DCs ($p_w = 0.003$). Our findings indicate the presence of mechanisms that support expression of this inhibitory checkpoint receptor under conditions of DC activation. Further studies of the regulation of TIM-3 expression by monocyte-derived dendritic cells will expand the understanding of the biological significance of inhibitory receptors on DCs from the point of view of the immune response, as well as, in the future, increase the effectiveness of current approaches in cancer immunotherapy using IFN-DCs and inhibitors of checkpoint molecules.

Keywords: dendritic cells, checkpoint molecules, TIM-3, IFN α , lipopolysaccharide, double-stranded DNA

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 23-25-00354, <https://rscf.ru/project/23-25-00354/>).

Введение

Среди различных молекул, регулирующих функции иммунных клеток, большое внимание в последние годы привлекают ингибиторные чекпойнт-молекулы [7]. При этом блокирование чекпойнт-молекул сопровождается выраженной активацией эффекторных Т-клеток, что, в свою очередь, стало основой для разработки нового направления в иммунотерапии злокачественных опухолей [4, 9].

Среди ингибиторных чекпойнт-молекул TIM-3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing molecule-3) является одним из важнейших рецепторов, регулирующих реакции клеточного иммунитета. Изначально TIM-3 был идентифицирован как рецептор негативной регуляции, экспрессируемый на активированных Th1-клетках [8]. При различных типах солидных опухолей экспрессия TIM-3 в опухоли-инфильт-

рирующих лимфоцитах сопряжена с плохим прогнозом и низкой выживаемостью [2].

Исследования последнего времени демонстрируют, что TIM-3 экспрессируется на клетках врожденного иммунитета, в том числе и на дендритных клетках (ДК), причем даже на более высоком уровне по сравнению с Т-клетками [3]. Можно предположить, что TIM-3 на ДК выступает в роли негативного регулятора их функциональной активности и обеспечивает проявление толерогенных свойств ДК. Поскольку ДК играют ключевую роль в запуске антиген-специфического иммунного ответа и индукции эффекторных CD8⁺Т-клеток, то TIM-3-позитивные ДК могут быть мишенью при терапии ингибиторами чекпойнт молекул, однако это вопрос остается недостаточно исследованным.

Значительная часть ДК в зоне опухолевого микроокружения имеет моноцитарное происхождение. У человека моделями для изучения таких ДК *in vitro* являются культуры ДК, генерированные из моноцитов в присутствии ростовых факторов. Важную роль в дифференцировке

моноцитарных ДК играют интерфероны I типа и, прежде всего, IFN α , которые обеспечивают генерацию ДК (ИФН-ДК) с выраженной способностью индуцировать антиген-специфический иммунный ответ [5]. Это позволяет рассматривать ИФН-ДК в качестве перспективного подхода в иммунотерапии злокачественных опухолей. Однако для ИФН-ДК отсутствуют данные об экспрессии чекпойнт-рецептора TIM-3, который мог бы влиять на дифференцировку и функциональную активность ИФН-ДК. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение экспрессии TIM-3 на IFN α -индуцированных ДК моноцитарного происхождения, а также влияние активации ДК на экспрессию TIM-3.

Материалы и методы

В исследование было включено 15 здоровых доноров обоего пола. Все исследования проводили после получения письменного информированного согласия.

ДК генерировали путем культивирования адгезивной к пластику фракции мононуклеарных клеток (МНК), выделенных из периферической крови в градиенте плотности фикола-урографина ($p = 1,077$), в присутствии GM-CSF (Sigma-Aldrich, США, 40 нг/мл), IFN α (Роферон-А, Roche, Швейцария 1000 Ед/мл) и 2,5% сыворотки крови плодотворной коровы (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург) при 37 °С в CO $_2$ -инкубаторе при 5% CO $_2$ в течение 4 суток. Для индукции созревания на 4-е сутки вносили липополисахарид (ЛПС *E. coli* 0114: B4, 10 мкг/мл) и продолжали культивировать в течение 24 ч. Контрольными культурами являлись интактные ДК без добавления ЛПС (5-суточные культуры). В отдельной серии экспериментов в культуры ДК доноров совместно с ЛПС добавляли препарат на основе двуцепочечной ДНК человека (dsDNA, 5 мкг/мл).

Оценку экспрессии мембранной формы TIM-3 на ДК проводили методом проточной цитофлуориметрии (BD FACSCanto™, США) с использованием флуорохром-конъюгированных моноклональных анти-HLA-DR (PerCP; BD PharMingen, США) и анти-TIM-3 (Pe; BioLegend, США) антител. В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичными флуорохромами. Процент позитивных клеток, экспрессирующих TIM-3, рассчитывали на 10 000 клеток в регионе HLA-DR-позитивных больших гранулярных лимфоцитов. Уровень экспрессии TIM-3 выражали в интенсивности флуоресценции моноклональных антител, связавшихся с соответствующим антигеном (MFI).

Для определения экспрессии мРНК TIM-3 применяли метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (RT-PCR). Праймеры к мРНК гена *HAVCR2/TIM-3* были подобраны с помощью онлайн-ресурса Primer-BLAST и синтезированы фирмой ООО «БИОССЕТ» (г. Новосибирск, Россия). В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» рибосомального белка P0 *RPLP0*.

Последовательности праймеров, использованных при проведении количественных ПЦР в реальном времени (for – прямой праймер, rev – обратный праймер):

TIM-3-for 5'-AATTGAACTGGGACCTGCACT-3'
TIM-3-rev 5'-ATGCTTTCACCTCAGCACCC-3'
RPLP0-for 5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
RPLP0-rev 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

Условия реакции включали первоначальную денатурацию (95 °С) и последующие 40 циклов репликации (95 °С 15 сек, 58 °С 30 сек, 72 °С 60 сек). Расчет относительной экспрессии гена *HAVCR2/TIM-3* проводили методом сравнения пороговых уровней амплификации ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), используя *RPLP0* в качестве нормировочного гена; группой контроля были интактные ДК (ДК $_0$), в которой уровень экспрессии целевого гена *HAVCR2/TIM-3* принимался за 1.

Значения порогового цикла (C_t) рассчитывали как среднее значение триплетов каждого образца.

$$\Delta\Delta C_t(1,2) = (C_t \text{ *HAVCR2/TIM-3* } - C_t \text{ *RPLP0*})_1 - (C_t \text{ *HAVCR2/TIM-3* } - C_t \text{ *RPLP0*})_2,$$

где 1 – стимулированные ДК, 2 – ДК $_0$.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианы (Me) и значений интерквартильного диапазона (IQR; Q $_{0,25}$ -Q $_{0,75}$) или в виде средних значений и ошибки средней ($m \pm SE$). Для выявления значимых различий использовали критерий знаков для парных выборок. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным нами данным, в культурах незрелых ИФН-ДК доля TIM-3-позитивных клеток составляла 75,4% (Me; IQR 39,0-89,7%) (рис. 1А).

При добавлении в культуры ДК в качестве дозревающего стимула липополисахарида грамотрицательных бактерий (ЛПС *E. coli*) доля TIM-3+ ИФН-ДК снижалась почти в два раза ($p_w = 0,0006$; $n = 8$; рис. 1А). Кроме того, снижался и уровень экспрессии этой молекулы ($p_w = 0,059$; рис. 1Б).

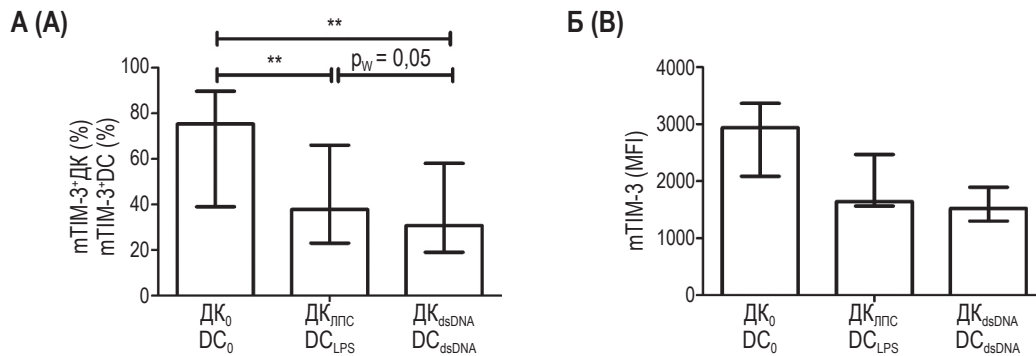


Рисунок 1. Экспрессия мембранной формы ТИМ-3 на ИФН-ДК доноров

Примечание. Данные представлены в виде медианы и диапазона 25-75% значений (Me; IQR) относительно количества ТИМ-3-позитивных ИФН-ДК (А) и уровня экспрессии ТИМ-3 на ИФН-ДК (Б). ДК₀ – интактные ИФН-ДК; ДК_{ЛПС} – ЛПС-стимулированные ИФН-ДК; ДК_{dsDNA} – ИФН-ДК, стимулированные ЛПС и dsDNA (5 мкг/мл). ** – значимость различий $p_w < 0,01$, $n = 6-9$ доноров.

Figure 1. Expression of membrane TIM-3 on donor IFN-DCs

Note. Data are presented as median and range 25-75% values (Me; IQR) of the relative number of TIM-3-positive IFN-DCs (A) and the level of TIM-3 expression on IFN-DCs (B). DC₀, intact IFN-DCs; DC_{LPS}, LPS-stimulated IFN-DCs; DC_{dsDNA}, IFN-DCs stimulated with LPS and dsDNA (5 μ g/mL); **, significance of differences $p_w < 0.01$; $n = 6-9$ donors.

В то же время анализ экспрессии мРНК показал, что в ответ на добавление ЛПС экспрессия гена *HAVCR2/TIM-3* практически не изменялась в большинстве случаев. Так, при сравнительном анализе экспрессии мРНК ТИМ-3 в культурах интактных и ЛПС-стимулированных ИФН-ДК здоровых доноров была проведена оценка значений пороговых циклов (табл. 1).

Количество пороговых циклов в образцах интактных ДК было сопоставимо и значимо не отличалось от аналогичных показателей в культурах ЛПС-стимулированных ДК ($p_w = 0,21$). Поскольку величина порогового цикла зависит от эффективности амплификации ДНК и обратно коррелирует с исходным количеством копий матрицы, полученные нами результаты могут свидетельствовать о сопоставимом количестве мРНК

ТИМ-3 в интактных и ЛПС-стимулированных ИФН-ДК.

В отдельной серии экспериментов было изучено влияние активации ИФН-ДК на экспрессию ТИМ-3. С этой целью в качестве активационного стимула в культуры интактных ИФН-ДК на этапе созревания совместно с ЛПС добавляли экзогенную dsDNA человека. В качестве экзогенной dsDNA использовали зарегистрированный фармакопейный препарат на основе dsDNA человека, представляющий собой смесь фрагментов ДНК, выделенных из плаценты здоровых рожениц, размером от 300 до 6000 п.н., и ранее продемонстрировавший стимулирующее влияние на функциональную активность ИФН-ДК [1, 10].

Согласно полученным нами данным (рис. 1А), в присутствии dsDNA (ИФН-ДК_{ЛПС + dsDNA}) сниже-

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ ПОРОГОВЫХ ЦИКЛОВ ДЛЯ ГЕНА *HAVCR2/TIM-3* В ИФН-ДК ДОНОРОВ

TABLE 1. VALUES OF THRESHOLD CYCLES FOR THE *HAVCR2/TIM-3* GENE IN IFN-DC DONORS

Анализируемый ген Gene		ИФН-ДК ₀ IFN-DC ₀	ИФН-ДК _{ЛПС} IFN-DC _{LPS}
<i>HAVCR2/TIM-3</i>	Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)	26,29 (25,97-27,55)	26,62 (25,73-26,91)
	$m \pm SE$	26,52 \pm 0,33	26,47 \pm 0,31
<i>RPLP0</i>	Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)	11,20 (11,16-11,27)	11,23 (11,18-11,30)
	$m \pm SE$	11,27 \pm 0,08	11,26 \pm 0,09

Примечание. В виде медианы (Me), диапазона 25-75% квартильных значений ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$) и средних значений ($m \pm SE$) представлены данные о количестве пороговых циклов экспрессии гена *HAVCR2/TIM-3* и референсного гена *RPLP0* в культурах интактных ИФН-ДК (ИФН-ДК₀) и ЛПС-стимулированных ИФН-ДК (ИФН-ДК_{ЛПС}) здоровых доноров ($n = 9$).

Note. Data on the number of threshold cycles of expression of the *HAVCR2/TIM-3* gene and the reference gene *RPLP0* in cultures of intact IFN-DCs (IFN-DC₀) and LPS-stimulated IFN-DCs (IFN-DC_{LPS}) from healthy donors are presented in the form of median (Me), range of 25-75% quartile values ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$) and average values ($m \pm SE$); $n = 9$.

ние количества ДК, экспрессирующих мембранную форму TIM-3, было еще более выраженным по сравнению с интактными ИФН-ДК (Me 30,7% vs 75,4%; $p_w = 0,003$) и ЛПС-стимулированными ИФН-ДК без добавления dsDNA (ИФН-ДК_{ЛПС}) (Me 30,7% vs 37,8%; $p_w = 0,05$). При этом основные различия проявляясь именно в относительном количестве TIM-3⁺ДК, тогда как общий уровень экспрессии TIM-3 в ЛПС-стимулированных ИФН-ДК, культивируемых в отсутствие и присутствии dsDNA, был сопоставим (MFI Me 1641 vs 1520; $p_w = 0,5$; рис. 1Б).

Анализ экспрессии мРНК показал, что на фоне снижения мембранной формы TIM-3 экзогенная dsDNA человека (совместно с ЛПС) оказывала выраженный стимулирующий эффект (трехкратное увеличение) на экспрессию гена *HAVCR2/TIM-3* по сравнению с ЛПС-стимулированными ИФН-ДК (Me $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 3,1 vs 1.1; $p_w = 0,05$; рис. 2). Для расчета относительного уровня экспрессии гена *HAVCR2/TIM-3* в стимулированных ДК был применен метод сравнения пороговых уровней амплификации ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). При этом уровень экспрессии этого гена в интактных ИФН-ДК был принят за 1.

Заключение

В целом можно заключить, что ДК, генерируемые в культуре *in vitro* в присутствии IFN α , на высоком уровне экспрессируют на своей мембране TIM-3, уровень которого снижается при добавлении дозревающих и активационных стимулов. При этом надо отметить, что среди Т-лимфоцитов, согласно данным литературы, доля TIM-3-позитивных клеток значительно меньше [6]. Согласно полученным нами данным, созревание ИФН-ДК в присутствии ЛПС снижает почти в два раза экспрессию мембранной формы TIM-3, что, по-видимому играет важную роль с точки зрения регуляции иммунного ответа. При этом анализ экспрессии гена *HAVCR2/TIM-3* демонстрирует, что в ответ на добавление ЛПС уровень экспрессии мРНК TIM-3 не изменяется, что может свидетельствовать о сохранении потенциала ДК к продукции TIM-3. В присутствии dsDNA снижение количества ДК, экспрессирующих мембранную форму TIM-3, было еще более выраженным по сравнению с интактными ИФН-ДК (нестимулированными) и ЛПС-стимулированными ИФН-ДК без добавления dsDNA. Характерно, что основные различия проявляясь именно в относительном количестве TIM-3⁺ДК. На фоне снижения экспрессии мембранной TIM-3 на ИФН-ДК экспрессия гена *HAVCR2/TIM-3* в dsDNA-модифицированных

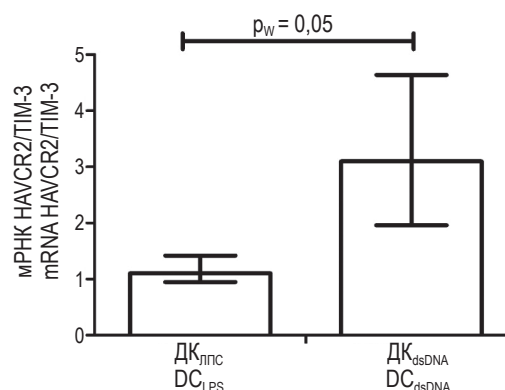


Рисунок 2. Экспрессия мРНК TIM-3 в ИФН-ДК доноров
Примечание. Представлены медиана (Me) и диапазон 25-75% квартильных значений ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) относительного уровня экспрессии мРНК TIM-3 в ЛПС-стимулированных ИФН-ДК доноров без добавления (ДК_{ЛПС}; n = 9) и при добавлении dsDNA (ДК_{dsDNA}; n = 5), нормализованного по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ с референс-геном RPLP0.

Figure 2. Expression of mRNA TIM-3 in donor IFN-DCs
Note. Data are presented as median and range 25-75% values (Me; IQR) of the expression level of mRNA *HAVCR2/TIM-3* in LPS-stimulated donor IFN-DCs without addition (DC_{LPS}; n = 9) and with addition of dsDNA (DC_{dsDNA}; n = 5), normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with the reference gene *RPLP0*.

ИФН-ДК, наоборот, значимо повышалась. Не исключено, что в условиях активации могут также существовать механизмы, которые поддерживают экспрессию ингибиторного чекпойнт-рецептора TIM-3. Однако это предположение требует дополнительных исследований.

Как известно, молекула TIM-3 может присутствовать на поверхности клеток, а также секретироваться в виде растворимой формы после шеддинга мембранной формы при участии ряда конвертаз, в том числе ADAM17/TACE [2]. Созревание ДК сопровождается усилением активности ADAM17/TACE [10], что может, в свою очередь, регулировать экспрессию TIM-3. Учитывая изменения в экспрессии TIM-3 на уровне мРНК и самого белка, не исключено, что в процессе созревания и активации происходит изменение баланса мембранной и растворимой форм TIM-3.

Дальнейшие исследования регуляции экспрессии TIM-3 дендритными клетками моноцитарного происхождения позволит расширить представления о биологической значимости ингибиторных рецепторов на ДК с точки зрения иммунного ответа, а также в перспективе повысить эффективность уже существующих подходов в лечении опухоли с помощью ИФН-ДК и ингибиторов чекпойнт-молекул.

Список литературы / References

1. Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Sebeleva T.E., Nikolin V.P., Popova N.A., Kiseleva E.V., Orishchenko K.E., Sakhno L.V., Gelfgat E.L., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Zagrebelniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous allogenic fragmented double-stranded DNA is internalized into human dendritic cells and enhances their allostimulatory activity. *Cell. Immunol.*, 2010, Vol. 262, no. 2, pp. 120-126.
2. Bailly C., Thuru X., Goossens L., Goossens J.F. Soluble TIM-3 as a biomarker of progression and therapeutic response in cancers and other of human diseases. *Biochem. Pharmacol.*, 2023, Vol. 209, 115445. doi: 10.1016/J.BCP.2023.115445.
3. de Mingo Pulido Á., Hänggi K., Celas D.P., Gardner A., Li J., Batista-Bittencourt B., Mohamed E., Trillo-Tinoco J., Osunmakinde O., Peña R., Onimus A., Kaisho T., Kaufmann J., McEachern K., Soliman H., Luca V.C., Rodriguez P.C., Yu X., Ruffell B. The inhibitory receptor TIM-3 limits activation of the cGAS-STING pathway in intra-tumoral dendritic cells by suppressing extracellular DNA uptake. *Immunity*, 2021, Vol. 54, pp. 1154-1167.
4. Dyck L., Mills K.H.G. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur. J. Immunol.*, 2017, Vol. 47, no. 5, pp. 765-779.
5. Lapenta C., Santini S.M., Spada M., Donati S., Urbani F., Accapezzato D., Franceschini D., Andreotti M., Barnaba V., Belardelli F. IFN- α -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8⁺ T cells against exogenous viral antigens. *Eur. J. Immunol.*, 2006, Vol. 36, p. 2046-2060.
6. Liu H., Zhi L., Duan N., Su P. Abnormal expression of Tim-3 antigen on peripheral blood T cells is associated with progressive disease in osteosarcoma patients. *FEBS Open Bio*, 2016, Vol. 6, no. 8, pp. 807-815.
7. Liu S., Sun Q., Ren X. Novel strategies for cancer immunotherapy: counter-immunoediting therapy. *J. Hematol. Oncol.*, 2023, Vol. 16, 38. doi: 10.1186/S13045-023-01430-8.
8. Sánchez-Fueyo A., Tian J., Picarella D., Domenig C., Zheng X.X., Sabatos C.A., Manlongat N., Bender O., Kamradt T., Kuchroo V.K., Gutiérrez-Ramos J.-C., Coyle A.J., Strom T.B. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat. Immunol.*, 2003, Vol. 4, no. 11, p. 1093-1101.
9. Sharma P., Hu-Lieskovan S., Wargo J.A., Ribas A. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell*, 2017, Vol. 168, pp. 707-723.
10. Tyrinova T., Leplina O., Mishinov S., Tikhonova M., Dolgova E., Proskurina A., Stupack V., Bogachev S., Ostanin A., Chernykh E. Defective regulation of membrane TNF α expression in dendritic cells of glioblastoma patients leads to the impairment of cytotoxic activity against autologous tumor cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 8, 2898. doi: 10.3390/ijms21082898.

Авторы:

Тыринова Т.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Леплина О.Ю. — д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Tyrinova T.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Leplina O.Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head of Laboratory, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 26.03.2024

Отправлена на доработку 27.03.2024

Принята к печати 30.03.2024

Received 26.03.2024

Revision received 27.03.2024

Accepted 30.03.2024

МОНОЦИТЫ И МАКРОФАГИ ПЕРЕДАЮТ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ СИГНАЛ ДРУГ ДРУГУ ПОСРЕДСТВОМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Эрдынеева Д.Б.^{1,2}, Ставская Н.И.³, Постнов А.Ю.⁴

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»,
г. Долгопрудный, Россия

³ ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ
«Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Резюме. Моноциты и макрофаги играют важную роль в развитии воспалительных заболеваний, в том числе сепсиса и т. д. Помимо роли «мусорщиков», макрофаги выделяют различные вещества (в основном, цитокины и хемокины), как оказывающие системное действие, так и модулирующие микроокружение воспалительного очага. Нарушение их нормальной функции может вызывать различные иммунные патологии и изменение гомеостаза тканей. Макрофаги способны передавать сигналы другим клеткам в зоне воспаления, в том числе выделяя различные цитокины и другие соединения прямо во внеклеточное пространство. Однако время жизни и радиус действия данных веществ могут быть ограничены. Альтернативным способом межклеточной коммуникации служит упаковка веществ во внеклеточные везикулы, которые могут помочь в распространении сигнала. Внеклеточные везикулы — это небольшие частицы с двухслойной липидной мембраной, которые переносят различные биологически активные вещества как внутри, так и на внешней стороне. Существуют различные типы внеклеточных везикул, каждая из которых может оказывать свое специфическое влияние на другие клетки. Благодаря наличию специфических рецепторов на поверхности везикул возможна селективная доставка биологических молекул к определенным клеткам. Везикулы могут содержать различные компоненты, такие как нуклеиновые кислоты, белки, липиды и даже отдельные органоиды клетки. Поэтому неудивительно, что везикулы способны модулировать физиологические процессы в организме и быть вовлечены в патогенез различных заболеваний. Установление механизмов участия везикул в развитии воспалительных заболеваний, в том числе хронических, крайне актуально. Целью настоящего исследования было установить способны ли внеклеточные везикулы модулировать им-

Адрес для переписки:

Эрдынеева Даяна Батовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
общей патологии и патофизиологии»
125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, 8.
Тел.: 8 (983) 430-70-24.
E-mail: daya-na@mail.ru

Address for correspondence:

Daiana B. Erdyneeva
Institute of General Pathology and Pathophysiology
8 Baltiyskaya St
Moscow
125315, Russian Federation
Phone: +7 (983) 430-70-24.
E-mail: daya-na@mail.ru

Образец цитирования:

Д.Б. Эрдынеева, Н.И. Ставская, А.Ю. Постнов
«Моноциты и макрофаги передают воспалительный
сигнал друг другу посредством внеклеточных везикул»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5.
С. 1121-1126.
doi: 10.15789/1563-0625-MAM-16794

© Эрдынеева Д.Б. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.B. Erdyneeva, N.I. Stavskaya, A.Yu. Postnov “*Monocytes
and macrophages transmit inflammatory signals to each
other via extracellular vesicles*”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5,
pp. 1121-1126.
doi: 10.15789/1563-0625-MAM-16794

© *Erdyneeva D.B. et al.*, 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-MAM-16794

мунный ответ. Для этого мы оценили секрецию цитокинов макрофагами, обработанными везикулами от стимулированных LPS моноцитов и макрофагов. Обнаружено, что клетки, которые получили везикулы от активированных LPS моноцитов и макрофагов, секретируют больше провоспалительных сигнальных молекул: цитокина IL-6 и хемокина IL-8. Полученные результаты демонстрируют, что межклеточное взаимодействие и передача воспалительного сигнала клеток моноцитарного ряда осуществляется также посредством внеклеточных везикул. В дальнейшем необходимы дополнительные исследования для понимания полной картины, какие вещества в составе внеклеточных везикул моноцитов и макрофагов позволяют им оказывать иммуномодулирующий эффект не только друг на друга, но и на клетки других типов.

Ключевые слова: моноциты, макрофаги, внеклеточные везикулы, воспаление, провоспалительные цитокины, LPS

MONOCYTES AND MACROPHAGES TRANSMIT INFLAMMATORY SIGNALS TO EACH OTHER VIA EXTRACELLULAR VESICLES

Erdyneeva D.B.^{a, b}, Stavskaya N.I.^c, Postnov A.Yu.^d

^a Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

^b Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russian Federation

^c Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d Avtsin Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

Abstract. Monocytes and macrophages play an important role in the development of inflammatory diseases, including sepsis, etc. In addition to their role as “scavengers,” macrophages secrete various substances (mainly cytokines and chemokines), which have a systemic effect and modulate the microenvironment of the inflammatory focus. Disruption of their normal function can cause various immune pathologies and changes in tissue homeostasis. Macrophages are able to transmit signals to other cells in the area of inflammation, including various cytokines and other compounds. Usually, they are secreted directly into the extracellular space. However, the lifetime and range of action of these substances may be limited. An alternative method of intercellular communication is the packaging of substances into extracellular vesicles, which can help in signal propagation. Extracellular vesicles are small particles with a bilayer lipid membrane that transport various biologically active substances. There are different types of extracellular vesicles, each of which can have its own specific effect on other cells. Due to the presence of specific receptors on the surface of the vesicles, they can make selective delivery of biological molecules to certain cells. Vesicles can contain various components, such as nucleic acids, proteins, lipids, and even individual cell organelles. Therefore, it is not surprising that vesicles are able to modulate physiological processes in the body and be involved in the pathogenesis of various diseases. Establishing the mechanisms of vesicle participation in the development of inflammatory diseases, including chronic ones, is extremely important. The aim of the present study was to determine whether extracellular vesicles are capable of modulating the immune response. To do this, we assessed cytokine secretion by macrophages treated with vesicles from LPS-stimulated monocytes and macrophages. It was found that cells that received vesicles from LPS-activated monocytes and macrophages secrete more pro-inflammatory signaling molecules: the cytokine IL-6 and the chemokine IL-8. The results demonstrate that intercellular interaction and transmission of the inflammatory signal of monocytic cells also occurs through extracellular vesicles. In the future, additional research is needed to understand the full picture of what substances in the extracellular vesicles of monocytes and macrophages allow them to have an immunomodulatory effect not only on each other, but also on other types of cells.

Keywords: monocytes, macrophages, extracellular vesicles, inflammation, proinflammatory cytokines, LPS

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 20-15-00337.

Введение

Моноциты и макрофаги – клетки врожденного иммунитета, выполняющие множество функций, среди которых не только модулирование иммунного ответа организма, но также и регулирование микроокружения тканей [7]. Крайне актуально подробное раскрытие механизмов участия макрофагов в различных патологических процессах, в том числе развития воспалительных заболеваний.

Внеклеточные везикулы важны в физиологических процессах, а также при различных патологиях, таких как онкологические, нейродегенеративные и острые и хронические воспалительные заболевания [7]. Известно, что в состав везикул входят различные белки, которые могут находиться как внутри, так и быть закреплены на мембране. Также везикулы содержат нуклеиновые кислоты (мРНК, микроРНК, мтДНК и т. д.) и даже клеточные органеллы, такие как митохондрии [5].

В зависимости от происхождения и своих размеров внеклеточные везикулы классифицируются на экзосомы (30-200 нм), микровезикулы (200-1000 нм) и апоптотические тельца (1-5 мкм). В последнее время также выделяют и другие субпопуляции экзосомы (< 50 нм) и большие онкосомы (1-10 мкм). Экзосомы образуются при высвобождении содержимого мультивезикулярных телец во внешнюю среду при слиянии с плазматической мембраной. В отличие от экзосом микровезикулы образуются непосредственно отделением от мембраны клетки [8].

Ранее считалось, что главной функцией везикул было участие в утилизации клеточных отходов, однако в дальнейшем стало очевидно, что они играют намного более важную роль в организме, в первую очередь участвуя в межклеточной коммуникации. Высвобожденные везикулы взаимодействуют с другими клетками и способны регулировать экспрессию генов и модулировать работу сигнальных путей. Притом это взаимодействие может происходить как с близлежащими клетками, так и на удаленном расстоянии. Рецепторы на поверхности везикул позволяют проводить селективную передачу сигнала только определенным клеткам. Находясь под защитой липидной мембраны, переносимые везикулой вещества могут продлить свое время жизни, избежав встречи с ферментами деградации и т. д. Также транспортировка внутри везикулы позволяет им быть доставленными к клетке-реципиенту в необходимой концентрации без разбавления [5].

Целью настоящего исследования было установить способны ли внеклеточные везикулы моду-

лировать иммунный ответ. Для этого мы оценили секрецию цитокинов макрофагами, обработанными везикулами от стимулированных LPS моноцитов и макрофагов.

Материалы и методы

Мононуклеарные клетки были получены из венозной крови здорового донора методом центрифугирования в градиенте плотности ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$, раствор Фиколла, НПП «ПанЭко», Россия). Для выделения CD14⁺ моноцитов из полученных мононуклеаров использовался метод иммуномагнитной сепарации на колонках (Miltenyi Biotec, Германия). Полученные клетки были разделены на три части, две из которых были предназначены для выделения везикул из кондиционированной среды, которые в последующем были добавлены к THP-1 и макрофагам из 3-й группы клеток.

Первую группу моноцитов высевали в 2 культуральных матраса 25 см² (по 1×10^6 клеток/мл в объеме 5,5 мл) в среде IMDM с глутамином с добавлением пенициллин-стрептомицина (НПП «ПанЭко», Россия), клетки одного из которых сразу в день выделения стимулировали LPS (1 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) в течение 1 часа. Затем клетки в обоих матрасах промывали PBS-буфером (НПП «ПанЭко», Россия), культивировали сутки в среде IMDM и собирали кондиционированную среду для последующего выделения везикул. Для дифференцировки в макрофаги вторую группу моноцитов также разделили на 2 матраса (1×10^6 клеток/мл в объеме 5,5 мл) и культивировали 5 суток в среде RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин (НПП «ПанЭко», Россия), пенициллин-стрептомицина (НПП «ПанЭко», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Россия) и GM-CSF (50 нг/мл, ООО «СайСторЛаб», Россия). Затем так же, как и с первой группой, макрофаги одного из матрасов стимулировали LPS в течение 1 часа в среде IMDM без сыворотки. Оба матраса промывали PBS-буфером, культивировали сутки в среде IMDM и собирали кондиционированную среду для выделения везикул. 3-ю группу моноцитов крови высевали в 96-луночный планшет (1×10^5 клеток в объеме 100 мкл) и культивировали 6 суток для дифференцировки в макрофаги в упомянутой выше среде RPMI-1640 с глутамином, антибиотиками, сывороткой и GM-CSF (50 нг/мл) со сменой среды на 4-е сутки после выделения. Затем промывали лунки 200 мкл PBS-буфера и сменяли среду на безсывороточную RPMI-1640 с глутамином и антибиотиками для последующей обработки выделенными везикулами.

Внеклеточные везикулы были выделены с помощью набора ExoQuick-TC (SBI, США) соглас-

но инструкции производителя. Осадок везикул ресуспендировали в 150 мкл PBS. Смесь везикул или PBS (по 50 мкл) добавлялась к моноцитам линии THP-1, а также к макрофагам 3-й группы от того же донора. После обработки везикулами клетки культивировались в течение суток, а затем кондиционированная среда была использована для оценки концентрации цитокинов.

Содержание цитокинов (TNF α , CCL-2, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) в среде оценивалось с помощью наборов для ИФА-анализа DuoSet ELISA Development kit (R&D Systems, США) и микропланшетного ридера Tecan Infinite F500.

Статистический анализ проводился с помощью программ JASP 0.18.3 и GraphPad Prism 10.2.2. Сравнение групп проводилось с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Обнаружено, что везикулы от стимулированных моноцитов и макрофагов повышали секрецию провоспалительных цитокина IL-6 и хемокина IL-8 у макрофагов-реципиентов по сравнению с везикулами от нестимулированных моноцитов и макрофагов и PBS ($p < 0,001$) (рис. 1). Различий

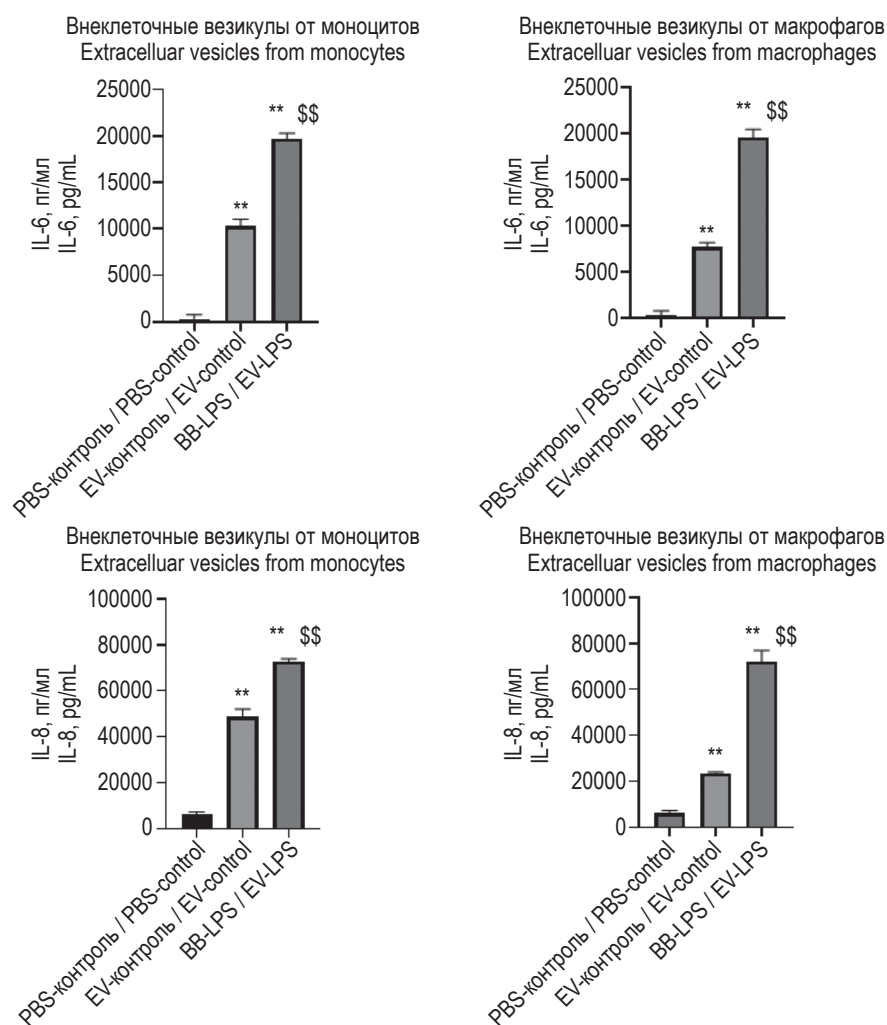


Рисунок 1. Секретия цитокинов макрофагами в ответ на везикулы от активированных моноцитов и макрофагов
Примечание. $n = 3$. Результаты представлены в виде среднего и стандартного отклонения. ** – различия $p < 0,01$ по сравнению с контролем PBS, \$\$ – различия $p < 0,01$ по сравнению с везикулами от нестимулированных LPS моноцитами/макрофагами. PBS-контроль – клетки, к которым добавили PBS в качестве контроля, BB-контроль – клетки, обработанные везикулами от нестимулированных моноцитов/макрофагов, BB-LPS – клетки, обработанные стимулированными LPS моноцитами/макрофагами.

Figure 1. Secretion of cytokines by macrophages in response to vesicles from activated monocytes and macrophages
Note. $n = 3$. Results are presented as mean and standard deviation. **, differences $p < 0.01$ compared to PBS control; \$\$, differences $p < 0.01$ compared to vesicles from non-stimulated monocytes/macrophages. PBS-control, cells to which PBS was added as a control; EV-control, cells treated with vesicles from non-stimulated monocytes/macrophages; EV-LPS, cells treated with lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages.

в секреции TNF α , CCL-2, IL-1 β , IL-10 выявлено не было.

Полученные результаты показывают, что коммуникация между моноцитами и макрофагами не ограничена только прямой секрецией растворимых молекул в межклеточное пространство. В этом процессе также участвуют вещества, передаваемые посредством внеклеточных везикул. Цитокины могут находиться как внутри, так и в составе мембраны везикулы. Благодаря упаковке в везикулы, выделяемые лейкоцитами цитокины могут транспортироваться к удаленным клеткам без разбавления. Липидная мембрана помогает защитить переносимый внутри груз от действия ингибиторов, ферментов деградации, фагоцитоза и т. д. А молекулы, встроенные в мембрану везикулы, в т. ч. цитокины, способны доставить транспортируемые вещества конкретно к клетке со специфическим рецептором на своей поверхности [4].

Полученные в данном исследовании результаты соотносятся с результатами других исследований. Так, в исследовании Tang и соавт. (2016) показано, что экзосомы стимулированных LPS моноцитов индуцируют экспрессию генов *CCL2*, *IL6*, и *ICAM1* через активацию транскрипционного фактора NF- κ B в клетках HUVEC [6]. de Silva и соавт. (2018) показали, что экзосомы, полученные от активированных LPS макрофагов и добавленные к культуре адипоцитов, изменяли экспрессию нескольких генов, среди которых

был ген хемокина *CXCL5*, участвующий в иммунном ответе. Также экзосомы отличались своим профилем микроРНК [1]. В другом исследовании оценивалось влияние экзосом стимулированных LPS моноцитов на мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в контексте костной регенерации. Был показан остеогенный эффект таких экзосом, что проявлялось в усилении экспрессии МСК генов остеогенных маркеров, ассоциированных с белками RUNX2 и BMP-2 [3]. Однако исследований, где оценивалось влияние стимулированных моноцитов/макрофагов на нестимулированные макрофаги, не найдено.

Заключение

Таким образом, внеклеточные везикулы действительно участвуют в развитии и распространении иммунного ответа моноцитов и макрофагов. Дополнительные исследования позволят подробнее раскрыть механизмы межклеточной коммуникации моноцитов и макрофагов, вовлеченных в патогенез многих заболеваний, и получить подсказки для развития новых терапевтических подходов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН за возможность использования научного оборудования.

Список литературы / References

1. de Silva N., Samblas M., Martínez J.A., Milagro F.I. Effects of exosomes from LPS-activated macrophages on adipocyte gene expression, differentiation, and insulin-dependent glucose uptake. *J. Physiol. Biochem.*, 2018, Vol. 74, pp. 559-568.
2. di Bella M.A. Overview and update on extracellular vesicles: considerations on exosomes and their application in modern medicine. *Biology (Basel)*, 2022, Vol. 11, no. 6, 804. doi: 10.3390/biology11060804.
3. Ekström K., Omar O., Granéli C., Wang X., Vazirisani F., Thomsen P. Monocyte exosomes stimulate the osteogenic gene expression of mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 9, e75227. doi: 10.1371/journal.pone.0075227.
4. Poveda E., Fitzgerald W., Reglero C., Pérez-González A., Mariño A., Álvarez H., Valcarce N., Llibre J.M., Guillén S.M., Muñoz Fernández M.A., Ruiz-Mateos E., Margolis L., Lederman M.M., Freeman M.L. Interleukin 18 (IL-18) and IL-3 in extracellular vesicles: biomarkers for durable elite control of HIV-1. *J. Infect. Dis.*, 2023, Vol. 227, no. 12, 1381. doi: 10.1093/infdis/jiad042.
5. Puhm F., Afonyushkin T., Resch U., Obermayer G., Rohde M., Penz T., Schuster M., Wagner G., Rendeiro A.F., Melki I., Kaun C., Wojta J., Bock C., Jilma B., Mackman N., Boilard E., Binder C.J. Mitochondria are a subset of extracellular vesicles released by activated monocytes and induce type I IFN and TNF responses in endothelial cells. *Circ. Res.*, 2019, Vol. 125, no. 1, pp. 43-52.
6. Tang N., Sun B., Gupta A., Rempel H., Pulliam L. Monocyte exosomes induce adhesion molecules and cytokines via activation of NF- κ B in endothelial cells. *FASEB J.*, 2016, Vol. 30, no. 9, pp. 3097-3106.

7. Wang Y., Zhao M., Liu S., Guo J., Lu Y., Cheng J., Liu J. Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell Death Dis.*, 2020, Vol. 11, no. 10, 924. doi: 10.1038/s41419-020-03127-z.
8. Willms E., Cabañas C., Mäger I., Wood M.J.A., Vader P. Extracellular vesicle heterogeneity: Subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 355368. doi: 10.3389/fimmu.2018.00738.

Авторы:

Эрдынеева Д.Б. — сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва; аспирант ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», г. Долгопрудный, Россия

Ставская Н.И. — сотрудник лаборатории молекулярной онкобиологии ФГБНУ «Институт биологии гена» Российской академии наук, Москва, Россия

Постнов А.Ю. — д.м.н., заведующий лабораторией клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Authors:

Erdyneeva D.B., Research Associate, Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow; Postgraduate Student, Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russian Federation

Stavskaya N.I., Research Associate, Laboratory of Molecular Oncobiology, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Postnov A.Yu., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of Cardiovascular System, Avtsin Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, 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

ОСТЕОАРТРИТ, АССОЦИИРОВАННЫЙ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ: РОЛЬ ПОВЫШЕННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ КИШЕЧНИКА И ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Ширинский И.В., Филатова К.Ю., Ширинский В.С.

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Целью исследования являлось изучение клинических проявлений остеоартрита (ОА) в сочетании с МС (ОАМС) и их связи с содержанием некоторых цитокинов, оценивающих выраженность системного воспаления, и уровнем липидов в сыворотке периферической крови. Обследовано 40 больных женщин с гонартрозом: 19 больных опытной группы, у которых ОА сочетался с метаболическим синдромом (МС), 21 больная ОА без МС. Все пациенты были пожилого возраста с избыточной массой тела. В первой подгруппе больных абсолютное большинство лиц было с ожирением, тогда как во второй подгруппе преобладали больные с лишним весом. У пациентов опытной подгруппы зарегистрировано статистически значимое увеличение объема талии в сравнении с больными без МС. Продолжительность течения ОА в обеих подгруппах не отличалась. Установлено, что метаболический фенотип гонартроза – ОА в сочетании с метаболическим синдромом, отличается от больных ОА без МС большей выраженностью боли, снижением уровня повседневной активности, увеличением бремени болезни и других симптомов ОА. Эти основные отличительные характеристики ассоциируются с низким уровнем качества жизни и клинически значимыми признаками депрессии. Метаболический тип гонартроза характеризуется более выраженными лабораторными признаками системного вялотекущего воспаления в сравнении с пациентами без МС, о чем свидетельствует увеличение содержания СРБ в три раза, повышение уровня ИЛ-6, ИЛ-18 в сыворотке ПК. Помимо этого, у больных с метаболическим фенотипом ОА выявлено пятикратное увеличение уровня специфического гуморального иммунного ответа к коллагену второго типа (Col2Ab) и дислипидемия – увеличение содержания холестерина ЛПНП и триглицеридов, при сопоставимом пониженном уровне холестерина ЛПВП. Заключается, что фенотип ОА в сочетании с МС, вероятно, обусловлен патогенетическим сходством ОА и МС (синтропия), основу которого составляет хроническое вялотекущее воспаление. Изучение патогенеза ОАМС фенотипа, разработка новых принципов терапии полиморбидности, должны основываться на подходах, ориентированных на пациента.

Ключевые слова: метаболический синдром, остеоартрит, полиморбидность, депрессия, цитокины, липиды, воспаление, липополисахарид, проницаемость кишечника, зонулин

Адрес для переписки:

Ширинский Иван Валерьевич
Научно-исследовательский институт терапии
и профилактической медицины
630089, Россия, г. Новосибирск,
ул. Бориса Богаткова, 175/1.
Тел.: 8 (913) 018-61-16.
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

Address for correspondence:

Ivan V. Shirinsky
Research Institute of Internal and Preventive Medicine
175/1 Boris Bogatkov St
Novosibirsk
630089 Russian Federation
Phone: +7 (913) 018-61-16.
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Ширинский, К.Ю. Филатова, В.С. Ширинский
«Остеоартрит, ассоциированный с метаболическим
синдромом: роль повышенной проницаемости
кишечника и хронического воспаления» // Медицинская
иммунология, 2024, Т. 26, № 5. С. 1127-1130.
doi: 10.15789/1563-0625-OAW-16877

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

For citation:

I.V. Shirinsky, E.Yu. Filatova, V.S. Shirinsky “Osteoarthritis
associated with metabolic syndrome: a role of increased gut
permeability and chronic inflammation”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5,
pp. 1127-1130.
doi: 10.15789/1563-0625-OAW-16877

© Shirinsky I.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-OAW-16877

OSTEOARTHRITIS ASSOCIATED WITH METABOLIC SYNDROME: A ROLE OF INCREASED GUT PERMEABILITY AND CHRONIC INFLAMMATION

Shirinsky I.V., Filatova E.Yu., Shirinsky V.S.

Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The purpose of the study was to evaluate the clinical manifestations of osteoarthritis (OA) in combination with MS (OAMS) and their relationship with concentration of several circulating proinflammatory cytokines, the level of lipids in peripheral blood serum. Forty women patients with knee OA were examined: 19 patients from the experimental group in whom OA was combined with metabolic syndrome (MS), 21 patients with OA without MetS. All patients were elderly and overweight. In the first subgroup of patients, the absolute majority of people were obese, while in the second subgroup, overweight patients predominated. Patients in the experimental subgroup showed a statistically significant increase in waist circumference compared to patients without MS. The duration of OA did not differ in both subgroups. It has been established that the metabolic phenotype of gonarthrosis – OA in combination with metabolic syndrome – differs from patients with OA without MS in greater severity of pain, a decrease in the level of daily activity, an increase in the burden of the disease and other symptoms of OA. These core characteristics are associated with poor quality of life and clinically significant symptoms of depression. The metabolic type of gonarthrosis is characterized by more pronounced laboratory signs of systemic low-grade inflammation in comparison with patients without MS, as evidenced by a threefold increase in CRP content and an increase in the level of IL-6, IL-18 in PC serum. In addition, in patients with the metabolic phenotype of OA, a fivefold increase in the level of a specific humoral immune response to type 2 collagen (Col2Ab) and dyslipidemia – an increase in the content of LDL cholesterol and triglycerides, with a comparable reduced level of HDL cholesterol – were revealed. It is concluded that the phenotype of OA in combination with MS is probably due to the pathogenetic similarity of OA and MS (syntropy), which is based on low-grade inflammation. Studying the pathogenesis of the OAMS phenotype and developing new principles for the treatment of multimorbidity should be based on patient-oriented approaches.

Keywords: metabolic syndrome, osteoarthritis, multimorbidity, depression, cytokines, lipids, inflammation, lipopolysaccharide, intestinal permeability, zonulin

Набор материала и анализ полученных результатов осуществлялись за счет средств, направленных на выполнение государственного задания НИИФКИ, тема 0415-2021-0001. Окончательный анализ результатов, подготовка и написание данной статьи проводились за счет средств, направленных на выполнение государственного задания НИИТГПМ – филиал ИЦиГ, тема FWNR-2024-0002.

Введение

Остеоартрит (ОА) относится к числу наиболее часто встречающихся заболеваний суставов. Выделяют несколько фенотипов ОА, среди которых наиболее распространен ОА, ассоциированный с метаболическим синдромом (ОАМС), характеризующийся высоким уровнем полиморбидности, возникающий в результате метаболических нарушений – абдоминального ожирения, сахарного диабета, инсулинорезистентности, дислипидемии, гиперурикемии, артериальной гипертензии [1]. Показано, что у людей с метаболическим синдромом (МС) риск развития ОА на

15% выше, висцеральное ожирение было также связано с увеличением риска ОА на 58%, гиперликемия – на 13% [8].

Предполагается, что ОА и составляющие МС взаимосвязаны одним патофизиологическим процессом – системным низкоуровневым воспалением [7], однако исследования, посвященные этой проблеме единичны. Одной из возможных причин поддержания хронического воспаления является эндотоксинемия, возникающая в результате всасывания в кровотоки липополисахарида (ЛПС), активного компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий, происходящих из микробиоты полости рта и кишечника или из обработанных пищевых продуктов [4]. Транслокация ЛПС из просвета кишечника в кровотоки может происходить через трансцеллюлярные или параклеточные пути [4], которые регулируются белком, содержащим зонулин, полученный из энтероцитов [4]. Нами были проведены сравнительные исследования клинических проявлений ОА в сочетании с МС и их связи с содержанием некоторых цитокинов, оценивающих выраженность системного воспаления, уровнем

липидов в сыворотке периферической крови, показателями проницаемости кишечника и эндотоксинемии [3, 6].

Материалы и методы

Обследовано 40 больных женщин с гонартрозом: 19 больных опытной группы, у которых ОА сочетался с метаболическим синдромом, 21 больная ОА без МС [3, 6]. Оценка функции суставов и забор крови проводились до приема пациентами лекарственных препаратов. Определение выраженности боли и других симптомов ОА, нарушения функции суставов, качества жизни, депрессии проводилась по шкалам KOOS (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score) [5], русскоязычной версии PHQ-9 (Patient Health Questionnaire – шкала депрессии) [2], визуально-аналоговой шкале (ВАШ) боли и здоровья. Уровень системного воспаления определяли с помощью оценки содержания IL-6, IL-10, IL-18 (АО «Вектор-Бест», Россия), адипонектина (Abcam, Великобритания), СРБ (АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн», Россия) в сыворотке периферической крови с помощью стандартных наборов для ИФА, согласно инструкциям фирм-производителей. Антитела к коллагену 2 (CoL2Ab) в сыворотке крови оценивали с использованием набора фирмы MyBioSource.com, содержание зонулина, липополисахарида (ЛПС), растворимого рецептора CD14-позитивных клеток (sCD14) в сыворотке крови оценивали с использованием набора для иммуноферментного анализа фирмы ООО «Алма-Бион», Россия, концентрацию липидов в сыворотке ПК определяли стандартным методом [3]. Описательная статистика представлена медианой, 25% и 75% межквартильными интервалами. Для выявления различий между сравниваемыми подгруппами использовали U-критерий Манна–Уитни [3, 6].

Результаты и обсуждение

Установлено, что больные опытной и контрольной групп были пожилого возраста, с «избыточной» массой тела или «ожирением», согласно определениям экспертов ВОЗ. В опытной подгруппе больных абсолютное большинство лиц было с ожирением, тогда как во второй подгруппе преобладали больные с избыточным весом. Выявлено, что по некоторым показателям больные ОАМС статистически значимо отличаются от больных ОА без МС, а по некоторым регистрируется сходство. Так, уровень боли по шкале ВАШ у пациентов опытной подгруппы в 1,5 раза больше, чем у больных контрольной подгруппы. В то же время интенсивность боли, оцениваемой по опроснику KOOS, у больных обеих подгрупп была одинаково умеренной. Оценка показателей общего состояния здоровья по шкале ВАШ выявила умеренное снижение значений показате-

лей в той и другой подгруппе, различий между подгруппами больных не установлено. Тяжесть симптомов гонартроза по субшкале KOOS симптомы у больных первой подгруппы была статистически значимо выше, и это ассоциировано с более высокими значениями уровня депрессии по опроснику PHQ-9. Показатель качества жизни по KOOS у больных опытной подгруппы был в 2 раза ниже, чем у больных контрольной подгруппы [3].

При исследовании биомаркеров в сыворотке периферической крови больных ОА было установлено более чем трехкратное увеличение лабораторных показателей системного воспаления (СРБ, IL-6, IL-18) у больных ОА в сочетании с МС, в сравнении с больными ОА без МС. У больных ОАМС в сыворотке ПК выявлено значительное увеличение содержания специфических антител к коллагену 2-го типа, в сравнение с контрольной подгруппой больных. Помимо этого установлено, что в опытной подгруппе больных ОА, в отличие от контрольной, статистически значимо повышены концентрации холестерина ЛПНП и триглицеридов [3].

Выявлено статистически значимое повышение уровня всех биомаркеров в опытной группе больных. Концентрации зонулина, sCD14 и ЛПС положительно коррелировали с индексом массы тела, сильные отрицательные корреляции установлены между содержанием зонулина, sCD14 и показателями боли по KOOS [6].

Заключение

Результаты поперечного исследования свидетельствуют о том, что метаболический фенотип гонартроза отличается от больных ОА без МС в первую очередь большей выраженностью боли и других симптомов ОА. Установленные характеристики ассоциируются с низким уровнем качества жизни и признаками депрессии. Метаболический тип гонартроза характеризуется лабораторными признаками системного вялотекущего воспаления, о чем свидетельствует увеличение содержания СРБ, IL-6, IL-18 в сыворотке ПК, а также повышением содержания антител к CoL2Ab и дислипидемией: увеличением уровня холестерина ЛПНП и триглицеридов [3]. У больных ОАМС, в отличие от больных ОА, установлено статистически значимое повышение в сыворотке ПК показателя проницаемости кишечника зонулина, липополисахарида грамотрицательных бактерий и sCD14 [6].

Считается, что ОА является болезнью эволюционного несоответствия и в настоящее время встречается гораздо чаще, чем в прошлом. В наших исследованиях показано, что сочетание нескольких болезней несоответствия (остеоартрит,

ожирение, гипертоническая болезнь) усиливает бремя ОА и уровень системного низкоуровневого воспаления. Одним из механизмов хронизации воспаления является увеличение концентрации в крови липополисахарида вследствие дисбиоза

кишечника и повышенной его проницаемости. Несомненно, что фенотип ОА в сочетании с МС требует разработки новых подходов к лечению как единой болезни (пациент-ориентированный подход).

Список литературы / References

1. Алексеева Л.И. Новые представления о патогенезе остеоартрита, роль метаболических нарушений // Ожирение и метаболизм, 2019. Т.16, № 2. С. 75-82. [Alekseeva L.I. New ideas about the pathogenesis of osteoarthritis, the role of metabolic disorders. *Ozhireniye i metabolizm = Obesity and Metabolism*, 2019, Vol. 16, no. 2, pp. 75-82. (In Russ.)]
2. Погосова Н.В., Довженко Т.В., Бабин А.Г., Курсаков А.А., Выгодин В.А. Русскоязычная версия опросников PHQ-2 и 9: чувствительность и специфичность при выявлении депрессии у пациентов общей медицинской амбулаторной практики // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2014. Т. 13, № 3. С. 18-24. [Pogosova N.V., Dovzhenko T.V., Babin A.G., Kursakov A.A., Vygodin V.A. Russian version of PHQ-2 and 9 questionnaires: sensitivity and specificity in detection of depression in outpatient general medical practice. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2014, Vol. 13, no. 3, pp. 18-24. (In Russ.)]
3. Ширинский В.С., Калиновская Н.Ю., Филатова К.Ю., Ширинский И.В. Клиническая и иммунологическая характеристика метаболического фенотипа остеоартрита // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 327-334. [Shirinsky V.S., Kalinovskaya N.Yu., Filatova K.Yu., Shirinsky I.V. Clinical and immunological features of metabolic phenotype of osteoarthritis. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 327-334. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CAI-1881.
4. Jialal I., Rajamani U. Endotoxemia of metabolic syndrome: a pivotal mediator of meta-inflammation. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, 2014, Vol. 12, no. 9, pp. 454-456.
5. Roos E.M., Roos H.P., Lohmander L.S., Ekdhahl C., Beynon B.D. Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) – development of a self-administered outcome measure. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, 1998, no. 28, pp. 88-96.
6. Shirinsky I., Kalinovskaya N., Filatova K., Shirinsky V. Serum markers of gut permeability and endotoxemia in patients with osteoarthritis of the knee associated with metabolic syndrome. *Int. J. Rheum. Dis.*, 2023, Vol. 26, no. 11, pp. 2344-2346.
7. Tan Q., Jiang A., Li W., Song C., Leng H. Metabolic syndrome and osteoarthritis: Possible mechanisms and management strategies. *Med. Nov. Technol. Devices*, 2021, Vol. 9, 100052. doi: 10.1016/j.medntd.2020.100052.
8. Zhang S., Wang D., Zhao J. Metabolic syndrome increases osteoarthritis risk: findings from the UK Biobank prospective cohort study. *BMC*, 2024, Vol. 24, 233. doi: 10.1186/s12889-024-17682-z.

Авторы:

Ширинский И.В. – д.м.н., ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией изучения мультиморбидности ревматических заболеваний, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Филатова К.Ю. – младший научный сотрудник лаборатории изучения мультиморбидности ревматических заболеваний, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Ширинский В.С. – д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории изучения мультиморбидности ревматических заболеваний, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shirinsky I.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Head, Laboratory for Studying Multimorbidity of Rheumatic Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Filatova K. Yu., Junior Research Associate, Laboratory for Studying Multimorbidity of Rheumatic Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Shirinsky V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory for Studying Multimorbidity of Rheumatic Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 02.04.2024

Отправлена на доработку 09.04.2024

Принята к печати 11.04.2024

Received 02.04.2024

Revision received 09.04.2024

Accepted 11.04.2024

Сидоров А.В.	941	Козлов В.А.	1079, 1093	Салимова Т.А.	1025
Абакарова Д.А.	983	Козлов В.В.	1061	Санин А.В.	1061
Абдуллаева Л.М.	1017	Колядич Ж.В.	933	Сапожников А.М.	905
Авагян А.С.	961	Коновалова М.В.	1099	Сарычева М.А.	1061
Акопов С.Б.	1099	Корноухова А.А.	941	Светлова Г.Н.	897
Алексеева Н.А.	891	Костромина М.А.	1099	Свищевская Е.В.	1099
Алмерзаева М.Р.	1001	Костюк С.Э.	1025	Свитич О.А.	961
Ангельская О.А.	1093	Кравченко Э.В.	953	Сизикова С.А.	913
Андреев С.Л.	1053	Красовский С.А.	1045	Синицкая А.А.	993
Арташян О.С.	967	Крукович А.Б.	913	Скворцов Н.В.	953
Атажахова М.Г.	1085	Кузнецов С.И.	897	Снежков Е.В.	1099
Баторова Д.С.	913	Кузьменко В.В.	941	Соколова К.В.	1037
Безрукова Е.В.	953	Кузьмина Н.С.	941	Солнцева В.К.	1009
Белоусова А.В.	1037	Куликовская Т.М.	975	Сосновская О.Ю.	1061
Беришвили М.Т.	1079	Кулинич С.С.	933	Ставская Н.И.	1121
Блинова Е.А.	1093	Купцова Д.Г.	1017	Тетерин Ю.В.	1085
Бочкова М.С.	1071	Курбатова О.В.	1017	Тимганова В.П.	1071
Бурмакина В.В.	961	Курмышкина О.В.	975	Тимотиевич Е.Д.	1107
Бутова Л.Г.	941	Кутузова В.И.	1001	Тыринова Т.В.	1115
Быкова М.В.	1079	Лебедев П.А.	897	Тюменцева Н.В.	967
Быстрицкая Е.П.	1009	Леплина О.Ю.	1115	Уразова О.И.	1053
Вавилова Ю.Д.	891	Литвинова А.М.	919	Усанина Д.И.	1071
Вартанова Н.О.	961	Лядова И.В.,	883	Устюжанин А.В.	983
Ведерникова А.В.	993	Мартынов А.В.	1045	Фадеев В.В.	941
Вейко Н.Н.	1025	Маслов О.Г.	1001	Филатова К.Ю.	1127
Виноградова К.В.	1107	Матвеева К.С.	927	Филипенко М.Л.	993
Винс М.В.	1053	Материкин А.И.	1009	Фисенко А.П.	1017
Власова А.А.	967	Маханёк А.А.	983	Хайтов М.Р.	1107
Волкова Т.О.	975	Мелконян К.И.	1085	Халивопуло И.К.	993
Волова Л.Т.	897	Минеева Н.Ю.	1001	Хоботкова Т.С.	993
Воробейчиков Е.В.	953	Миняйлова Н.Н.	993	Хорева М.В.	961
Вострова Е.И.	1061	Мовсисян Г.Б.	1017	Храмцова Ю.С.	967
Востров Ф.В.	1061	Морозова Н.А.	933	Хрейм Уаель Б.В.	941
Гаврилова Н.Ф.	941	Мурашкин Н.Н.	1009, 1017	Чапурин В.Н.	1085
Гладковская М.В.	1053	Мячев Е.А.	919	Чегодаев Е.С.	1031
Гончаренко С.А.	897	Намаканова О.А.	919	Чекнев С.Б.	1061
Городищенская С.В.	961	Наровлянский А.Н.	1061	Черешнева М.В.	1037
Горшкова Е.А.	919	Наумова Е.А.	1009	Черешнев В.А.	1037
Гречихина М.В.	905	Недоспасов С.А.	919	Черных Е.Р.	1115
Григорьева Е.А.	1061	Ненашева Т.А.	883	Чжан И.М.	1079
Гришачева Е.О.	993	Нестерова И.В.	1085	Чистякова Г.Н.	983
Гуломженов А.Г.	1053	Нижегородова Д.Б.	933	Чичерев Е.А.	1085
Гурский Д.А.	1107	Никифоров Н.Г.	1031	Чичерина Н.Р.	919
Гусякова О.А.	897	Николаева Т.Н.	1061	Чудакова Ю.М.	1045
Дадонов В.В.	993	Овсянникова О.В.	905	Чудилова Г.А.	1085
Данилова И.Г.	1037	Орехов А.Н.	1031	Чумакова С.П.	1053
Денисенко О.А.	1053	Осина Н.К.	897	Шабалдин А.В.	993
Дмитриева А.А.	1053	Останин А.А.	913	Шафиева И.А.	897
Друцкая М.С.,	919	Отставнов Г.А.	993	Шевелева О.Н.	883
Дёмин М.С.	1053	Парахина Д.В.	1017	Шевырев Д.В.	927
Ершова Е.С.	1025	Пашкина Е.А.	1079	Шиловский И.П.	1107
Есипов Р.С.	1099	Петричук С.В.	1017	Шипулин В.М.	1053
Жесткова Е.М.	1025	Попова М.В.	1107	Ширинский В.С.	1127
Журавлева Н.С.	1001	Попов М.А.	1031	Ширинский И.В.	1127
Заморина С.А.	1071	Постнов А.Ю.	1121	Шкитин Я.В.	993
Зафранская М.М.,	933	Потапов А.С.	1017	Шмарина Г.В.,	1045
Зварцев Р.В.	919	Пронин А.В.	1061	Шмарин В.В.	1045
Зубков А.В.	941	Пугачев Е.И.	897	Шумаков Д.В.	1031
Зубкова И.В.	941	Пухальская Д.А.	1045	Шустова О.А.	905
Зыбин Д.И.	1031	Радыгина Т.В.	1017	Эрдынеева Д.Б.	1121
Иванчик Г.И.	933	Ракутина М.Н.	1071	Юмашев К.В.	1107
Каганова М.М.	1107	Ремизова И.И.	983	Юшков Б.Г.	967
Кадочникова П.А.	983	Ровда Ю.И.	993	Яковлева А.С.	919
Коваленко Е.И.	891	Рыбцов С.А.	927	Яковлева И.В.	941
Кожевникова Т.Н.	1061	Савинова Е.А.	1025		

аберрантное воспаление	1046	линии опухолевых клеток	906	секвенирование РНК одиночных	
адаптивные NK-клетки.....	892	липиды	1127	клеток.....	927
адресная доставка	1080	липополисахарид	1115, 1127	септико-пиемическая форма	1086
активные формы кислорода	1072	люцигенин-зависимая		сигнатуры.....	927
ангиогенез.....	1054	макрофаги.....	1032, 1037, 1122	синоназальные	
антигенпредставляющая		мезодерма	884	новообразования.....	934
субпопуляция	1086	местноочаговая форма	1086	старение	927
атеросклероз	1032	метаболический синдром ..	1062, 1127	структура заболеваемости	984
атопический дерматит.....	1010	метилование.....	1010	сыворотка	898
аутоантитела	942	миграция.....	1054	терапия рака	1099
аутоиммунный гепатит.....	1018	микробиом.....	962	тимэктомия	994
белки теплового шока	906	миРНК	1108	толерантность.....	1032
биосовместимость	968	МкАт против рТТГ	942	транскриптомика.....	927
блокада альфа цепи рецептора		множественная миелома.....	913	тромботическая	
интерлейкина-7.....	1094	модели рака на животных	1099	микроангиопатия.....	1002
бронхолегочный процесс.....	1046	моноклональные антитела.....	906	тучные клетки.....	968
БТШ70	906	моноклеары	1026	фагоцитоз.....	1072
вкДНК.....	1026	моноциты.....	1032, 1122	фиброаденома молочной	
внеклеточные везикулы	1122	мочевая кислота	898	железы.....	976
воспаление.....	968, 1026, 1108, 1122, 1127	муковидиоз.....	1046	фиброз.....	920
воспалительные заболевания		мукозальный иммунитет.....	962	функциональная активность	
кишечника.....	1018	мультиплексный анализ.....	1094	моноцитов	984
врожденные пороки сердца	994	мутация гена CD46	1002	хемокины	1032, 1054
врожденный иммунитет.....	962, 1010	мышинная модель аутоиммунного		циклодекстрин	1080
гемогенный эндотелий.....	884	заболевания	942	цитокины ..	898, 920, 1010, 1018, 1032,
гены вирулентности		наночастицы.....	968	1037, 1046, 1086, 1094, 1108, 1127	
<i>K. pneumoniae</i>	984	нарушение толерантности		ЦМВ	892
гиалуроновая кислота.....	1080	к глюкозе.....	1046	часто болеющие дети	994
гипогаммаглобулинемия.....	1002	недоношенные новорожденные ..	984	чекпойнт-молекулы.....	1115
гипоксия	1054	нейтрофилы.....	1072	шизофрения	1026
гликолиз.....	1018	нейтрофильные гранулоциты	1086	экспериментальная модель.....	1062
двуцепочечная ДНК	1115	оксалиплатин	1080	экспрессия генов.....	962, 1010
дегидрогеназы	1018	оксид графена.....	1072	эндотелиальные прогениторные	
дегрануляция	968	опухолевое микроокружение	934	клетки.....	1054
дендритные клетки	934, 1115	опухоль поджелудочной железы ..	1099	эпигенетика	1010
депрессия	1127	ортопедическая модель	1099	CD309.....	884
дети.....	1002, 1018, 1086	остеоартрит.....	1127	CD43.....	884
дифференцировка β-клеток	1037	острый гематогенный		CD44.....	1080
дифференцировка иммунных		остеомиелит.....	1086	CD57 ⁺ NKG2C ⁺ NK-клетки.....	892
клеток <i>in vitro</i>	884	патологическое старение	962	CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ Treg	927
ДНК-иммунизация	942	подагрический артрит	898	GFP	1099
доклинические модели		полипозный риносинусит	934, 954	IFNα	1115
воспаления.....	920	полипренилфосфат натрия.....	1062	IFNα2b	954
долгожители	962	полиэтиленгликоль	1072	IFNγ.....	954
зонулин	1127	пролиферативный ответ.....	892	IL-6	920
иммунная защита.....	968	противомикробные		IL-7	1094
иммунный ответ.....	942, 1062	пептиды HBD1.....	962	IL-8	1026
иммунодефицит	994	противомикробные		IL-10	913
иммунорегуляция	976	пептиды HBD2.....	962	IL-18	898
иммунотропная терапия	954	полиморбидность	1127	IL-25	1108
инвертированная папиллома	934	провоспалительные цитокины.....	1122	IL-33	1108
индуцированные		проницаемость кишечника	1127	KREC	994
плюрипотентные		противоопухолевая		LPS	1032, 1122
стволовые клетки.....	884	иммунотерапия	906	NK-клетки	892
интерфероны	934	противоопухолевые свойства	1080	Pan02.....	1099
инфламасома NLRP3.....	898	проточная цитометрия	884, 976	PD-1	913
ишемическая кардиомиопатия ..	1054	проточно-цитометрический		sIgA	984
кишечная микробиота.....	1062	анализ.....	906	Т-лимфоциты.....	927
клеточная тест-система	898	псориаз.....	1018	Т-хелперы	1094
колонизация кишечника	984	псориатический артрит	1094	Th17-лимфоциты.....	1018
комплемент-блокирующая		рассеянный склероз.....	1018	TIM-3	913, 1115
терапия.....	1002	регуляторные Т-клетки	913	Toll-подобный рецептор.....	1026
консервативное лечение	954	рецептор NKG2A	892	Tr1	913
контрольные точки иммунного		РНК-интерференция	1108	TREC.....	994
ответа.....	976	рТТГ	942	Treg.....	1018
коэкспрессия	976	сахарный диабет 2 типа	1037	TSLP	1108
лекарственное средство.....	1062			α-клетки.....	1037
лимфоциты периферической				β-клетки.....	1037
крови	976				

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ КАК ИНДИКАТОРЫ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ЧУЖЕРОДНЫХ ЧАСТИЦ» (АВТОРЫ: АРТАШЯН О.С., ХРАМЦОВА Ю.С., ВЛАСОВА А.А., ТЮМЕНЦЕВА Н.В., ЮШКОВ Б.Г. [с. 967-974])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "MAST CELLS AS INDICATORS OF FOREIGN PARTICLE BIOCOMPATIBILITY" (AUTHORS: ARTASHYAN O.S., KHRAMTSOVA YU.S., VLASOVA A.A., TYUMENTSEVA N.V., YUSHKOV B.G. [pp. 967-974])

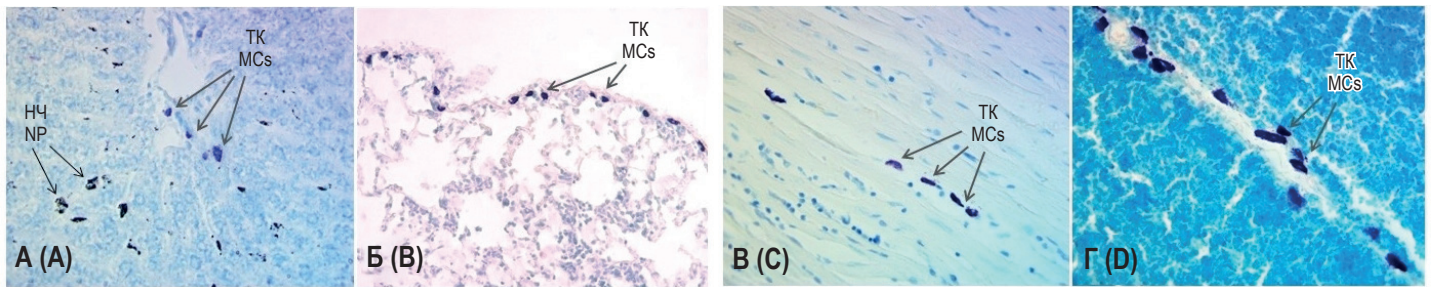


Рисунок 1. ТК в органах после введения железоуглеродных НЧ (окраска толуидиновым синим, ув. $\times 400$): А – печень через 1 сутки, Б – легкое через 7 суток, В – сердце через 7 суток, Г – тимус через 30 суток.

Figure 1. MCs in organs after injection of iron-carbon NP (colouring with toluidine blue, $\times 400$): A, liver after 1 day; B, lung after 7 days; C, heart after 7 days; D, thymus after 30 days

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ БЕТА-КЛЕТОК ПРИ РАЗВИТИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА» (АВТОРЫ: БЕЛОУСОВА А.В., СОКОЛОВА К.В., ДАНИЛОВА И.Г., ЧЕРЕШНЕВА М.В., ЧЕРЕШНЕВ В.А. [с. 1037-1044])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "FEATURES OF BETA CELL DIFFERENTIATION DURING THE DEVELOPMENT OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS" (AUTHORS: BELOUSOVA A.V., SOKOLOVA K.V., DANILOVA I.G., CHERESHNEVA M.V., CHERESHNEV V.A. [pp. 1037-1044])

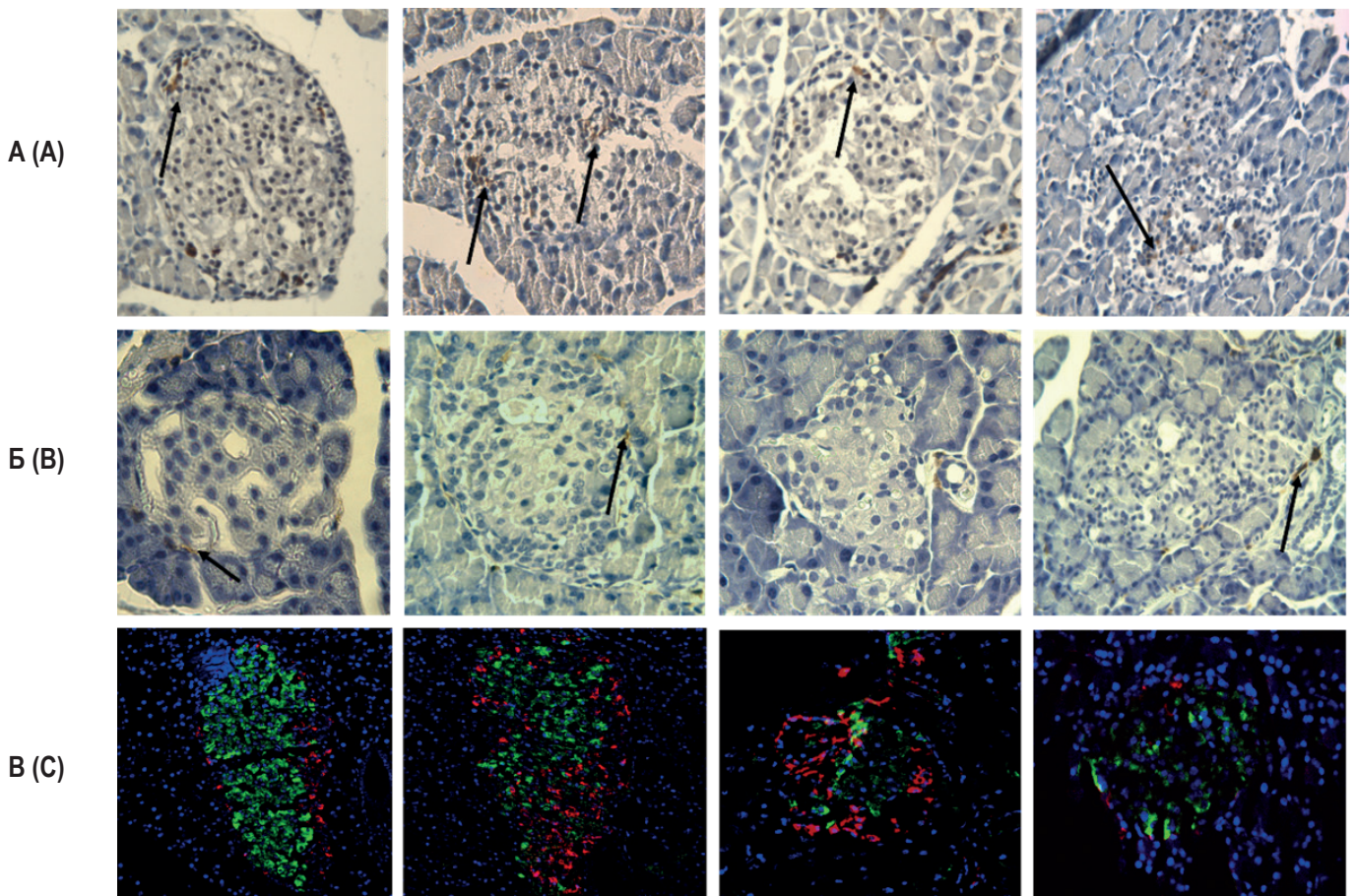


Рисунок 1. А – содержание в панкреатическом островке F4/80⁺ макрофагов (указаны стрелками), иммуногистохимическое окрашивание, световая микроскопия, $\times 200$. Б – содержание в панкреатическом островке CD163⁺ макрофагов. В основном они наблюдаются по периферии островка (указаны стрелками), иммуногистохимическое окрашивание, световая микроскопия, $\times 200$. В – двойное иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием антител к инсулину и глюкагону: цитоплазма инсулин+ клеток зеленая, цитоплазма глюкагон+ клеток красная. Ядра клеток окрашены синим. Конфокальная микроскопия, $\times 200$.

Figure 1. A, content of F4/80⁺ macrophages in the pancreatic islet (indicated by arrows), immunohistochemical staining, light microscopy, $\times 200$. B, content of CD163⁺ macrophages in the pancreatic islet. They are mainly observed along the periphery of the islet (indicated by arrows), immunohistochemical staining, light microscopy, $\times 200$. C, double immunofluorescent staining using antibodies to insulin and glucagon: the cytoplasm of insulin⁺ cells is green, the cytoplasm of glucagon⁺ cells is red. Cell nuclei are colored blue. Confocal microscopy, $\times 200$.

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311**

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >