

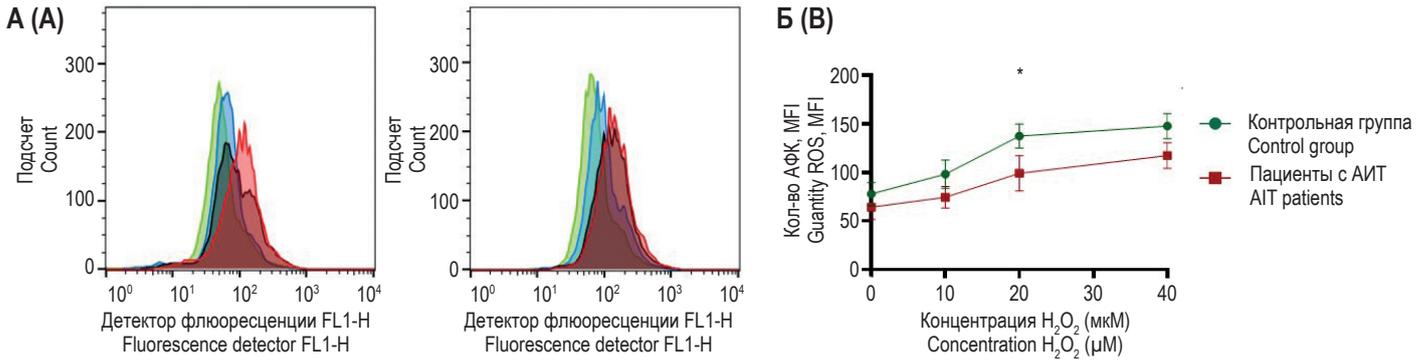
ISSN 1563-0625 (print)  
ISSN 2313-741X (online)

Том 27, № 4. С. 697-892

**2025**

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

# МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

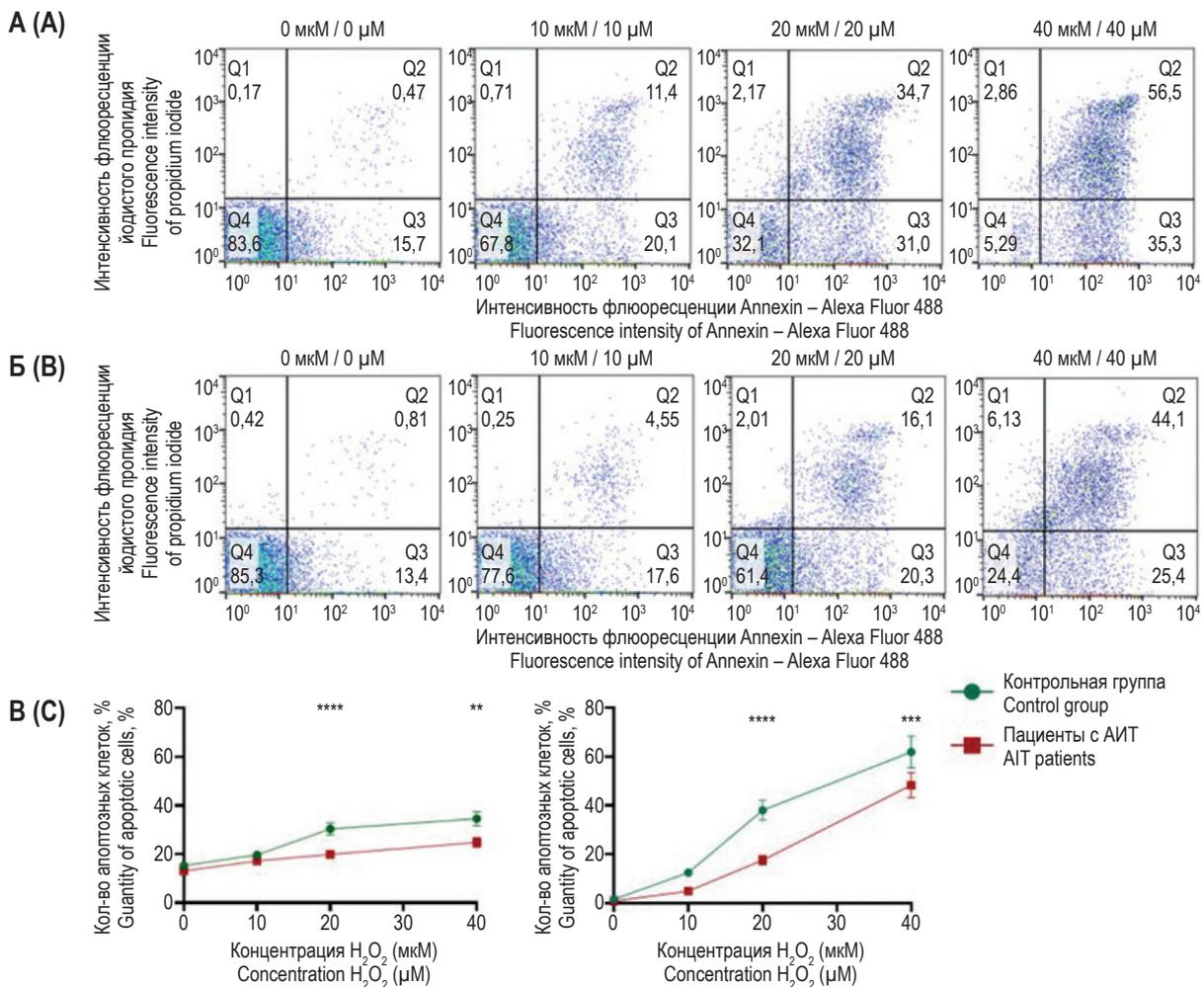


**Рисунок 1. Оценка количества АФК при возрастающей концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах**

**Примечание.** А – методом проточной цитофлуориметрии; клетки обработаны красителем 6-Карбокси-H2DCFDA, флуоресцирующим в зеленой области спектра. А (а) – образцы здоровых доноров, А (б) – образцы пациентов с АИТ. Зеленым, голубым, серым и красным цветом показаны количества добавленной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 10 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ соответственно. Б – относительное количество АФК у здоровых доноров (●) и пациентов с АИТ (■). \* – p < 0,05.

Figure 1. Evaluation of the amount of ROS with increasing concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes

Note. A, by flow cytofluorometry; cells were treated with 6-Carboxy-H2DCFDA dye, fluorescing in the green region of the spectrum. A (a), samples of healthy donors; A (b), samples of patients with AIT. The amounts of added H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are shown in green, blue, gray and red – 10 μM, 20 μM, 30 μM, 40 μM, respectively. B, relative amount of ROS in healthy donors (●) and patients with AIT (■). \*, p < 0.05.



**Рисунок 2. Оценка апоптотической активности в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах методом проточной цитометрии**

**Примечание.** Q1 – аннексин V-FITC<sup>+</sup>, йодид пропидия<sup>-</sup>; Q2 – аннексин V-FITC<sup>+</sup>, йодид пропидия<sup>+</sup>, Q3 – аннексин V-FITC<sup>+</sup>, йодид пропидия<sup>-</sup>; Q4 – аннексин V-FITC<sup>-</sup>, йодид пропидия<sup>+</sup>. CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты здоровых доноров (А) и пациентов с АИТ (Б) культивировали в отсутствие (0 мкМ) и в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ и 40 мкМ). В – изменения аннексин V-FITC<sup>+</sup>T-лимфоцитов у здоровых доноров (●) и пациентов с АИТ (■). а – «ранний» апоптоз (частицы, положительные только по аннексину V), б – «поздний» апоптоз (частицы, положительные по аннексину V и по йодиду пропидия). \*\* – p < 0,005, \*\*\* – p < 0,0005, \*\*\*\* – p < 0,0001). Репрезентативные данные.

Figure 2. Evaluation of apoptotic activity in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes by flow cytometry

Note. Q1, annexin V-FITC<sup>+</sup>, propidium iodide<sup>-</sup>. Q2, annexin V-FITC<sup>+</sup>, propidium iodide<sup>+</sup>. Q3, annexin V-FITC<sup>+</sup>, propidium iodide<sup>-</sup>. Q4, annexin V-FITC<sup>-</sup>, propidium iodide<sup>+</sup>. CD4<sup>+</sup>T lymphocytes from healthy donors (A) and patients with AIT (B) were cultured in the absence (0 μM) and presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM, 20 μM, 30 μM and 40 μM). (B) Changes in annexin V-FITC<sup>+</sup>T lymphocytes in healthy donors (●) and patients with AIT (■). a, "early" apoptosis (particles positive only for annexin V); b, "late" apoptosis (particles positive for both annexin V and propidium iodide). \*\*, p < 0.005; \*\*\*, p < 0.0005; \*\*\*\*, p < 0.0001). Representative data.

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

# МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

июль-август

**2025, том 27**

**№ 4**

---

Основан в марте 1999 года

## Главный редактор

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

## Исполняющий обязанности главного редактора

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

## Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

*Ответственный секретарь:*

Ракитянская Н.В.  
E-mail: medimmun@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 20.06.2025 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 28,75. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 025

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

**Михалеk 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**

July-August

**2025, volume 27**

**No. 4**

---

Published since March 1999

## Editor-in-Chief

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

## 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 20.06.2025. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 28.75. Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

**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

### Обзоры

Козлов В.А.

ОПУХОЛЕГЕНЕЗ КАК АУТОИММУННЫЙ ПРОЦЕСС .....703

Таскина Е.С., Кибалина И.В., Мудров В.А., Давыдов С.О.

ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ НЕЙРОВосПАЛЕНИЯ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ РАССТРОЙСТВАХ  
ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ .....713

Шекуфе Хатами, Фатемех Каземи, Париса Дорудгар, Сахар Шомейль Шуштару, Мохаммад Реза Аташар

CAR-T-КЛЕТКИ И МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОГРАММИРОВАНИЕ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....723

### Оригинальные статьи

Мангазеева Е.Д., Студеникина А.А., Михайлова Е.С., Морозов Д.В., Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Проскура А.В., Богачук А.П.,  
Липкин В.М., Аутеншилос А.И.

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ БИОПТАТАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА  
КАК КРИТЕРИЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЦЕТИЛ-АМИДНОЙ ФОРМЫ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА H1DF-6 ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЙ  
ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....739

Султанбаев А.В., Тузанкина И.А., Колядина И.В., Насретдинов А.Ф., Мусин Ш.И., Султанбаева Н.И., Меньшиков К.В., Измайлов А.А.,  
Султанбаев М.В., Кудлай Д.А.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННОЙ ЭНДОКРИНОТЕРАПИИ С CDK4/6-ИНГИБИТОРАМИ  
ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ HR<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup> РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....749

Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Костянюк М.В., Антонов А.В., Байрамов П.В., Вержбицкая Н.Е., Захаров В.Н., Колпинский Г.И., Глушков А.Н.

АССОЦИИ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К СТЕРОИДНЫМ ГОРМОНАМ, И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ  
С ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ .....761

Кит О.И., Гвалдин Д.Ю., Петрусенко Н.А., Тимошкина Н.Н., Савченко Д.А., Новикова И.А.

МикроРНК и ГЕНЫ-МИШЕНИ КАК РЕГУЛЯТОРЫ ИММУННЫХ СИГНАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ.....775

Михайлова В.А., Давыдова А.А., Загайнова В.А., Марко О.Б., Мкртчян Э.Р., Жулева А.С., Бакулина О.А., Сельков С.А.,  
Беспалова О.Н., Соколов Д.И.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ CD16 И NK62D НК-КЛЕТКАМИ, НК-КЛЕТКАМИ И Т-ЛИМФОЦИТАМИ  
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С БЕСПЛОДИЕМ У ЖЕНЩИН .....789

Чепанов С.В., Сиротская А.А., Соколов Д.И., Беспалова О.Н., Бабаков В.Н., Роговская Н.Ю., Орлова Е.С., Сельков С.А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ И РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ  
ПРИ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПАТОЛОГИЯХ .....803

Рахматуллаева М.М.

ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ ВЛАГАЛИЩА ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА.....823

Ровда Ю.И., Ведерникова А.В., Шабалдин А.В., Халивопуло И.К., Филипенко М.Л., Миняйлова Н.Н., Шмакова О.В., Отставнов Г.А.,  
Вакулова Т.М., Бухтоярова О.С., Краснова Н.В., Анчикова Т.А., Мухамадияров Р.А., Дадонов В.В., Катаныхова М.В., Торгунакова А.В.

ДИАГНОСТИКА РИСКА ИЛИ НАЛИЧИЯ ИММУНОДЕФИЦИТНОГО СОСТОЯНИЯ У ДЕТЕЙ, СВЯЗАННОГО  
С СУБАТРОФИЕЙ, АТРОФИЕЙ И ПЕТРИФИКАЦИЕЙ ТИМУСА .....831

Бурцева А.В., Тихонова А.Н., Афанасьева З.А., Абрамова З.И.

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ КИНАЗЫ mTOR В CD4<sup>+</sup>Т-ЛИМФОЦИТАХ  
ПРИ АУТОИММУННОМ ТИРЕОИДИТЕ.....847

Балацкая Н.В., Воробьева Е.П., Куликова И.Г., Андрюшин А.Е.

ЗНАЧЕНИЕ ОЦЕНКИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ ПРИ ВОЗРАСТНОЙ  
МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ.....863

### Краткие сообщения

Абакушина Е.В., Журиков Р.В., Румянцев С.А.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТКИ С ТРИЖДЫ НЕГАТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПОМОЩЬЮ  
АДОПТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ .....873

Егоров А.Н., Гольдерова А.С., Готовцев Р.А., Троев И.П., Николаева И.Э.

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ У МЫШЕЙ ПРИ МЕЛАНОМЕ B16.....881

Правила для авторов.....889

Авторский указатель.....892

Предметный указатель.....892

## CONTENTS

### Reviews

*Kozlov V.A.*

**TUMORIGENESIS AS AN AUTOIMMUNE PROCESS** ..... 703

*Taskina E.S., Kibalina I.V., Mudrov V.A., Davydov S.O.*

**CEREBRAL MARKERS OF NEUROINFLAMMATION AND NEURODEGENERATION IN HYPERTENSIVE DISORDERS DURING PREGNANCY** ..... 713

*Shekoufeh Hatami, Fatemeh Kazemi, Parisa Doroudgar, Sahar Shomeil Shushtari, Mohammad Reza Atashzar*

**CAR T CELLS AND METABOLIC PROGRAMMING: A REVIEW** ..... 723

### Original articles

*Mangazeeva E.D., Studenikina A.A., Mikhailova E.S., Morozov D.V., Ryzhikova S.L., Druzhinina Yu.G., Proskura A.V., Bogachuk A.P., Lipkin V.M., Autenshlyus A.I.*

**CYTOKINE PRODUCTION BY THE BIOPATES OF INVASIVE NON-SPECIFIC BREAST CARCINOMA AS A CRITERION FOR THE USE OF ACETYL-AMIDE FORM OF SYNTHETIC HLDf-6 PEPTIDE FOR DIFFERENTIATION THERAPY OF BREAST CANCER**..... 739

*Sultanbaev A.V., Tuzankina I.A., Kolyadina I.V., Nasretidinov A.F., Musin Sh.I., Sultanbaeva N.I., Menshikov K.V., Izmailov A.A., Sultanbaev M.V., Kudlay D.A.*

**EFFICIENCY OF COMBINED ENDOCRINE THERAPY WITH CDK4/6 INHIBITORS IN METASTATIC HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> BREAST CANCER: IMMUNOLOGICAL ASPECTS** ..... 749

*Polenok E.G., Gordeeva L.A., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Bayramov P.V., Verzhbitskaya N.E., Zakharov V.N., Kolpinskiy G.I., Glushkov A.N.*

**ASSOCIATIONS OF STEROID-SPECIFIC ANTIBODIES AND POLYMORPHISMS OF CYTOKINE GENES WITH TUMOR PROLIFERATION IN BREAST CANCER PATIENTS** ..... 761

*Kit O.I., Gvaldin D.Yu., Petrusenko N.A., Timoshkina N.N., Savchenko D.A., Novikova I.A.*

**MicroRNAs AND TARGET GENES AS REGULATORS OF COLON CANCER IMMUNE SIGNALING** ..... 775

*Mikhailova V.A., Davydova A.A., Zagaynova V.A., Marko O.B., Mkrtchyan E.R., Zhguleva A.S., Bakulina O.A., Selkov S.A., Bespalova O.N., Sokolov D.I.*

**EXPRESSION FEATURES OF CD16 AND NKG2D RECEPTORS BY NK CELLS, NKT CELLS AND T LYMPHOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD ASSOCIATED WITH FEMALE INFERTILITY** ..... 789

*Chepanov S.V., Sirotskaya A.A., Sokolov D.I., Bespalova O.N., Babakov V.N., Rogovskaya N.Yu., Orlova E.S., Selkov S.A.*

**DETERMINATION OF CYTOKINE AND GROWTH FACTOR LEVELS TO ASSESS ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN REPRODUCTIVE PATHOLOGIES**..... 803

*Rakhmatullaeva M.M.*

**INDEXES OF NONSPECIFIC IMMUNE PROTECTION OF THE VAGINA BEFORE AND AFTER TREATMENT OF BACTERIAL VAGINOSIS**..... 823

*Rovda Yu.I., Vedernikova A.V., Shabaldin A.V., Khalivopulo I.K., Filipenko M.L., Minyailova N.N., Shmakova O.V., Ostavnov G.A., Vakulova T.M., Bukhtoyarova O.S., Krasnova N.V., Anchikova T.A., Mukhamadiyarov R.A., Dadonov V.V., Katanakhova M.V., Torgunakova A.V.*

**DIAGNOSIS OF THE RISK, OR EXISTENCE OF IMMUNODEFICIENCY STATE IN CHILDREN ASSOCIATED WITH SUB-ATROPHY AND PETRIFICATION OF THE THYMUS**..... 831

*Burtseva A.V., Tikhonova A.N., Afanasyeva Z.A., Abramova Z.I.*

**INFLUENCE OF OXIDATIVE STRESS ON THE ACTIVITY OF mTOR KINASE IN CD4<sup>+</sup>T LYMPHOCYTES IN AUTOIMMUNE THYROIDITIS**..... 847

*Balatskaya N.V., Vorobyova E.P., Kulikova I.G., Andryushin A.E.*

**SIGNIFICANCE OF ASSESSING THE INFLAMMATORY MARKERS OF VASCULAR WALL ACTIVATION IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION** ..... 863

### Short communications

*Abakushina E.V., Zhurikov R.V., Rumiantsev S.A.*

**TREATMENT OUTCOME IN A PATIENT WITH TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER USING ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY** ..... 873

*Egorov A.N., Golderova A.S., Gotovtsev R.A., Troev I.P., Nikolaeva I.E.*

**A ROLE OF BLOOD PLASMA CYTOKINES IN MICE WITH B16 MELANOMA**..... 881

**Instructions to Authors**..... 889

**Author index**..... 892

**Subject index**..... 892

## ОПУХОЛЕГЕНЕЗ КАК АУТОИММУННЫЙ ПРОЦЕСС

Козлов В.А.

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

**Резюме.** Данные, представленные в статье, обоснованно говорят о том, что реакции иммунной системы в ходе развития аутоиммунной патологии и в процессе опухолевого роста, по существу, являются аутоиммунными реакциями, направленными на аутоантигены тканей различных органов и опухоль-ассоциированные антигены. Последние, помимо самой опухоли, экспрессируются клетками нормальных органов и тканей. При этом различия характеризуются недостаточной активностью клеток-супрессоров в первом варианте и повышенной активностью во втором варианте. Следует учитывать возможность идентичности механизмов реагирования лимфоцитов как при аутоиммунной патологии, так и при онкогенезе. Положение об аутоиммунности опухолевого процесса является принципиально важным моментом с точки зрения биологии опухолевого роста, а с точки зрения медицины оно может стать вектором поиска новых медикаментозных воздействий, направленных на подавление супрессорной активности регуляторных клеток без риска индуцировать аутоиммунные заболевания. На основании имеющихся литературных данных можно говорить о том, что процесс формирования аутоиммунной патологии основан на нарушении механизмов иммунной толерантности к аутоантигенам. При этом данные механизмы касаются как центральной толерантности, так и периферической толерантности. В первом случае Т-клетки с высокоаффинным рецептором с активностью против аутоантигенов не подвергаются негативной селекции в тимусе и мигрируют на периферию с готовностью индуцировать аутоиммунные процессы. При этом на периферии Т-регуляторные супрессорные клетки не срабатывают в отношении подавления их активности. Налицо нарушение механизмов как центральной, так и периферической толерантности. В случае опухолевого роста показано, что подавление активности Т-регуляторных клеток заканчивается развитием аутоиммунной патологии на фоне торможения роста опухоли. Последние данные мировой литературы позволяют говорить о направленности реакции клеток иммунной системы против опухоль-ассоциированных антигенов, а не против опухоль-специфических антигенов. Следует предположить, что эти Т-клетки эффекторы против опухоль-ассоциированных антигенов оказались на периферии также после миграции из тимуса, не пройдя негативной селекции. Однако на периферии их противоопухолевая активность была подавлена Т-регуляторными клетками. По-видимому, следует считать, что реакция иммунной системы на рост опухоли носит характеристики аутоиммунной реакции на опухоль-ассоциированные антигены с индукцией механизмов ее активности с помощью Т-регуляторных клеток иммунной системы.

*Ключевые слова:* опухолегенез, онкогенез, тимус, аутоантигены, миграция Т-клеток, Т-регуляторные клетки, иммунопатология

### Адрес для переписки:

Козлов Владимир Александрович  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 222-26-74.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: vakoz40@yandex.ru

### Address for correspondence:

Vladimir A. Kozlov  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
14 Yadrintsevskaya St  
Novosibirsk  
630099 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 222-26-74.  
Fax: +7 (383) 222-70-28.  
E-mail: vakoz40@yandex.ru

### Образец цитирования:

В.А. Козлов «Опухолегенез как аутоиммунный процесс»  
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 4.  
С. 703-712. doi: 10.15789/1563-0625-TAA-3152  
© Козлов В.А., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

V.A. Kozlov "Tumorigenesis as an autoimmune process",  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,  
2025, Vol. 27, no. 4, pp. 703-712.  
doi: 10.15789/1563-0625-TAA-3152  
© Kozlov V.A., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-TAA-3152

## TUMORIGENESIS AS AN AUTOIMMUNE PROCESS

Kozlov V.A.

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

**Abstract.** The data presented in the article reasonably indicate that the immune system responses during the development of autoimmune pathology and in the process of tumor growth are, in fact, autoimmune responses directed at autoantigens of various tissues and organs, and tumor-associated antigens. The latter, in addition to the tumor itself, are also expressed by the cells of normal organs and tissues. At the same time, the differences are characterized by insufficient activity of suppressor cells in the first variant, and enhanced activity in the second variant. One should take into account a potential identity of the mechanisms of lymphocyte responses, both in autoimmune pathology and in oncogenesis. The concept of autoimmunity promoting the tumor development is a fundamentally important point, with regard of the tumor growth biology. In view of medicine, this approach may provide a vector for searching novel drug effects aimed at inhibiting the suppressor activity of regulatory cells, without higher risk of inducing autoimmune disorders. On the basis of available literature data, one may suggest that the formation of autoimmune pathology is caused by the impaired mechanisms of immune tolerance to autoantigens. Moreover, these mechanisms concern both central tolerance and peripheral tolerance. In the first case, T cells bearing high-affinity receptors directed against autoantigens are not subject to negative selection in the thymus and migrate to the periphery, being ready to induce autoimmune processes. At the same time, peripheral T regulatory suppressor cells do not work with respect to suppression of their activity. There is an evident disturbance of the both central and peripheral tolerance mechanisms. In the case of tumor growth, it has been shown that suppression of T regulatory cells results in development of autoimmune pathology, along with inhibition of tumor growth. The recent data from the literature allow us to suggest a targeted reaction of immune cells against tumor-associated antigens, and not against tumor-specific antigens. One should assume that these T cell effectors against tumor-associated antigens also have reached the peripheral tissues after migration from the thymus, without undergoing negative selection. However, their antitumor activity on the periphery could be suppressed by T regulatory cells. Apparently, it should be considered that the immune response to tumor growth exhibited features of an autoimmune response to tumor-associated antigens with induction of its activities by means of T regulatory immune cells.

*Keywords:* tumorigenesis, oncogenesis, thymus, autoantigens, T cell migration, T regulatory cells, immunopathology.

Имеются данные, свидетельствующие об увеличении риска развития опухоли на фоне аутоиммунной патологии и аутоиммунной реакции при опухолевом росте [11]. Несколько слов об основах активности иммунной системы при аутоиммунной патологии и опухолевом росте. Аутоиммунный процесс характеризуется наличием аутоантител и цитотоксических Т-клеток к различным антигенам тканей и органов организма и ослабленной супрессорной функцией Т-регуляторных клеток (Treg) прежде всего. В свою очередь не контролируемый рост опухоли происходит на фоне ослабленной или отсутствующей специфической противоопухолевой активности цитотоксических Т-клеток эффекторов и гиперактивности супрессорных Treg. Естественно, что эти два иммунокомпрометированных процесса характеризуются многими «второстепенными» процессами, сопровождающими их формирование. На первый взгляд, эти два процесса противоположны друг другу по активности

клеток с эффекторной и регуляторной активностями. Но так ли это?

Несколько слов об органе, который является местом производства всех, абсолютно всех Т-лимфоцитов. Этим органом является тимус. Формирование в тимусе Т-клеточного отдела иммунной системы происходит в три этапа: миграция клеток-предшественников из костного мозга в тимус [43, 45]; ряд дифференцировочно-пролиферативных процессов в тимусе и, наконец, миграция клеток из тимуса с расселением на периферии [37]. Перед миграцией из тимуса клетки проходят этап негативной селекции, когда клетки с незначительной аффинностью ТКР (клеточный рецептор тимоцитов) мигрируют из тимуса, клетки со средней аффинностью дифференцируются в иммунорегуляторные клетки Treg, а клетки с высокой степенью аффинности ТКР погибают в тимусе [13]. Стоит подчеркнуть, что аффинность определяет степень родства ТКР к эпитопам различных аутоантигенов, презентруемых эпителиальными и дендритными клетками тимуса. Как

можно видеть, крайние степени родства ТКР к эпитомам определяют и противоположную судьбу клеток: гибель и миграцию. Средняя степень аффинности довольствуется дифференцировкой наивных тимоцитов в Treg [17].

Возможно, к сожалению, тимус является одним из первых органов, который, по-видимому, подвержен процессу инволюции, постепенному снижению с возрастом морфофункциональных характеристик. Существует несколько мнений по поводу механизмов возрастной инволюции тимуса. Одно из них рассматривает в качестве причины данного процесса снижение миграции в тимус с возрастом из костного мозга клеток ранних предшественников Т-клеток. Другое мнение основывается на данных о дефектах клеточных стромальных ниш в костном мозге и тимусе [23]. Разумно предположить, что оба этих механизма участвуют в формировании процесса инволюции тимуса в равной или не равной степени, но они оба, несомненно, будут принимать участие. Здесь необходимы дополнительные исследования. Думается, что нельзя не принимать во внимание роль в процессе инволюции тимуса дендритных клеток, одних из основных индукторов как гибели тимоцитов, так и участников избегания тимоцитами процесса негативной селекции с последующей их миграцией на периферию, что будет вносить вклад в уменьшение клеточности в тимусе в процессе старения [17].

Сам по себе процесс инволюции тимуса с первого года жизни несет на себе патофизиологический груз, заключающийся в том, что постепенно с возрастом на периферии уменьшается число Т-клеток, принимающих участие в распознавании чужеродных, в том числе и опухолевых антигенов. При этом далеко не все Т-клетки, настроенные против аутоантигенов, погибают в тимусе в результате негативной селекции при участии генов AIRE и Fezf2 [28]. А для чего тогда одновременно с наивными Т-клетками в тимусе воспроизводятся регуляторные клетки Treg, которые при миграции из тимуса на периферии направлены на подавление, прежде всего, активности аутоагрессивных Т-клеток? Надо думать, что на периферии Treg будут подавлять активность тех Т-клеток-эффекторов, активность которых направлена против аутоантигенов и которые не погибли в тимусе в результате негативной селекции. Как это происходит в онтогенезе, не совсем ясно. Происходит ли негативная селекция тимоцитов и образование Treg-клеток к одним и тем же антигенным эпитомам, а не погибшие клетки мигрируют вместе с Treg к одним и тем же антигенным эпитомам? А последние в тимусе не способны подавлять активность будущих индукторов аутоиммунных реакций? Или эти оба процесса несут

некий ступенчатый характер с добавлением количества эпитопных характеристик в обоих процессах в процессе онтогенеза?

Теперь о мигрантах Т-клетках с незначительной аффинностью ТКР к эпитомам, которые на периферии становятся наивными Т-клетками (нТ-клетки) [41]. В принципе, у них три судьбы: либо распознать чужеродный антиген и вовлечься в процесс формирования иммунного ответа к нему, либо провзаимодействовать с аутоантигенами и отдифференцироваться в клетку памяти [10], либо в условиях воспаления встать на путь дифференцировки в клетки-эффекторы [12]. Третий путь имеет место быть у нТ-клеток на периферии – это под влиянием действия на них TGF- $\beta$  и IL-6 превратиться в регуляторные iTreg [31].

Но и это еще не совсем все. Оказывается, при увеличении количества какого-либо аутоантигена эти Т-клетки с низко-аффинным ТКР могут инициировать «нормальный» аутоиммунный ответ с образованием клеток-эффекторов [40]. Такое впечатление, что Т-клеточные мигранты из тимуса выполняют роль «троянского коня» при увеличении количества какого-либо собственного антигена. Принято считать, что клетки с высоко аффинным рецептором к эпитомам аутоантигенов погибают в тимусе и не мигрируют из него. Но так ли это всегда? По крайней мере показано, что при определенных ситуациях активность того же AIRE-гена снижается и часть Т-клеток с высоко аффинным рецептором к эпитомам аутоантигенов мигрируют из тимуса и взаимодействуют на периферии с аутоантигенами. Это показано при изучении влияния женских половых гормонов и лекарственных препаратов типа denosumab [35]. Причем во втором случае это касается Т-клеток, специфических к эпитомам аутоантигенов и опухолю-ассоциированных антигенов (ОАА), так как регистрировался противоопухолевый эффект указанных в случае denosumab и индукций аутоиммунных реакций в женском организме [2]. Уместно напомнить, что ОАА являются представителями ауто-антигенов и подобные им экспрессируются также и на нормальных клетках различных органов. Представляется интересным снижение или отсутствие супрессорного эффекта в обоих случаях в отношении этих мигрировавших клеток со стороны как tTreg, так и iTreg на периферии. По-видимому, это может говорить в пользу предположения, что те клетки тимуса с высоко аффинным рецептором, которые должны были погибнуть в тимусе в результате негативной селекции, либо резистентные к действию регуляторных клеток либо их супрессорная активность этих клеток снижена.

В литературе описано достаточное количество данных, свидетельствующих об участии Т-клеток в опухолевом росте, как на уровне цитотоксических клеток эффекторов, так и на уровне регуляторных клеток с иммуносупрессорной активностью [1, 32]. При этом цитотоксическая активность  $CD8^+$  лимфоцитов подавлена внутри опухолевого микроокружения. Можно опереться на данные о результатах противоопухолевого эффекта антител против чек-пойнт молекул PD-1, PDL-1 и CTLA-4. Показано, что применение этих антител, обладающих противоопухолевой активностью в определенной степени, способствует индукции у 60% опухоленосителей аутоиммунного процесса в виде формирования различного рода аутоиммунных синдромов [22]. Подобного рода данные были получены при лечении пациентов с меланомой препаратом адьювантом интерфероном  $\alpha$ -2b, когда на фоне положительного терапевтического эффекта в отношении самой опухоли появлялись различные симптомы аутоиммунной патологии [14]. О чем можно думать в этом случае, если иммуносупрессия способствует активации иммунокомпетентных клеток эффекторов, участвующих в индукции аутоиммунных реакций? Не говорит ли это о том, что активность этих аутоагрессивных клеток эффекторов была направлена против тех аутоантигенов, которые относятся к ОАА (опухоль-ассоциированные антигены) на опухолевых клетках и одновременно являются составной частью антигенного материала клеток других органов и тканей? Если бы цитотоксичность Т-клеток в опухолевом микроокружении была направлена против ОСА (опухоль-специфические антигены, или неоантигены, являющиеся продуктами мутировавших генов и отсутствующие на нормальных клетках), то использование чек-пойнт-антител не должно приводить к развитию аутоиммунных реакций, так как среди нормальных клеток отсутствуют клеточные элементы с антигенными характеристиками, подобными ОСА и поэтому клетки вне опухоли не подвергались бы цитотоксическому действию Т-клеток-эффекторов после снятия супрессорного действия на Treg. По-видимому, можно думать, что подавление супрессорной активности регуляторных клеток затрагивает не только активность Treg, располагающихся в опухолевом микроокружении, которая направлена на подавление активности  $CD8^+$  клеток-эффекторов с цитотоксической активностью против опухолевых антигенов, включая и ОСА, и ОАА опухолевых клеток. Возможно, при этом подавляется активность тех Treg, которые ингибировали активность Т-клеток-эффекторов против аутоантигенов, не экспрессированных на опухолевых клетках. В литературе нет данных об

индукции чек-пойнт-антителами аутоиммунных реакций в интактном, безопухолевом организме. Интересные данные получены при лечении опухолевых пациентов, у которых до опухолевого процесса регистрировалась та или иная аутоиммунная патология [19]. С одной стороны, аутоиммунная патология в большей или меньшей степени связана с миграцией из Т-клеток с высокоаффинным ТКР к аутоантигенам, активность которых не была подавлена теми же Treg на периферии. С другой стороны, в случае опухоли, аналогично из тимуса мигрировали Т-клетки с высокоаффинным ТКР к ОАА, но активность которых была заингибирована Treg. Во-первых, интересно, одни и те же или разные эпитопы выступают в роли мишеней в обеих патологиях? И почему в первом случае регистрируется недостаточная супрессорная активность регуляторных клеток, а во втором — повышенная активность, но только в отношении цитотоксических Т-клеток, участвующих в противоопухолевом иммунитете? Остается предположить, что клетки самой опухоли продуцируют некие факторы, усиливающие супрессорную активность регуляторных клеток. О снятии иммуносупрессорного эффекта при действии на опухоль чек-пойнт-антител говорят данные о торможении роста опухоли и даже полная остановка роста опухоли. Следовательно, чек-пойнт-антитела вызывают подавление супрессорной активности Т-клеток, что ведет к ингибции роста опухоли и в дальнейшем к индукции аутоиммунной реакции. Такова предполагаемая цепь событий при действии антител против контрольных молекул.

Очевидно, как в случае спонтанно развивающихся аутоиммунных заболеваний, так и в случае индуцированных аутоиммунных реакций в ходе терапии опухолей регистрируется цитотоксическая активность Т-клеток эффекторов в отношении аутоантигенов на фоне снижения активности регуляторных Т-клеток супрессоров. То есть в первом случае мы имеем дело с активным аутоиммунным процессом, во втором случае речь идет о потенциальном развитии аутоиммунного процесса против ОАА, как бы временного подавленного регуляторными механизмами. Но суть при этом одна и та же: развитие реакций, направленных на взаимодействие с аутоантигенами.

В процессе онтогенеза многочисленные воздействия на организм (радиация, инфекция, цитотоксические и другие лекарственные средства, инволюция тимуса, старение) индуцируют лимфопению (Lymphopenia-Induced Proliferation, LIP). Гомеостатические механизмы внутри иммунной системы делают все, чтобы исправить эту ситуацию. Корректирующие лимфопению механизмы подразделяют на два: медленная го-

меостатическая пролиферация, поддерживаемая комплексом ГКГС с низкой аффинностью к аутоантигенам, IL-7 и IL-15 [8, 38]; быстрая спонтанная пролиферация, индуцированная IL-6 и взаимодействием высокой аффинности рецепторов с аутопептидами или с пептидами симбиозных бактерий, презентированными молекулами ГКГС [21, 26, 36].

Интересные данные получены при изучении механизмов гомеостатической пролиферации, причем в самом процессе принимают участие до 30% клеток. Показано, что в процессе гомеостатической пролиферации регистрируется накопление клеток с аутоагрессивностью против собственных антигенов как наивных, так и клеток памяти, при этом первые могут дифференцироваться во вторые, увеличивая их численность [30]. Следовательно, определенная степень продолжения аутораспознавания является физиологическим требованием Т-клеточного гомеостаза. Очевидно, узнавание комплекса ауто-ГКГС/пептид чрезвычайно важно для процесса гомеостатической пролиферации, который сохраняет постоянный уровень пула периферических Т-клеток. Уместно здесь напомнить, что все Т-клетки в тимусе в процессе негативной селекции проходят ритуал знакомства с аутоантигенами, презентированными эпителиальными и дендритными клетками. Данные литературы неопровержимо говорят об индуцирующей роли лимфопении в индукции развития целого ряда аутоиммунных заболеваний. Интересно, что довольно часто лимфопения является одним из показателей иммунопатогенеза данных заболеваний [30]. При этом эти клетки проявляли активность и против опухолевых антигенов, которые следует отнести к разряду ОАА, так как в процессе пролиферации Т-клетки могут сталкиваться с презентацией эпитопов ОАА. Было выдвинуто предположение даже о возможности использования индукции гомеостатической пролиферации для терапии опухолей [6]. Показано, что процесс гомеостатической пролиферации индуцирует цитотоксический эффект Т-клеток также против клеток опухолевых метастазов [6]. Несомненно, это может свидетельствовать о том, что специфичность ОАА, тождественная, по-видимому, с аутоантигенами собственных тканей организма, не изменяется в метастазах основной опухоли.

В принципе, специфические к ОАА Т-клетки должны проходить в тимусе процесс негативной селекции с последующей индукцией иммунной толерантности к ОАА по центральному типу. Следует думать, что в случаях индукции аутоиммунной реакции и противоопухолевой активности при гомеостатической пролиферации эти

Т-клетки со специфическими ТКР к ним не подверглись процессу негативной селекции и мигрировали на периферию с потенциальной способностью реагировать на собственные антигены. Однако на периферии их цитотоксическая активность в обоих случаях не подавлялась супрессии со стороны тех же Treg, возможно, это связано с недостаточной пролиферативной активностью этих клеток при гомеостатической пролиферации. Другое дело, представляется не ясным идентичность или не идентичность эпитопов тех аутоантигенов, которые в одном случае участвуют в индукции в аутоиммунной реакции, а в другом – в процессе формирования противоопухолевого иммунитета.

В принципе, два гена (AIRE и Fezf2), экспрессирующиеся в эндотелиальных клетках в тимусе, несут ответственность за процесс негативной селекции в тимусе, который определяет гибель клеток в тимусе с высоко аффинными рецепторами со спецификой к эпитопам аутоантигенов. Предполагается, что в сумме эти два гена отвечают за гибель Т-клеток в тимусе со специфическими TCR приблизительно к 2000 эпитопам аутоантигенов. По некоторым данным, Aire ген взаимодействует с продуктами 1553 генов, а Fezf2 ген – с 640 генами [39]. Эти число ниже количества эпитопов аутоантигенов в организме если учесть, что количество белок-кодирующих генов в организме насчитывается до 19411. Вероятно, что данные о роли этих двух генов будут дополняться числом эпитопов аутоантигенов, которые будут распознаваться с их участием. Биоинформатический анализ показывает, что более 60% тканево-специфических антигенов в mTECs регулируются Aire и/или Fezf2 генами. Не исключено, что существуют и другие гены, подобные AIRE и Fezf2, участвующие в процессе негативной селекции. Наконец, нельзя исключить возможность, что некое число Т-клеток со спецификой к определенной части эпитопов-аутоантигенов мигрируют из тимуса, не подвергаясь процессу негативной селекции. Естественно и то, что при нарушении активности генов AIRE и Fezf2, на периферию будут мигрировать Т-клетки с высоко аффинными рецепторами против аутоантигенов, индуцируя развитие аутоиммунных реакций. По-видимому, для подавления аутоагрессивных Т-клеток, которые мигрируют на периферию из тимуса, не подвергаясь негативной селекции, и формируется популяция клеток Treg, которые мигрируют из тимуса. Именно последним отведена роль ингибиторов активности аутоагрессивных Т-лимфоцитов на периферии для предотвращения развития аутоиммунной патологии.

Показано, что активность AIRE-гена контролируется половыми гормонами. Известно, что

женщины болеют аутоиммунными заболеваниями в три и более раз чаще мужчин. Оказалось, что женские половые гормоны подавляют активность данного гена, что является причиной миграции из тимуса Т-клеток с активностью против эпитопов аутоантигенов, что и является, по-видимому, одной из причин развития у них аутоиммунной патологии [35]. Что касается мужских половых гормонов, то они обладают противоположным эффектом, усиливая экспрессию AIRE-гена и активность процесса негативной селекции [2]. Возможно, с этим их эффектом связан факт, что онкопатология регистрируется чаще у мужчин, чем у женщин. Кстати, следует упомянуть, что в процессе старения у мужчин снижается уровень продукции того же тестостерона [33], что может проявляться снижением активности AIRE гена с последующим увеличением частоты заболевания аутоиммунной патологии в старом возрасте. Инволюция тимуса быстрее протекает у мужчин, чем у женщин со всеми вытекающими последствиями [16, 18], как то: уменьшение числа клеток, мигрирующих из тимуса, количества составляющих популяцию наивных Т-клеток на фоне возрастания численности Treg. И все это реализуется в виде повышенной склонности к развитию аутоиммунной и онкопатологии [23].

Было обнаружено, что в индукции центральной Т-клеточной толерантности в тимусе принимает участие ген *Vtn2a2* своим поверхностным рецептором *butyrophilin* на тимических эпителиальных клетках. Оказалось, что гипофункция этого гена у мышей обуславливает усиление функциональной активности CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток на фоне изменения активности Treg-клеток. При этом у этих можно индуцировать заболевание «экспериментальный аутоиммунный энцефаломиэлит». Кроме того, у мышей регистрировалось усиление активности клеток противоопухолевого иммунитета [29]. Можно думать, что Т-клетки с нарушенной экспрессией данного гена АПК имели специфическую направленность к одним и тем же эпитопам аутоантигенов как в случае индукции аутоиммунного процесса, так и в случае опухолевых клеток, экспрессирующих определенные ОАА.

Данные, приведенные выше, свидетельствуют об участии в противоопухолевом иммунном ответе ОАА, помимо ОСА. С другой стороны, ОАА являются теми же антигенами, против которых, этих же или других ОАА тех же опухолевых клеток направлено действие иммунокомпетентных клеток-эффекторов с индукцией аутоиммунной реакции. Показано, что при спонтанном развитии опухоли в организме животных определяются цитотоксические лимфоциты со специфической активностью против ОАА, активность которых

может быть усилена при помощи дополнительной иммунизации этими антигенами, но регрессия опухоли сопровождается индукцией аутоиммунного процесса [27]. При этом оказалось, что, усиливая аффинность ТКР к ОАА, можно индуцировать противоопухолевый иммунный ответ к этой же опухоли без видимых признаков индукции аутоиммунной реакции [34]. Эти данные дополнительно свидетельствуют о роли аутоиммунной реакции организма в противоопухолевом иммунитете с участием ответа к ОАА.

Отдельные данные говорят о том, что в клетках отдельных опухолей ОАА составляет до 94% от всего числа антигенов на клеточной поверхности. К сожалению, такие данные отсутствуют в отношении большей части опухолей. Нет четких данных о числе мутаций в соматических клетках, являющихся потенциальной предтечей развития опухоли. Показано, например, что среди взрослых стволовых клеток тонкого кишечника, толстого кишечника, печени определяется около 40 новых мутаций в год [3]. Имеются неопровержимые доказательства роста числа опухолей в процессе старения. По данным ВОЗ, к 2050 году пропорция больных раком среди пациентов старше 60 лет увеличится с 12% до 22% и достигнет значения 2 миллиарда человек [9]. В то же время, также в процессе старения, регистрируется увеличение признаков развития аутоиммунной патологии [42]. Данные подобного рода ставят вопрос о подобии механизмов развития этих двух патологий и конкретно о роли ОАА, если принять во внимание участие последних в индукции противоопухолевого иммунитета. Можно предполагать, что Т-клетки с TCR достаточно высокой аффинностью к эпитопам ОАА резистентные к процессу негативной селекции в тимусе мигрируют из тимуса на периферию, где их активность подавляется Treg. В дальнейшем эти Treg по механизму инфекционной супрессии подавляют иммунный ответ уже к ОСА, индуцируя активность Treg, ингибирующих ответ клеток-эффекторов, специфических к эпитопам ОСА [15]. Следует подчеркнуть, что ОСА не презентуются эпителиальными и дендритными клетками в тимусе и ответ к ним формируется на периферии по законам классических иммунных ответов клеточного или гуморального типов. Не исключено, что здесь подключается еще один механизм супрессии, под названием *bystander* (подави свидетеля), когда регуляторные клетки, индуцированные в ответе к одному антигену, подавляют ответ к другому антигену с участием других антиген-презентирующих клеток [24]. Все эти данные дают основание говорить о преимущественном, первоочередным ответом иммунной системы при опухолевом росте на аутоантигены (ОАА),

которые являются потенциальными индукторами развития аутоиммунной патологии. При этом аутоантигены при опухолевом росте и аутоиммунном процессе могут быть разные, но базисный механизм, по-видимому, один и тот же – миграция на периферию Т-клеток из тимуса с TCR высокой аффинности, специфическими для эпитопов аутоантигенов. Принципиальные различия заключаются в том, что при опухолевом процессе возрастает супрессорная активность Treg, а при аутоиммунном процессе супрессорная активность Treg снижается. Удобней предположить для онкогенеза, что клетки опухоли, которых нет при аутоиммунном процессе, являются индукторами повышения супрессорной активности Treg. В пользу этого предположения имеются данные в литературе [1]. С точки зрения последовательности развития аутоиммунного и опухолевого процессов при старении организма можно предположить следующее. По времени в онтогенезе аутоиммунность формируется достаточно рано, когда активность CD8<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов находится на достаточно высоком уровне, чтобы участвовать в гибели соматических клеток, а недостаточность активности Treg не позволяет осуществить супрессию цитотоксических клеток. В процессе старения организма активность последних снижается, и супрессивного потенциала Treg недостаточно, чтобы нейтрализовать цитотоксическую активность Т-клеток. При этом и опухолевые клетки определенного генеза начинают продуцировать субстанции, способные повышать супрессорную активность регуляторных клеток. Вопрос о сочетанности или несочетанности аутоиммунного процесса и онкогенеза в возрастном аспекте упирается в проблему однородности или не однородности тех аутоантигенов, которые индуцируют и аутоиммунный и опухолевый процессы, или одни аутоантигены являются мишенью для развития аутоиммунного процесса, другие – для опухолевого процесса. Представляется логичным, что суть здесь одна: в обоих случаях мишенью действия цитотоксических лимфоцитов являются аутоантигены.

Несколько слов о происхождении опухолевых клеток в организме как таковых. Если учесть огромное количество мутировавших клеток в организме, возникающих на протяжении всего онтогенеза организма, и тот факт, что из всего этого множества реализуется трансформация в опухолевую только у одной клетки, то какова роль в этом процессе соотношения на поверхности ОАА и ОСА во взаимодействии с иммунной системой? В литературе сформировалось предположение о роли механизмов «иммунного редактирования» опухолевого роста [7, 25]. Противоопухолевый иммунный процесс подразделяется на три фазы:

ликвидация (elimination), равновесие (equilibrium), убежание (escape). С точки зрения антигенности опухолевой клетки, фаза ликвидации должна быть обусловлена сильным иммунным ответом и, по-видимому, без существенного участия Treg. Возможно, здесь иммунная система реагирует, в основном, на ОСА без участия в процессе ОАА. Фаза равновесия, очевидно, характеризуется вовлечением в процесс ОАА с постепенным накоплением в опухолевом микроокружении клеток с супрессорной активностью. Наконец фаза убежания отражает законченность процессами формирования супрессорного состояния в окружении опухоли в результате механизмов, сопровождающих ответ к ОАА клетками, к которым была выработана периферическая толерантность с участием Treg. В принципе, вряд ли представляется возможным проследить все эти три фазы развития на одной опухоли, когда фазу ликвидации вообще невозможно отследить ввиду гибели опухоли как таковой. Фазы равновесия и убежания подразделяются по формальным признакам, ибо не описаны случаи обратного развития опухоли в случае «победы» эффекторных клеток иммунной системы. Тогда фаза равновесия – это просто временная стадия развития фазы убежания, когда процесс движется только в одну сторону.

Известно, что гибель Т-клеток в тимусе, индуцированная AIRE-геном в ЭКТ, происходит при взаимодействии таких факторов, как RANK и RANKL, экспрессированных на тимоцитах и ЭКТ, участвующих в процессе негативной селекции. Показано, что блокада взаимодействия RANKL на ЭКТ с RANK на тимоцитах с помощью моАt denosumab способствует миграции из тимуса Т-клеток с высоко-аффинным рецептором, специфичным для ауто-антигенов, без влияния на них негативной селекции [4]. При этом регистрируется значительный противоопухолевый эффект, который усиливается при совместном использовании этих антител с чек-пойнт-антителами [5, 20, 35]. Полученные результаты следует интерпретировать с точки зрения миграции из тимуса Т-клеток со специфическими рецепторами для ОАА, но не для ОСА, так как последние являются неоантигенами для организма, и они не экспрессируются клетками тимуса и не подвергаются процессу негативной селекции.

Таким образом, представленные литературные данные позволяют говорить о том, что онкопатологию следует относить к аутоиммунной патологии, ибо основа онкопатологии, так же как и аутоиммунной патологии, составляет реакция Т-клеток со специфичностью их ТКР к определенным эпитопам аутоантигенов, расположенным на клетках нормальных органов и

тканей при аутоиммунной патологии или на опухолевых клетках. По-видимому, при обеих патологиях в патогенезе принимают участие одни и те же регуляторные клетки с иммуносупрессорной активностью тимусного происхождения, а именно nTreg, которым уготована роль хранителей иммунной толерантности к аутоантигенам. При наличии общих характеристик иммунопатогенеза (наличие аутоантигена и цитотоксических Т-лимфоцитов), различия касаются функциональной активности клеток Treg, активность которых подавлена при аутоиммунной патологии и увеличена при онкопатологии. Именно последние различия лежат в основе отличий в активности цитотоксических Т-лимфоцитов, с

проявлением их активности при аутоиммунной патологии и подавленной активности при онкопатологии. Если учесть, что после проведения чек-пойнт-иммунотерапии опухоли активность цитотоксических лимфоцитов возобновляется в полную силу, тогда вся тяжесть различий в иммунопатогенезе ложится на популяцию клеток Treg, когда вся иммунотерапия должна быть направлена на стимуляцию их активности при аутоиммунной патологии и подавление активности – в онкопатологии. Безусловно, иммунотерапия в обоих случаях должна носить комплексный характер с учетом различных частных характеристик иммунопатогенеза обеих патологий.

## Список литературы / References

1. Ahmadpour S., Habibi M.A., Ghazi F.S., Molazadeh M., Mohammad Pashaie M.R., Mohammadpourf Y. The effects of tumor-derived supernatants (TDS) on cancer cell progression: A review and update on carcinogenesis and immunotherapy. *Cancer Treat. Res. Commun.*, 2024, Vol. 40, 100823. doi: 10.1016/j.ctarc.2024.100823.
2. Berrih-Aknin S., Panse R.L., Dragin N. AIRE: a missing link to explain female susceptibility to autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2018, Vol. 1412, no. 1, pp. 21-32.
3. Blokzijl F., de Ligt J., Jager M., Sasselli V., Roerink S., Sasaki N., Huch M., Boymans S., Kuijk E., Prins P., Nijman I.J., Martincorena I., Mokry M., Wiegerinck C.L., Middendorp S., Sato T., Schwank G., Nieuwenhuis E.E., Verstegen M.M., van der Laan L.J., de Jonge J., IJzermans J.N., Vries R.G., van de Wetering M., Stratton M.R., Clevers H., Cuppen E., van Boxtel R. Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. *Nature*, 2016, Vol. 538, pp. 260-264.
4. Castellano D., Sepulvera J.M., Garcia-Escobar I., Rodrigues-Antolin A., Sundlo V.A., Cortes-Funes C. The Role of RANK-ligand inhibition in cancer: the story of denosumab. *Oncologist*, 2011, Vol. 16, pp. 136-145.
5. de Groot A.F., Appelman-Dijkstra N.M., van der Burg S.H., Kroep J.R. The anti-tumor effect of RANKL inhibition in malignant solid tumors – A systematic review. *Cancer Treat. Rev.*, 2018, Vol. 62, pp. 18-28.
6. Dummer W., Niethammer A.G., Baccala R., Lawson B.R., Wagner N., Reisfeld R.A., Theofilopoulo A.N. T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 110, pp. 185-192.
7. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.*, 2002, Vol. 3, no. 11, pp. 991-998.
8. Ernst B., Lee D.S., Chang J.M., Sprent J., Surh C.D. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in periphery. *Immunity*, 1999, Vol. 11, pp. 173-181.
9. Fane M., Weeraratna A.T. How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2020, Vol. 20, no. 2, pp. 89-106.
10. Fink P.J. The biology of recent thymic emigrants. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 31-50.
11. Franks A.L., Slansky J.E. Multiple associations between a broad spectrum of autoimmune diseases, chronic inflammatory diseases and cancer. *Anticancer Res.*, 2012, Vol. 329, no. 4, pp. 1119-1136.
12. Friesen T.J., Ji Q., Fink P.J. Recent thymic emigrants are tolerized in the absence of inflammation. *J. Exp. Med.*, 2016, Vol. 213, no. 6, pp. 913-920.
13. Gill J., Malin M., Sutherland J., Gray D., Hollander G., Boyd R. Thymic generation and regeneration. *Immunol. Rev.*, 2003, Vol. 195, pp. 28-50.
14. Gogas H., Ioannovich J., Dafni U., Stavropoulou-Giokas C., Frangia K., Tsoutsos D., Panagiotou P., Polyzos A., Papadopoulos O., Stratigos A., Markopoulos C., Bafaloukos D., Pectasides D., Fountzilias G., Kirkwood J.M. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N. Engl. J. Med.*, 2006, Vol. 354, no. 7, pp. 709-718.
15. Gravano D.M., Vignali D.A. The battle against immunopathology: infectious tolerance mediated by regulatory T cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2012, Vol. 69, no. 12, pp. 1997-2008.
16. Gui J.G., Mustachio L.M., Su D M., Craig R.W. Thymus size and age-related thymic involution: Early programming, sexual dimorphism, progenitors and stroma. *Aging Dis.*, 2012, Vol 3, no. 3, pp. 280-290.
17. Hadeiba H., Butcher E.C. Thymus-homing dendritic cells in central tolerance. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 6, pp. 1425-1429.

18. Hun M.L., Wong K., Gunawan J.R., Alsharif A., Quinn, K., Chidgey A.P. Gender disparity impacts on thymus aging and LHRH receptor antagonist-induced thymic reconstitution following chemotherapeutic damage. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 302. doi: 10.3389/fimmu.2020.00302.
19. Kennedy C., Bhatia S., Thompson J.A., Grivas P. Preexisting autoimmune disease: implications for immune checkpoint inhibitor therapy in solid tumors. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, 2019, Vol. 17, no. 6, pp. 750-757.
20. Khan I.S., Mouchess M.L., Zhu M.L., Conley B., Fasano K.J., Hou Y., Fong L., Su M.A., Anderson M.S. Enhancement of an anti-tumor immune response by transient blockade of central T cell tolerance. *J. Exp. Med.*, 2014, Vol. 211, no. 5, pp. 761-768.
21. Kieper W.C., Troy A., Burghardt J.T., Ramsey C., Lee J.Y., Jiang H.Q., Dummer W., Shen H., Cebra J.J., Surh C.D. Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 6, pp. 3158-3163.
22. Kumara P., Bhattacharyya P., Prabhakar B.S. A comprehensive review on the role of co-signaling receptors and treg homeostasis in autoimmunity and tumor immunity. *J. Autoimmun.*, 2018, Vol. 95, pp. 77-99.
23. Liang Z., Dong X., Zhang Z., Zhang Q., Zhao Y. Age-related thymic involution: Mechanisms and functional impact. *Aging Cell*, 2022, Vol. 21, no. 8, e13671. doi: 10.1111/ace1.13671.
24. Millington O.R., Mowat A.M., Garside P. Induction of bystander suppression by feeding antigen occurs despite normal clonal expansion of the bystander T cell population. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 10, pp. 6059-6064.
25. Mittal D., Gubin M.M., Schreiber R.D., Smyth M.J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases – elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, Vol. 27, pp. 16-25.
26. Moses C.T., Thorstenson K.M., Jameson S.C., Khoruts A. Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, Vol. 100, pp. 1185-1190.
27. Overwijk W.W., Theore M.R., Finkelstein S.E., Surman D.R., de Jong L.A., Vyth-Dreese F.V., DelleMijn T.A., Antony P.A., Spiess P.J., Palmer D.C., Heimann D.M., Klebanoff C.A., Yu Z., Hwang L.N., Feigenbaum L., Kruisbeek A.M., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8 T cells. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, no. 4, pp. 569-580.
28. Qi Y., Zhang R., Lu Y., Zou X., Yang W. Aire and Fezf2, two regulators in medullary thymic epithelial cells, control autoimmune diseases by regulating TSAs: Partner or complement? *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 948259. doi: 10.3389/fimmu.2022.948259.
29. Sarter K., Leimgruber E., Gobet F., Agrawal V., Dunand-Sauthier I., Barras E., Mastelic-Gavillet B., Kamath A., Fontannaz P., Guéry L., Duraes F.V., Lippens C., Ravn U., Santiago-Raber M.L., Magistrelli G., Fischer N., Siegrist C.A., Hugues S., Reith W. Btn2a2, a T cell immunomodulatory molecule coregulated with mhc class II genes. *J. Exp. Med.*, 2016, Vol. 213, pp. 177-187.
30. Sheu T.T., Chiang B.L. Lymphopenia, lymphopenia-induced proliferation, and autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 8, 4152. doi:10.3390/ijms22084152
31. Shevach E.M., Thornton A.M. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 259, no. 1, pp. 88-102.
32. Speiser D.E., Miranda R., Zakarian A., Bachmann M.F., McKall-Faienza K., Odermatt B., Hanahan D., Zinkernagel R.F., Ohashi P.S. Self antigens expressed by solid tumors do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J. Exp. Med.*, 1997, Vol. 186, no. 5, pp. 645-653.
33. Stanworth R.D., Jones T.H. Testosterone for the aging male; current evidence and recommended practice. *Clin. Interv. Aging*, 2008, Vol. 3, no. 1, pp. 25-44.
34. Stone J.D., Harris D.T., Kranz D.M. TCR affinity for p/MHC formed by tumor antigens that are self-proteins: impact on efficacy and toxicity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2015, Vol. 33, pp. 16-22.
35. Su M.A., Anderson M.S. Pulling RANK on cancer: blocking Aire-mediated central tolerance to enhance immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.*, 2019, Vol. 7, pp. 854-859.
36. Tajima M., Wakita D., Noguchi D., Chamoto K., Yue Z., Fugo K., Ishigame H., Iwakura Y., Kitamura H., Nishimura T. IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, pp. 1019-1027.
37. Takaba H., Takayanagi H. The mechanisms of T cell selection in the thymus. *Trends Immunol.*, 2017, Vol. 38, no. 11, pp. 805-816.
38. Tan J.T., Dudl E., LeRoy E., Murray R., Sprent J., Weinberg K.I., Surh C.D. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, Vol. 98, pp. 8732-8737.
39. Tomofuji Y., Takaba H., Suzuki H.I., Benlaribi R., Martinez C.D.P., Abe Y., Morishita Y., Okamura T., Taguchi A., Kodama T., Takayanagi H. Chd4 choreographs self-antigen expression for central immune tolerance. *Nat. Immunol.*, 2020, Vol. 8, pp. 892-901.
40. Tuncel J., Holmberg J., Haag S., Hopkins M.H., Wester-Rosenlöf L., Carlsen S., Olofsson P., Holmdahl R. Self-reactive T cells induce and perpetuate chronic relapsing arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2020, Vol. 22, no. 1, 95. doi: 10.1186/s13075-020-2104-7.

41. van den Broek T., Borghans J.A.M., van Wijk F. The full spectrum of human naive T cells. *Nat. Rev. Immunology*, 2018, Vol. 18, no. 6, pp. 363-373.
42. Wang Y., Dong C., Han Y., Gu Z., Chi Sun C. Immunosenescence, aging and successful aging. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 942796. doi: 10.3389/fimmu.2022.942796.
43. Zdrojewicz Z., Pachura E., Pachura P. The thymus: a forgotten, but very important organ. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2016, Vol. 25, no. 2, pp. 369-375.
44. Zhu M.L., Bakhru P., Conley B., Nelson J.S., Free M., Martin A., Starmer J., Wilson E.M., Su M.A. Sex bias in CNS autoimmune disease mediated by androgen control of autoimmune regulator. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, 11350. doi: 10.1038/ncomms11350.
45. Zúñiga-Pflücker J.C. The original intrathymic progenitor from which T cells originate. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 1, pp. 3-4.

---

**Автор:**

**Козлов В.А.** — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный консультант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

---

**Author:**

**Kozlov V.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Scientific Advisor, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 29.11.2024

Отправлена на доработку 02.12.2024

Принята к печати 23.03.2025

---

Received 29.11.2024

Revision received 02.12.2024

Accepted 23.03.2025

## ЦЕРЕБРАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ РАССТРОЙСТВАХ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Таскина Е.С., Кибалина И.В., Мудров В.А., Давыдов С.О.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Чита, Россия

**Резюме.** Преэклампсия/эклампсия во время беременности и послеродового периода являются основными факторами риска материнской и младенческой заболеваемости и смертности во всем мире. При этом более 70% материнских смертельных исходов имеют неврологическую причину, обусловленную эклампсией, отеком головного мозга, внутричерепным кровоизлиянием и инсультом. Генерализованная эндотелиальная дисфункция, обусловленная плацентарными антиангиогенными факторами, приводит к повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера и нарушению ауторегуляции мозгового кровообращения. Результаты проведенных исследований показали, что преэклампсия повышает риск цереброваскулярных и сердечно-сосудистых заболеваний, а также когнитивных нарушений вплоть до развития деменции в будущем. Согласно недавно предложенной нейрорепаративной гипотезе, преэклампсия рассматривается как протеинопатия с нарушением аутофагии, что способствует отложению патологических неправильно свернутых белковых агрегатов и антител к ним в головном мозге. Доклинические и клинические исследования выявили, что маркеры нейровоспаления и нейродегенерации могут отражать поражение головного мозга до появления выраженной неврологической симптоматики, но как эти результаты коррелируют с долгосрочными неврологическими осложнениями, не совсем ясно. Несмотря на то что в последние годы получено значительное понимание патофизиологии преэклампсии в более широком смысле, этиология и механизмы развития дисфункции центральной нервной системы при этом заболевании остаются актуальными для изучения. Проведен детальный систематический анализ современной отечественной и зарубежной литературы, посвященной изучению маркеров нейровоспаления и нейродегенерации при гипертензивных расстройствах во время беременности. В исследовании использовались информационные базы: PubMed, Scopus, eLibrary, Cochrane Library, MEDLINE за период с января 2015 г. по декабрь 2024 г. В приведенном литературном обзоре представлена информация о патогенетической роли при преэклампсии следующих нейроспецифических биомаркеров: моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1), мозговой нейротрофический фактор (BDNF), фракталкин (CX3CL1), нейроспецифическая енолаза (NSE), S100 кальций-связывающий белок В (S100B), визининоподоб-

### Адрес для переписки:

Таскина Елизавета Сергеевна  
ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ  
672000, Россия, г. Чита, ул. Горького, 39а.  
Тел.: 8 (924) 472-63-32.  
E-mail: taskins@yandex.ru

### Address for correspondence:

Elizaveta S. Taskina  
Chita State Medical Academy.  
39a Gorky St  
Chita  
672000 Russian Federation.  
Phone: +7 (924) 472-63-32.  
E-mail: taskins@yandex.ru

### Образец цитирования:

Е.С. Таскина, И.В. Кибалина, В.А. Мудров, С.О. Давыдов «Церебральные маркеры нейровоспаления и нейродегенерации при гипертензивных расстройствах во время беременности» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 4. С. 713-722.  
doi: 10.15789/1563-0625-СМО-3169

© Таскина Е.С. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

E.S. Taskina, I.V. Kibalina, V.A. Mudrov, S.O. Davydov  
“Cerebral markers of neuroinflammation and neurodegeneration in hypertensive disorders during pregnancy”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 4, pp. 713-722.  
doi: 10.15789/1563-0625-СМО-3169

© Taskina E.S. et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-СМО-3169

ный белок-1 (VILIP-1), тау-белок (тау), фосфорилированный тау-белок по треонину 181 (p-tau181),  $\alpha$ -синуклеин ( $\alpha$ -syn), амилоид  $\beta$ -40/42 (A $\beta$ 40/42), глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), легкие цепи нейрофиламентов (NfL). Использование церебральных биомаркеров позволит выявлять пациенток высокой группы риска по развитию тяжелых церебральных осложнений, оптимизировать тактику их ведения и лечения во время беременности, а также разрабатывать эффективные стратегии профилактики развития неврологических изменений в будущем.

*Ключевые слова:* преэклампсия, эклампсия, гипертензивные расстройства во время беременности, церебральные биомаркеры, нейровоспаление, нейродегенерация

## CEREBRAL MARKERS OF NEUROINFLAMMATION AND NEURODEGENERATION IN HYPERTENSIVE DISORDERS DURING PREGNANCY

Taskina E.S., Kibalina I.V., Mudrov V.A., Davydov S.O.

*Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation*

**Abstract.** Preeclampsia/eclampsia during pregnancy and postpartum are the major risk factors for maternal and infant morbidity and mortality worldwide. At the same time, more than 70% of maternal deaths are of neurological origin, i.e., eclampsia, cerebral edema, intracranial hemorrhage and stroke. Generalized endothelial dysfunction caused by placental antiangiogenic factors leads to increased permeability of the blood-brain barrier and impaired autoregulation of cerebral circulation. Previous studies have shown that preeclampsia increases the risk of cerebrovascular and cardiovascular diseases, as well as cognitive impairments, up to evolving dementia in the future. According to a recently proposed neuropathophysiological hypothesis, preeclampsia is considered proteinopathy with impaired autophagy, thus contributing to brain depositions of wrongly folded pathological protein aggregates and antibodies to these proteins. Preclinical and clinical studies have shown that markers of neuroinflammation and neurodegeneration may reflect brain damage before the onset of severe neurological symptoms. However, is not entirely clear if these results correlate with long-term neurological complications. Over recent years, a certain understanding of preeclampsia pathophysiology in a broader sense has been gained. However, etiology and mechanisms of development of central nervous system dysfunction in this disease remain relevant for studies. A detailed systematic analysis of modern literature has been carried out, concerning the search for neuroinflammation and neurodegeneration markers in hypertensive pregnancy-associated disorders. The presented study used the following information databases: PubMed, Scopus, eLibrary, Cochrane Library, MEDLINE for the period from January 2015 to December 2024. This literature review provides information on pathogenetic role of the following neural biomarkers in preeclampsia: monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), fractalkine (CX3CL1), neurospecific enolase (NSE), S100 calcium-binding protein B (S100B), visinin-like protein-1 (VILIP-1), tau protein (tau), phosphorylated tau protein for threonine 181 (p-tau181),  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn), amyloid  $\beta$ -40/42 (A $\beta$ 40/42), glial fibrillary acid protein (GFAP), light chains of neurofilaments (NfL). Usage of appropriate cerebral biomarkers will enable identification of patients at high risk for severe cerebral complications, optimization of their management and treatment during pregnancy, and development of effective strategies to prevent the development of neurological changes in the future.

*Keywords:* preeclampsia, eclampsia, hypertensive disorders, pregnancy, cerebral biomarkers, neuroinflammation, neurodegeneration

### Введение

Гипертензивные расстройства являются одними из наиболее частых соматических осложнений, встречающихся во время беременности. Преэклампсия встречается в 7-8% беременностей и осложняется эклампсией в 0,9% случаев [15].

Преэклампсия является одним из самых опасных осложнений беременности и ежегодно становится причиной более 70 000 материнских и 500 000 внутриутробных смертей во всем мире [22]. Заболевание характеризуется мультисистемными проявлениями, вызванными генерализованной

эндотелиальной дисфункцией с поражением центральной нервной системы [1]. По данным магнитно-резонансной томографии, у 70-100% пациенток с тяжелой преэклампсией обнаружен отек головного мозга с признаками повышения внутричерепного давления [15].

Недавние крупные регистровые исследования показали, что женщины с преэклампсией, даже без развития эклампсии, подвергаются повышенному риску неврологических расстройств, которые могут возникнуть через несколько месяцев или лет после беременности [6, 13, 45, 49, 51, 63]. Исследование Adank M.C. и соавт. (2021) показало, что у женщин, у которых были гипертензивные расстройства во время беременности, через 15 лет после беременности был повышен риск когнитивных расстройств, связанных с ухудшением рабочей памяти и вербального обучения [6]. Когортное исследование Basit S. и соавт. (2018), включающее 1 178 005 женщин, выявило повышенный риск развития деменции, особенно сосудистого генеза, у пациенток с преэклампсией в анамнезе [12]. При этом младенцы, рожденные от матерей, перенесших преэклампсию во время беременности, также имеют повышенный риск церебрального паралича, инсульта, задержки развития, умственной отсталости, тревоги, депрессивных симптомов, синдрома дефицита внимания и гиперактивности [24]. Несмотря на достигнутый в последние годы значительный прогресс в понимании патофизиологии преэклампсии в более общем контексте, этиологические факторы и механизмы, способствующие дисфункции центральной нервной системы при данном заболевании, продолжают представлять собой актуальную область для дальнейшего изучения [6, 13, 45, 51, 63].

#### **Церебральные биомаркеры нейровоспаления при гипертензивных расстройствах во время беременности**

Церебральные биомаркеры плазмы крови могут отражать поражение головного мозга до появления выраженной неврологической симптоматики [3]. В регуляции функции гематоэнцефалического барьера большую роль играют низкомолекулярные пептиды (8-10 кДа) – хемокины, участвующие в селективной проницаемости паренхимы головного мозга для лейкоцитов. В зависимости от количества аминокислот между первым и вторым остатками цистеина в пептидной последовательности хемокины делятся на четыре подсемейства (С, СС, СХС и СХХХС), где Х – любой остаток аминокислоты [67]. Моноцитарный хемотаксический белок-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1, MCP-1) или лиганд-2 мотива хемокина СС (C-C motif ligand 2,

CCL2) принадлежит к семейству СС-хемокинов (β-хемокинов). Данный цитокин является мощным фактором хемотаксиса моноцитов, Т-клеток памяти и дендритных клеток в очаг воспаления, продуцируется преимущественно моноцитами/макрофагами, эндотелиальными клетками, гладкомышечными клетками, фибробластами, астроцитами и клетками микроглии при повреждении тканей или внедрении инфекции [55]. Исследование Vafaei H. и соавт. (2023) показало, что CCL2 секретируется децидуальной тканью, начиная с первого триместра беременности путем активации внеклеточных сигнал-регулируемых киназ (Extracellular signal-regulated kinase, ERK) / митоген-активируемой протеинкиназы (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) [60]. Согласно недавним исследованиям, экспрессия и секреция CCL2 во время беременности регулируется множеством эндогенных факторов, а нарушение ауторегуляции и аномальные уровни данного цитокина связаны с такими неблагоприятными исходами беременности, как: самопроизвольный аборт, преэклампсия и преждевременные роды [40, 60].

За прошедшие годы установлено, что MCP-1 является важным хемокином, вовлеченным в нейровоспалительные процессы при различных заболеваниях центральной нервной системы, которые характеризуются нейрональной дегенерацией. Экспрессия CCL2 в глиальных клетках возрастает при гипоксически-ишемических [39], нейровоспалительных, нейродегенеративных и демиелинизирующих заболеваниях [53], эпилепсии [30], мигрени [51], а также вторичном повреждении головного мозга после черепно-мозговой травмы [20]. Предыдущие исследования показали, что концентрация MCP-1 в спинномозговой жидкости и крови значительно выше у пациентов с болезнью Альцгеймера и положительно коррелирует с уровнями таких маркеров нейродегенерации как тау-белок (tau), α-синуклеин (α-syn) и β-амилоид (Aβ) [23, 32, 43, 65].

Нейротрофины относятся к эндогенным полипептидными нейропротективным факторам, которые вырабатываются преимущественно клетками центральной нервной системы [4, 58]. Мозговой нейротрофический фактор (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) и его тропомиозинкиназный рецептор TrkB играют важную роль в процессах нейрорегенерации синаптогенеза, нейрогенеза и клеточной дифференцировки в нервной системе при различных патологических воздействиях, включая ишемию [4, 9]. Данный фактор экспрессируется в эндотелии сосудов, в тромбоцитах, печени и гладкомышечных клетках [42]. Обнаружена взаимосвязь между

содержанием BDNF и тяжестью гипертензивных расстройств во время беременности, что позволяет использовать данный маркер в качестве лабораторного диагностического критерия [5]. Изучение BDNF осложняется наличием множества форм и источников. Обнаружено, что BDNF синтезируется как белок-предшественник *prerproBDNF*, который в эндоплазматическом ретикулуме расщепляется до *proBDNF* с молекулярной массой 30-35 кДа. В везикулах при помощи внутриклеточных эндопротеаз либо конвертаз в секреторных гранулах *proBDNF* расщепляется с образованием зрелого BDNF (14 кДа) [4]. В здоровой сетчатке BDNF вырабатывается эндогенно ганглиозными клетками сетчатки, клетками *lamina cribrosa* и астроцитами головки зрительного нерва или может попадать в сетчатку путем ретроградного транспорта из головного мозга через зрительный нерв [42]. Ретроградный аксональный транспорт BDNF существенно тормозится при повышении внутриглазного давления [35].

Фракталкин (CX3CL1) относится к семейству хемокинов и представляет собой многодоменный белок с молекулярной массой 95 кДа, который преимущественно экспрессируется в мембраносвязанной форме в нейронах, эпителиальных, эндотелиальных и гладкомышечных клетках. Молекула CX3CL1 состоит из внеклеточного N-концевого хемокинового домена, муциноподобного стержня, трансмембранного и внутриклеточного доменов [48, 59]. В центральной нервной системе фракталкин действует как регулятор активации микроглии в ответ на повреждение или воспаление головного мозга [48]. Недавнее исследование Walsh S.W. и соавт. (2023) показало, что данный хемокин способствует выживанию клеток путем поддержания гомеостаза при различных воспалительных процессах, опосредованных интерлейкином-17A (IL-17A) [61]. После активации нейтрофилов, моноцитов и лейкоцитов при преэклампсии в плазме крови повышаются уровни CXCL1 и CXCL8, которые действуют как факторы, модулирующие иммунную систему [48]. Согласно данным Szewczyk G. и соавт. (2023), CX3CL1 может активироваться некоторыми провоспалительными цитокинами, такими как фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-1 и интерферона- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), а также обладает способностью индуцировать HIF-зависимую транскрипцию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [56]. Учитывая немногочисленные исследования, считаем перспективным дальнейшее изучение роли фракталкина в патогенезе церебральных осложнений при гипертензивных расстройствах во время беременности.

Нейроспецифическая енолаза (Neuron-Specific Enolase, NSE) является членом семейства енолаз и

состоит из  $\gamma\gamma$ -гомодимера и  $\alpha\gamma$ -гетеродимера [10]. Поскольку NSE присутствует в нейронах, предполагается, что она является специфическим маркером нейрональных клеток в отличие S100 кальций-связывающий белка В (S100B), который экспрессируется в глиальных клетках. Содержание NSE и S100B повышено при тяжелой преэклампсии и остается высоким даже через год после родов. Согласно данным, полученным Brzan Simenc G. и соавт. (2021), уровень NSE коррелирует с увеличением диаметра оболочки зрительного нерва по данным ультразвуковой диагностики, что указывает на отек головного мозга на фоне повышения внутричерепного давления [17]. В результате исследования Bergman L. и соавт. (2018) обнаружено, что повышение уровня S100B у женщин с преэклампсией связано с развитием неврологических симптомов в виде нарушений зрения. Также выявлено повышение концентрации NfL, tau, S100B и NSE в плазме крови уже на 25-й неделе беременности, что указывает на раннее поражение центральной нервной системы за несколько месяцев до начала явных клинических проявлений, даже при легком или среднетяжелом течении заболевания [14]. Однако NSE также обнаруживается в эритроцитах и тромбоцитах, поэтому гемолиз, возникающий при тяжелой преэклампсии, может привести к ложноположительному увеличению концентрации NSE в крови [57].

Визининоподобный белок-1 (Visinin-like protein 1, VILIP-1) представляет собой нейрон-специфичный белок, который участвует в различных патологических нарушениях гомеостаза кальция, приводящих к гибели нейронов. Данный белок экспрессируется в центральной нервной системе и проникает в спинномозговую жидкость после разрушения клеток головного мозга. При дисфункции гематоэнцефалического барьера, вызванной эпилепсией, возможна экстравазация мозгоспецифических белков в периферическую кровь [58]. Согласно данным исследования Tan Z. и соавт. (2020), VILIP-1 является многообещающим и надежным биомаркером для оценки повреждения нейронов после приступов эпилепсии, а также более точным и применимым в клинической практике, чем sNSE [57]. В настоящее время остается актуальным изучение роли данного белка в патогенезе судорожного синдрома при эклампсии.

#### **Церебральные биомаркеры нейродегенерации при гипертензивных расстройствах во время беременности**

Согласно результатам проведенных исследований, преэклампсия рассматривается как протеинопатия с нарушением аутофагии, что способствует отложению патологических (не-

правильно свернутых) белковых агрегатов и антител к ним в головном мозге [41, 44]. Исследование Joly-Amado A. и соавт. (2020) выявило сверхэкспрессию MCP-1 в головном мозге при различных таупатиях, которые представляют собой группу нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся отложениями аномального tau в головном мозге [34]. Данный белок представлен преимущественно в нейронах, реже – в других клетках центральной нервной системы, включая астроциты и олигодендроциты. Скрепляя микротрубочки, tau формирует цитоскелет клетки, обеспечивая ее рост и стабильность, а также связь между различными органеллами [2]. Баланс между фосфорилированием и дефосфорилированием tau является ключевым регуляторным процессом в поддержании стабильности микротрубочек. При патологических состояниях гиперфосфорилирование tau вызывает агрегацию и неправильное сворачивание tau с формированием нейрофибриллярных клубков, что может снижать эффективность транспорта в аксонах нервных клеток и приводить к синаптической дегенерации, апоптозу или гибели нервных клеток [29].

Впервые в ходе исследования Cheng S. и соавт. (2021) разработана модель клеток трофобласта с дефицитом аутофагии, при исследовании которой обнаружено внутриклеточное накопление изучаемых белковых агрегатов, о чем свидетельствовала дальнейшая оценка их уровня в сыворотке крови. В результате проведенного исследования предложен чувствительный метод диагностики и прогнозирования преэклампсии и болезни Альцгеймера, основанный на определении агрегатов сывороточного белка, их отдельных нейродегенеративных компонентов, включающих транстиретин, амилоид  $\beta$ -42 (A $\beta$ 42),  $\alpha$ -syn и tau-белок, фосфорилированный по треонину 181 (p-tau181) и соответствующих антител к ним в сыворотке крови. [21]. В исследовании Lederer W. и соавт. (2016) обнаружено, что концентрация p-tau181 в спинномозговой жидкости связана с развитием тяжелой преэклампсии и HELLP-синдрома [37]. Концентрация tau и p-tau181 в сыворотке крови коррелирует с уровнем данных белков в спинномозговой жидкости [11, 33]. По данным Wang Y. и соавт. (2023), у пациенток с преэклампсией отмечено повышение концентрации сывороточного tau и p-tau181 [63]. В результате исследования Bokstrom-Rees E. и соавт. (2023) обнаружена связь между нарушением когнитивных функций и концентрацией легкой цепи нейрофиламентов (Neurofilament light polypeptide, NfL), tau, а также биомаркера активации глии глиального фибрил-

лярного кислого белка (glial fibrillary acidic protein, GFAP) у беременных с преэклампсией [16]. По результатам проведенных исследований, tau рассматривается в качестве простого, доступного и масштабируемого биомаркера-кандидата для диагностики и прогнозирования церебральных осложнений преэклампсии [16, 27, 50].

Нейрофиламенты являются основными белками цитоскелетной структуры нейронов, образующими гетерополимерные структурные каркасные сети, целостность которых имеет решающее значение для поддержания структуры аксонов. Они классифицируются как промежуточные филаменты (intermediate filament, IF) наряду с филаментами, построенными из кератинов, ядерных ламинов и других членов семейства белков IF [28]. Нейрофиламенты состоят из четырех различных субъединиц. Три из этих субъединиц – NfL (легкая), NfM (средняя) и NfH (тяжелая) – всегда входят в состав и относятся к IF-белкам IV типа. Четвертая субъединица может быть либо  $\alpha$ -интернексином (также IV тип), либо периферином (тип III), которые определяются в центральной и периферической нервной системы соответственно. Выявлено, что NfM и NfH, имеющие длинные и сильно заряженные C-концевые домены, в основном обнаруживаются снаружи филаментов, тогда как NfL вместе с  $\alpha$ -интернексином или периферином формируют основу филамента [28, 66]. Именно легкие субъединицы (NfL) играют решающую роль в процессе полимеризации нейрофиламентов, а также в поддержании структуры аксонов. Согласно результатам ряда исследований, NfL высвобождается в спинномозговую жидкость и кровь в результате аксональных поражений/травм и считается маркером повреждения нейронов [52, 46, 62].

В исследовании Evers K.S. и соавт. (2018) сообщалось, что sNFL является сывороточным маркером, позволяющим прогнозировать преэклампсию с большей точностью в сравнении с такими известными ангиогенными факторами, как: растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1 (sFlt-1) и плацентарный фактор роста (PlGF). Увеличение уровня sNFL отмечалось у матерей старше 36 лет, причем наибольший рост наблюдался у женщин с преэклампсией по сравнению с контрольной группой [25]. В другом исследовании, проведенном Andersson M. и соавт. (2021), выявлено повышение концентрации NfL в спинномозговой жидкости и плазме у женщин с преэклампсией без клинически выявляемых неврологических осложнений по сравнению с женщинами с нормальным течением беременности [8]. Исследование Fang X. и соавт. (2021)

показало, что повышенный уровень NfL может иметь прогностическую ценность для диагностики синдрома задней обратимой энцефалопатии, а его уровень связан как с клинической тяжестью, так и с исходом беременности [26]. Однако в настоящее время доступна немногочисленная информация о роли sNFL в развитии эклампсии и отека головного мозга.

Амилоид- $\beta$  (A $\beta$ ) относится к группе амилоидогенных белков, способных накапливаться в головном мозге в виде различных белковых агрегатов: от небольших олигомерных промежуточных продуктов (< 10 нм) до более крупных амилоидных фибрилл (> 50 нм) [7, 64]. Данный полипептид с 39-43 аминокислотными остатками обладает высокой цитотоксичностью, вызывая разрушение мембран и дисфункцию нейронов, и, в конечном итоге, гибель клеток [54]. Согласно амилоидной гипотезе, аномальное накопление A $\beta$  в головном мозге является основным фактором, способствующим развитию болезни Альцгеймера [38, 47]. Считается, что среди всех видов изоформ A $\beta$  наиболее важными являются A $\beta$ 40 и A $\beta$ 42 [31]. Более того, процесс накопления A $\beta$  с образованием амилоидных бляшек синергичен с патологической агрегацией tau с формированием нейрофибриллярных клубков [19, 36]. В проведенном исследовании Schindler S.E. и соавт. (2019) выявлено, что по уровню плазменных A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 можно проводить ранний скрининг на амилоидоз головного мозга у людей без нару-

шения когнитивных функций [54]. Исследование Buhimschi I.A. и соавт. (2014) подтвердило наличие неправильно свернутых белков в моче женщин с преэклампсией по сравнению с контрольной группой того же гестационного срока. Для верификации амилоидных белков с  $\beta$ -листной конформацией использовался краситель Конго красный [18]. Протеинурия и конгофилия мочи являются специфичными для преэклампсии по сравнению с другими гипертензивными нарушениями беременности, а интенсивность окраски мочи красителем Конго красного коррелирует с тяжестью заболевания [18, 41].

## Заключение

Таким образом, следует сделать вывод, что нейрорепатофизиология гипертензивных расстройств во время беременности требует дальнейшего детального исследования. Изучение патогенетической роли различных маркеров нейровоспаления и нейродегенерации важно для разработки методов прогнозирования и ранней лабораторной диагностики цереброваскулярных и когнитивных нарушений у женщин не только во время беременности, но и в отдаленном периоде после родов. Более того, исследование особенностей механизмов развития церебральных нарушений на фоне гипертензивных расстройств определяет пути совершенствования терапии изучаемой патологии у женщин.

## Список литературы / References

1. Белокриницкая Т.Е., Фролова Н.И., Страмбовская Н.Н., Колмакова К.А. Распространенность и межгенные взаимодействия полиморфизмов, ассоциированных с артериальной гипертензией, дисфункцией эндотелия, нарушениями гемостаза и фолатного обмена, при тяжелой преэклампсии // Забайкальский медицинский вестник, 2019. Т. 1. С. 1-13. [Belokrinitckaya T.E., Frolova N.I., Strambovskaya N.N., Kolmakova K.A. Prevalence and intergenic interactions of polymorphisms associated with arterial hypertension, endothelial dysfunction, hemostasis and folate metabolism disorders in severe preeclampsia. *Zabaykalskiy meditsinskiy vestnik = Transbaikal Medical Bulletin*, 2019, Vol. 1, pp. 1-13. (In Russ.)]
2. Васенина Е.Е., Левин О.С. Современные подходы к клинической диагностике и лечению мультисистемных дегенераций, связанных с накоплением тау-протеина // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2020. Т. 120, № 2. С. 22-30. [Vasenina E.E., Levin O.S. Modern approaches to the clinical diagnosis and treatment of multisystem degenerations associated with the accumulation of tau protein. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = Journal of Neurology and Psychiatry named after S.S. Korsakov*, 2020, Vol. 120, no. 2, pp. 22-30. (In Russ.)]
3. Есин Р.Г., Сафина Д.Р., Хакимова А.Р., Есин О.Р. Нейровоспаление и невропатология // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2021. Т. 121, № 4. С. 107-112. [Yesin R.G., Safina D.R., Khakimova A.R., Yesin O.R. Neuroinflammation and neuropathology. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = Journal of Neurology and Psychiatry named after S.S. Korsakov*, 2021, Vol. 121, no. 4, pp. 107-112. (In Russ.)]
4. Живкович М., Ермолаева Е.В., Соболева А.В., Самойлова Е.М., Чудакова Д.А., Баклаушев В.П. Нейротрофический фактор мозга BDNF: новые данные, функции и вопросы // Гены и Клетки, 2024. Т. 19, № 1. С. 61-84. [Zhivkovich M., Ermolaeva E.V., Soboleva A.V., Samoilova E.M., Chudakova D.A., Baklaushev V.P. Brain

neurotrophic factor BDNF: new data, functions and questions. *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2024, Vol. 19, no. 1, pp. 61-84. (In Russ.)]

5. Кондратюк И.В., Падруль М.М., Каракулова Ю.В. Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) как новый способ диагностики тяжелой преэклампсии и ее осложнений // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение, 2022. Т. 10, № 4. С. 13-17. [Kondratyuk I.V., Padrul M.M., Karakulova Yu.V. Brain neurotrophic factor (BDNF) as a new way to diagnose severe preeclampsia and its complications. *Akusherstvo i ginekologiya: novosti, mneniya, obuchenie = Obstetrics and Gynecology: News, Opinions, Training*, 2022, Vol. 10, no. 4, pp. 13-17. (In Russ.)]

6. Adank M.C., Hussainali R.F., Oosterveer L.C., Ikram M.A., Steegers E.A.P., Miller E.C., Schalekamp-Timmermans S. Hypertensive disorders of pregnancy and cognitive impairment: a Prospective Cohort Study. *Neurology*, 2021, Vol. 96, no. 5, pp. e709-718.

7. An J., Kim K., Lim H.J., Kim H.Y., Shin J., Park I., Cho I., Kim H.Y., Kim S., McLean C., Choi K.Y., Kim Y., Lee K.H., Kim J.S. Early onset diagnosis in Alzheimer's disease patients via amyloid- $\beta$  oligomers-sensing probe in cerebrospinal fluid. *Nat. Commun.*, 2024, Vol. 15, no. 1, 1004. doi: 10.1038/s41467-024-44818-x.

8. Andersson M., Oras J., Thörn S.E., Karlsson O., Kälebo P., Zetterberg H., Blennow K., Bergman L. Signs of neuroaxonal injury in preeclampsia-A case control study. *PLoS One*, 2021, Vol. 16, no. 2, e0246786. doi: 10.1371/journal.pone.0246786.

9. Arévalo J.C., Deogracias R. Mechanisms controlling the expression and secretion of BDNF. *Biomolecules*, 2023, Vol. 13, no. 5, 789. doi: 10.3390/biom13050789.

10. Babkina A.S., Lyubomudrov M.A., Golubev M.A., Pisarev M.V., Golubev A.M. Neuron-specific enolase-what are we measuring? *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, Vol. 25, no. 9, 5040. doi: 10.3390/ijms25095040.

11. Barthélemy N.R., Horie K., Sato C., Bateman R.J. Blood plasma phosphorylated-tau isoforms track CNS change in Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 11, e20200861. doi: 10.1084/jem.20200861.

12. Basit S., Wohlfahrt J., Boyd H.A. Pre-eclampsia and risk of dementia later in life: nationwide cohort study. *B. M. J.*, 2018, Vol. 363, k4109. doi: 10.1136/bmj.k4109.

13. Bergman L., Hastie R., Bokström-Rees E., Zetterberg H., Blennow K., Schell S., Imberg H., Langenegger E., Moodley A., Walker S., Tong S., Cluver C. Cerebral biomarkers in neurologic complications of preeclampsia. *Am. J. Obstetrics. Gynecol.*, 2022, Vol. 227, no. 2, pp. 298.e1-298.e10.

14. Bergman L., Zetterberg H., Kaihola H., Hagberg H., Blennow K., Åkerud H. Blood-based cerebral biomarkers in preeclampsia: Plasma concentrations of NfL, tau, S100B and NSE during pregnancy in women who later develop preeclampsia – A nested case control study. *PLoS. One.*, 2018, Vol. 13, no. 5, e0196025. doi: 10.1371/journal.pone.0196025.

15. Biswas J., Khatun N., Bandyopadhyay R., Bhattacharya N., Maitra A., Mukherjee S., Mondal S. Optic nerve sheath diameter measurements using ultrasonography to diagnose raised intracranial pressure in preeclampsia: an observational study. *J. Turk. Ger. Gynecol. Assoc.*, 2023, Vol. 24, no. 1, pp. 5-11.

16. Bokstrom-Rees E., Zetterberg H., Blennow K., Hastie R., Schell S., Cluver C., Bergman L. Correlation between cognitive assessment scores and circulating cerebral biomarkers in women with pre-eclampsia and eclampsia. *Pregnancy Hypertens.*, 2023, Vol. 31, pp. 38-45.

17. Brzan Simenc G., Ambrozic J., Osredkar J., Gersak K., Lucovnik M. Correlation between cerebral biomarkers and optic nerve sheath diameter in patients with severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, 2021, Vol. 40, no. 1, pp. 9-14.

18. Buhimschi I.A., Nayeri U.A., Zhao G., Shook L.L., Pensalfini A., Funai E.F., Bernstein I.M., Glabe C.G., Buhimschi C.S. Protein misfolding, congophilia, oligomerization, and defective amyloid processing in preeclampsia. *Sci. Transl. Med.* 2014, Vol. 6, 245ra92. doi: 10.1126/scitranslmed.3008808.

19. Busche M.A., Hyman B.T. Synergy between amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.*, 2020, Vol. 23, 1183-1193.

20. Chen Y., Wang Y., Xu J., Hou T., Zhu J., Jiang Y., Sun L., Huang C., Sun L., Liu S. Multiplex assessment of serum chemokines CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL10, and CXCL13 following traumatic brain injury. *Inflammation*, 2023, Vol. 46, no. 1, pp. 244-255.

21. Cheng S., Banerjee S., Daiello L.A., Nakashima A., Jash S., Huang Z., Drake J.D., Ernerudh J., Berg G., Padbury J., Saito S., Ott B.R., Sharma S. Novel blood test for early biomarkers of preeclampsia and Alzheimer's disease. *Sci. Rep.*, 2021, Vol. 11, no. 1, 15934. doi: 10.1038/s41598-021-95611-5.

22. Chiang Y.T., Seow K.M., Chen K.H. The Pathophysiological, genetic, and hormonal changes in preeclampsia: a systematic review of the molecular mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, Vol. 25, no. 8, pp. 45-32.

23. Correa J.D., Starling D., Teixeira A.L., Caramelli P., Silva T.A. Chemokines in CSF of Alzheimer's disease patients. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 2011, Vol. 69, no. 3, pp. 455-459.

24. Escudero C., Kupka E., Ibanez B., Sandoval H., Troncoso F., Wikstrom A.K., López-Espíndola D., Acurio J., Torres-Vergara P., Bergman L. Brain vascular dysfunction in mothers and their children exposed to preeclampsia. *Hypertension*, 2023, Vol. 80, no. 2, pp. 242-256.
25. Evers K.S., Atkinson A., Barro C., Fisch U., Pfister M., Huhn E.A., Lapaire O., Kuhle J., Wellmann S. Neurofilament as Neuronal Injury Blood Marker in Preeclampsia. *Hypertension*, 2018, Vol. 71, no. 6, pp. 1178-1184.
26. Fang X., Liang Y., Zhang W., Wang Q., Chen J., Chen J., Lin Y., Chen Y., Yu L., Wang H., Chen D. Serum neurofilament light: a potential diagnostic and prognostic biomarker in obstetric posterior reversible encephalopathy syndrome. *Mol. Neurobiol.* 2021, Vol. 58, no. 12, pp. 6460-6470.
27. Friis T., Wikström A.K., Acurio J., León J., Zetterberg H., Blennow K., Nelander M., Åkerud H., Kaihola H., Cluver C., Troncoso F., Torres-Vergara P., Escudero C., Bergman L. Cerebral biomarkers and blood-brain barrier integrity in preeclampsia. *Cells*, 2022, Vol. 11, no. 5, 789. doi: 10.3390/cells11050789.
28. Gaur A., Rivet L., Mah E., Bawa K.K., Gallagher D., Herrmann N., Lanctôt K.L. Novel fluid biomarkers for mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res. Rev.*, 2023, Vol. 91, 102046. doi: 10.1016/j.arr.2023.102046.
29. Guo T., Noble W., Hanger D.P. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.*, 2017, Vol. 133, no. 5, pp. 665-704.
30. Hanin A., Cespedes J., Dorgham K., Pulluru Y., Gopaul M., Gorochov G., Hafler D.A., Navarro V., Gaspard N., Hirsch L.J. Cytokines in new-onset refractory status epilepticus predict outcomes. *Ann. Neurol.*, 2023, Vol. 94, no. 1, pp. 75-90.
31. Im D., Choi T.S. Distinctive contribution of two additional residues in protein aggregation of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 isoforms. *BMB Rep.*, 2024, Vol. 57, no. 6, pp. 263-272.
32. Iranzo A., Fairfoul G., Ayudhaya A.C.N., Serradell M., Gelpi E., Vilaseca I., Sanchez-Valle R., Gaig C., Santamaria J., Tolosa E., Riha R.L., Green A.J.E. Detection of  $\alpha$ -synuclein in CSF by RT-QuIC in patients with isolated rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: A longitudinal observational study. *Lancet Neurol.*, 2021, Vol. 20, pp. 203-212.
33. Janelidze S., Mattsson N., Palmqvist S., Smith R., Beach T.G., Serrano G.E., Chai X., Proctor N.K., Eichenlaub U., Zetterberg H., Blennow K., Reiman E.M., Stomrud E., Dage J.L., Hansson O. Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 3, pp. 379-386.
34. Joly-Amado A., Hunter J., Quadri Z., Zamudio F., Rocha-Rangel P.V., Chan D., Kesarwani A., Nash K., Lee D.C., Morgan D., Gordon M.N., Selenica M.B. CCL2 overexpression in the brain promotes glial activation and accelerates tau pathology in a mouse model of tauopathy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 997. doi: 10.3389/fimmu.2020.00997.
35. Lambuk L., Mohd Lazaldin M.A., Ahmad S., Iezhitsa I., Agarwal R., Uskoković V., Mohamud R. Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection in glaucoma: a review of current state of the art. *Front. Pharmacol.*, 2022, Vol. 13, 875662. doi: 10.3389/fphar.2022.875662.
36. Le L.T.H.L., Lee J., Im D., Park S., Hwang K.D., Lee J.H., Jiang Y., Lee Y.S., Suh Y.H., Kim H.I., Lee M.J. Self-aggregating tau fragments recapitulate pathologic phenotypes and neurotoxicity of alzheimer's disease in mice. *Adv. Sci.*, 2023, Vol. 10, no. 29, e2302035. doi: 10.1002/adv.202302035.
37. Lederer W., Dominguez C.A., Popovscaia M., Putz G., Humpel C. Cerebrospinal fluid levels of tau and phospho-tau-181 proteins during pregnancy. *Pregnancy Hypertens*, 2016, Vol. 64, pp. 384-387.
38. Leuzy A., Mattsson-Carlgrén N., Palmqvist S., Janelidze S., Dage J.L., Hansson O. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *E.M.B.O. Mol. Med.*, 2022, Vol. 14, no. 1, e14408. doi: 10.15252/emmm.202114408.
39. Li L., Lou W., Li H., Zhu Y., Huang X. Upregulated C-C Motif chemokine ligand 2 promotes ischemic stroke via chemokine signaling pathway. *Ann. Vasc. Surg.*, 2020, Vol. 68, pp. 476-486.
40. Lin Z., Shi J.L., Chen M., Zheng Z.M., Li M.Q., Shao J. CCL2: An important cytokine in normal and pathological pregnancies: A review. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 13, 1053457. doi: 10.3389/fimmu.2022.1053457.
41. Medegan Fagla B., Buhimschi I.A. Protein misfolding in pregnancy: current insights, potential mechanisms, and implications for the pathogenesis of preeclampsia. *Molecules*, 2024, Vol. 29, no. 3, 610. doi: 10.3390/molecules29030610.
42. Mysona B.A., Zhao J., Smith S., Bollinger K.E. Relationship between Sigma-1 receptor and BDNF in the visual system. *Exp. Eye Res.*, 2018, Vol. 167, pp. 25-30.
43. Nakamura A., Kaneko N., Villemagne V.L., Kato T., Doecke J., Doré V., Fowler C., Li Q.X., Martins R., Rowe C., Tomita T., Matsuzaki K., Ishii K., Ishii K., Arahata Y., Iwamoto S., Ito K., Tanaka K., Masters C.L., Yanagisawa K. High performance plasma amyloid- $\beta$  biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, 2018, Vol. 554, pp. 249-254.

44. Nakashima A., Shima T., Aoki A., Kawaguchi M., Yasuda I., Tsuda S., Yoneda S., Yamaki-Ushijima A., Cheng S., Sharma S., Saito S. Placental autophagy failure: A risk factor for preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2020, Vol. 46, no. 12, pp. 2497-2504.
45. O'Neal M.A. Women and the risk of Alzheimer's disease. *Front. Glob. Womens Health*, 2024, Vol. 4, 1324522. doi: 10.3389/fgwh.2023.1324522.
46. Oeckl P., Halbgebauer S., Anderl-Straub S., Steinacker P., Huss A.M., Neugebauer H., von Arnim C.A.F., Diehl-Schmid J., Grimmer T., Kornhuber J., Lewczuk P., Danek A. Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration German; Ludolph AC, Otto M. Glial Fibrillary Acidic Protein in Serum is Increased in Alzheimer's Disease and Correlates with Cognitive Impairment. *J. Alzheimers Dis.*, 2019, Vol. 67, no. 2, pp. 481-488.
47. Palmqvist S., Tideman P., Mattsson-Carlsson N., Schindler S.E., Smith R., Ossenkoppele R., Calling S., West T., Monane M., Verghese P.B., Braunstein J.B., Blennow K., Janelidze S., Stomrud E., Salvadó G., Hansson O. Blood Biomarkers to Detect Alzheimer Disease in Primary Care and Secondary Care. *JAMA*, 2024, Vol. 332, no. 15, pp. 1245-1257.
48. Pawelec P., Ziemka-Nalecz M., Sypecka J., Zalewska T. The Impact of the CX3CL1/CX3CR1 Axis in Neurological Disorders. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 10, 2277. doi: 10.3390/cells9102277.
49. Poon L.C., Nguyen-Hoang L., Smith G.N., Bergman L., O'Brien P., Hod M., Okong P., Kapur A., Maxwell C.V., McIntyre H.D., Jacobsson B., Algurjia E., Hanson M.A., Rosser M.L., Ma R.C., O'Reilly S.L., Regan L., Adam S., Medina V.P., McAuliffe F.M.; FIGO Committee on Impact of Pregnancy on Long-term Health and the FIGO Division of Maternal and Newborn Health. Hypertensive disorders of pregnancy and long-term cardiovascular health: FIGO Best Practice Advice. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 2023, Vol. 160, no. 1, pp. 22-34.
50. Qiu C., Li Z., Leigh D.A., Duan B., Stucky J.E., Kim N., Xie G., Lu K.P., Zhou X.Z. The role of the Pin1-cis P-tau axis in the development and treatment of vascular contribution to cognitive impairment and dementia and preeclampsia. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2024, Vol. 12, 1343962. doi: 10.3389/fcell.2024.1343962.
51. Ryu S., Liu X., Guo T., Guo Z., Zhang J., Cao Y.Q. Peripheral CCL2-CCR2 signalling contributes to chronic headache-related sensitization. *Brain*, 2023, Vol. 146, no. 10, pp. 4274-4291.
52. Samara A., Herlenius E., O'Brien P., Khalil A. Potential role of neurofilament in COVID-19 and preeclampsia. *Cell. Rep. Med.*, 2022, Vol. 3, no. 1, 100490. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100490.
53. Santaella A., Kuiperij H.B., van Rumund A., Esselink R.A.J., van Gool A.J., Bloem B.R., Verbeek M.M. Cerebrospinal fluid monocyte chemoattractant protein 1 correlates with progression of Parkinson's disease. *N. P. J. Parkinsons Dis.*, 2020, Vol. 6, 21. doi: 10.1038/s41531-020-00124-z.
54. Schindler S.E., Bollinger J.G., Ovod V., Mawuenyega K.G., Li Y., Gordon B.A., Holtzman D.M., Morris J.C., Benzinger T.L.S., Xiong C., Fagan A.M., Bateman R.J. High-precision plasma  $\beta$ -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. *Neurology*, 2019, Vol. 93, no. 17, pp. e1647-e1659.
55. Singh S., Anshita D., Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int. Immunopharmacol.*, 2021, Vol. 101, 107598. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107598.
56. Szweczyk G., Pyzlak M., Pankiewicz K., Szczerba E., Stangret A., Szukiewicz D., Skoda M., Bierła J., Cukrowska B., Fijałkowska A. The potential association between a new angiogenic marker fractalkine and a placental vascularization in preeclampsia. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2021, Vol. 304, no. 2, pp. 365-376.
57. Tan Z., Jiang J., Tian F., Peng J., Yang Z., Li S., Long X. Serum visinin-like protein 1 is a better biomarker than neuron-specific enolase for seizure-induced neuronal injury: a prospective and observational study. *Front. Neurol.*, 2020, Vol. 11, 567587. doi: 10.3389/fneur.2020.567587.
58. Tikhonova M.A., Shvaikovskaya A.A., Zhanaeva S.Y., Moysak G.I., Akopyan A.A., Rzaev J.A., Danilenko K.V., Aftanas L.I. Concordance between the in vivo content of neurospecific proteins (BDNF, NSE, VILIP-1, S100B) in the hippocampus and blood in patients with epilepsy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 25, no. 1, 502. doi: 10.3390/ijms25010502.
59. Ullah A., Zhao J., Singla R.K., Shen B. Pathophysiological impact of CXC and CX3CL1 chemokines in preeclampsia and gestational diabetes mellitus. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2023, Vol. 11, 1272536. doi: 10.3389/fcell.2023.1272536.
60. Vafaei H., Faraji S., Ahmadi M., Tabei S.M.B., Fereidoni S., Shiravani Z., Hosseini S.N., Asadi N., Kasraeian M., Faraji A., Abbasi O., Gharesi-Fard B. Alteration in IFN- $\gamma$  and CCL2 serum levels at first trimester of pregnancy contribute to development of preeclampsia and fetal growth restriction. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.*, 2023, Vol. 62, no. 1, pp. 71-76.
61. Walsh S.W., Nugent W.H., Archer K.J., Dulaimi M.A.L., Washington S.L., Strauss J.F. Epigenetic regulation of interleukin-17-related genes and their potential roles in neutrophil vascular infiltration in preeclampsia. *Reprod. Sci.*, 2022, Vol. 29, no. 1, pp. 154-162. doi: 10.1007/s43032-021-00605-3.
62. Wang X., Shi Z., Qiu Y., Sun D., Zhou H. Peripheral GFAP and NfL as early biomarkers for dementia: longitudinal insights from the UK Biobank. *BMC Med.*, 2024, Vol. 22, no. 1, 192. doi: 10.1186/s12916-024-03418-8.

63. Wang Y., Guo B., Zhao K., Yang L., Chen T. Correlation between cognitive impairment and serum phosphorylated tau181 protein in patients with preeclampsia. *Front. Aging Neurosci.*, 2023, Vol. 15, 1148518. doi: 10.3389/fnagi.2023.1148518.
64. Yang Y., Arseni D., Zhang W., Huang M., Lövestam S., Schweighauser M., Kotecha A., Murzin A.G., Peak-Chew S.Y., Macdonald J., Lavenir I., Garringer H.J., Gelpi E., Newell K.L., Kovacs G.G., Vidal R., Ghetti B., Ryskeldi-Falcon B., Scheres S.H.W., Goedert M. Cryo-EM structures of amyloid- $\beta$  42 filaments from human brains. *Science*, 2022, Vol. 375, no. 6577, pp. 167-172.
65. Youn Y.C. Blood amyloid- $\beta$  oligomerization as a biomarker of Alzheimer's Disease: A blinded validation study. *J. Alzheimers Dis.* 2020, Vol. 75, pp. 493-499.
66. Yuan A., Rao M.V., Nixon R.A. Neurofilaments and neurofilament proteins in health and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2017, Vol. 9, no. 4, a018309. doi: 10.1101/cshperspect.a018309.
67. Zlotnik A., Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000, Vol. 12, pp. 121-127.

---

**Авторы:**

**Таскина Е.С.** — к.м.н., доцент кафедры офтальмологии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

**Кибалина И.В.** — д.м.н., доцент, директор Научно-исследовательского института молекулярной медицины, заведующая кафедрой нормальной физиологии имени профессора Б.И. Кузника ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

**Мудров В.А.** — д.м.н., доцент, профессор кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета и факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Россия

**Давыдов С.О.** — д.м.н., профессор кафедры травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ; генеральный директор инновационной клиники «Академия здоровья», г. Чита, Россия

**Authors:**

**Taskina E.S.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Ophthalmology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

**Kibalina I.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Director, Research Institute of Molecular Medicine, Head, B. Kuznik Department of Normal Physiology, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

**Mudrov V.A.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Pediatrics and Faculty of Additional Professional Education, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

**Davydov S.O.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Traumatology and Orthopedics, Chita State Medical Academy, General Director, Innovative Clinic «Academy of Health», Chita, Russian Federation

## CAR-T-КЛЕТКИ И МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОГРАММИРОВАНИЕ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Шекуфе Хатами<sup>1</sup>, Фатемех Каземи<sup>2</sup>, Париса Дорудгар<sup>3</sup>, Сахар Шомейль Шуштари<sup>4</sup>, Мохамад Реза Аташар<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Университет медицинских наук Фаза, Фаза, Иран

<sup>2</sup> Центр изучения метаболических заболеваний, Институт профилактики некоммуникабельных болезней, Университет медицинских наук Казвин, Казвин, Иран

<sup>3</sup> Стоматологическая школа, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

<sup>4</sup> Школа реабилитации, Университет медицинских наук Ахваз-Ундишанур, Ахваз, Иран

**Резюме.** Терапия с применением Т-лимфоцитов с химерным антигенным рецептором (CAR-T-клетки) стала перспективным методом лечения онкогематологических заболеваний. Хотя она является успешной при системных злокачественных заболеваниях, остаются нерешенными крупные проблемы, которые надо решать для ее более широкого использования. Чтобы преодолеть эти препятствия, следует учитывать метаболические изменения, возникающие при изготовлении CAR-T-клеток, что влияет на их терапевтическую эффективность и специфичность. Поэтому продукция CAR-T-клеток с манипуляцией их метаболических путей могла бы существенно повысить их противоопухолевый иммунный ответ. В настоящем обзоре мы обобщаем последние достижения и новые стратегии, разработанные для улучшения метаболического соответствия и противоопухолевой активности CAR-T-клеточных продуктов.

*Ключевые слова:* рак, CAR-T-клетки, метаболизм Т-лимфоцитов, метаболическое репрограммирование

## CAR T CELLS AND METABOLIC PROGRAMMING: A REVIEW

Shekoufeh Hatami<sup>a</sup>, Fatemeh Kazemi<sup>b</sup>, Parisa Doroudgar<sup>c</sup>, Sahar Shomeil Shushtari<sup>d</sup>, Mohammad Reza Atashzar<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

<sup>b</sup> Metabolic Disease Research Center, Institute for Prevention of Non-communicable Diseases, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran

<sup>c</sup> Dental School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>d</sup> School of Rehabilitation, Ahvaz Jundishapur University of Medical Science, Ahvaz, Iran

**Abstract.** Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy shown a promising treatment for haematological malignancies. Although it has successful achievement in hematological malignancies, there are major challenges

---

### Адрес для переписки:

Мохамад Реза Аташар  
Университет медицинских наук Фаза, Фаза, Иран  
E-mail: mr.atashzar@yahoo.com

### Address for correspondence:

Mohammad Reza Atashzar  
Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran  
E-mail: mr.atashzar@yahoo.com

---

### Образец цитирования:

Шекуфе Хатами, Фатемех Каземи, Париса Дорудгар, Сахар Шомейль Шуштари, Мохамад Реза Аташар «CAR-T-клетки и метаболическое программирование: обзор литературы» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 4. С. 723-738.  
doi: 10.15789/1563-0625-CTC-3155

© Шекуфе Хатами и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

Shekoufeh Hatami, Fatemeh Kazemi, Parisa Doroudgar, Sahar Shomeil Shushtari, Mohammad Reza Atashzar "CAR T cells and metabolic programming: A review", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 4, pp. 723-738.  
doi: 10.15789/1563-0625-CTC-3155

© Shekoufeh Hatami et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-CTC-3155

that remain to be resolved to the broad application. To overcome these obstacles, changes in metabolism during the preparation of CAR T cells increase their therapeutic specificity and potency. Therefore, generation of CAR T cells with manipulated metabolic pathways could beneficially enhance antitumor immunity. Here in this review we summarize the latest advances and new strategies that have been developed to improve the metabolic fitness and antitumor activity of CAR T cells products.

*Keywords: cancer, Chimeric Antigen Receptor T cells, T cell metabolism, metabolic reprogramming*

## Introduction

Immunotherapeutic interventions represent a groundbreaking approach in cancer treatment, significantly enhancing the immune system's inherent capabilities to combat the disease [1]. Immunotherapy through adoptive cell therapy can now lead to promising remissions. Among these, chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy, a form of adoptive cell therapy (ACT), has emerged as a particularly effective strategy [2, 4]. The CAR construct is a sophisticated protein design, comprising a fusion of two distinct elements: an extracellular antibody fragment, known as single-chain variable fragment (scFv), which is specific to tumor antigens, and the signaling domains derived from T cells [1, 3, 4, 6]. Chimeric antigen receptor (CAR) T cells are genetically modified to express CAR, enabling them to identify and bind to specific antigens via the single-chain variable fragment (scFv) domain. This interaction triggers T cell activation, bypassing the conventional requirement for major histocompatibility complex (MHC) molecules [9]. Despite the ability of cancerous cells to evade immune surveillance by downregulating HLA or antigen-presenting molecules, CAR T cell therapy offers a unique advantage. This approach enables the engineered T cells to identify and bind to target cell surface molecules, independent of the MHC complex [7, 10, 11]. The unique characteristics of CAR T cells, including their ability to recognize various surface antigens, have established their significance in cancer immunotherapy, leading to their approval as a viable treatment option [17].

Despite the notable success of adoptive CAR T cell therapy in managing hematological malignancies, its effectiveness in treating solid tumors remains a subject of debate within the medical community [13]. Solid tumors present unique challenges for CAR T cell therapy, primarily due to antigen heterogeneity, which hinders the precise targeting of tumor cells. This is in contrast to hematological tumors, where CAR T cells can effectively identify and eliminate cancerous cells. The physical barrier of the vascular endothelium further complicates treatment, preventing CAR T cells from infiltrating solid tumor tissue. Additionally, the presence of various immunosuppressive cell types within the tumor microenvironment, such as myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), M2 tumor-associated macrophages (TAMs), and regulatory T cells (Tregs), contributes to the complexity. These

cells promote angiogenesis, metastasis, and tumor growth, creating an inhibitory milieu that limits the efficacy of CAR T cell therapy in solid tumors [8, 14, 16, 91]. Nonetheless there are efforts to improve the function of these cells [12]. One ongoing activity focuses on metabolic reprogramming of CAR T cells in various ways [15]. The modulation of metabolic pathways, including oxidative phosphorylation and glycolysis, has the potential to influence the behavior and persistence of CAR T cells within tumor microenvironments [30]. The engineering of CAR T cells with specialized attributes, including those resembling early-memory cells, holds potential for boosting the immune system's response against tumors [12, 20].

CAR T manufacturing methods are including several steps: (1) taking peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patient; (2) T cells enrichment; (3) T cell activation and expansion; (4) CAR transduction into T cells; (5) CAR T cells expansion; (6) infusion into patient (Figure 1). Autologous CAR T cell therapy, derived from a patient's own T lymphocytes, is the current standard. However, an innovative approach, known as universal CAR T (UCAR T) cell therapy, utilizes allogeneic CAR T cells sourced from healthy donors. While both therapies share a common cytotoxic mechanism and metabolic profile, they differ significantly in terms of safety, production methods, and associated costs [21]. In this review, we briefly discuss studies on the manipulation of metabolic pathways in some mentioned steps for improving CAR T cell therapy.

### **The role of the tumour microenvironment (TME) on immune cell function**

One of the suppression mechanisms in TME is metabolic suppression. The microenvironment agents and tumour cells can alter immune cell function by altering their metabolic state and displaying reprogrammed metabolism for modulation of antitumor immunity [26, 27].

The characteristics of tumour cells exhibit variation based on their specific location. Within the tumour mass, reduced vascularization significantly lowers oxygen availability, thereby compelling cells to adopt alternative mechanisms for proliferation and survival, deviating from the typical oxidative process [24]. Within a low-oxygen environment, the diminished synthesis of ATP triggers an enhanced absorption of glucose, which remains unconverted into acetyl-

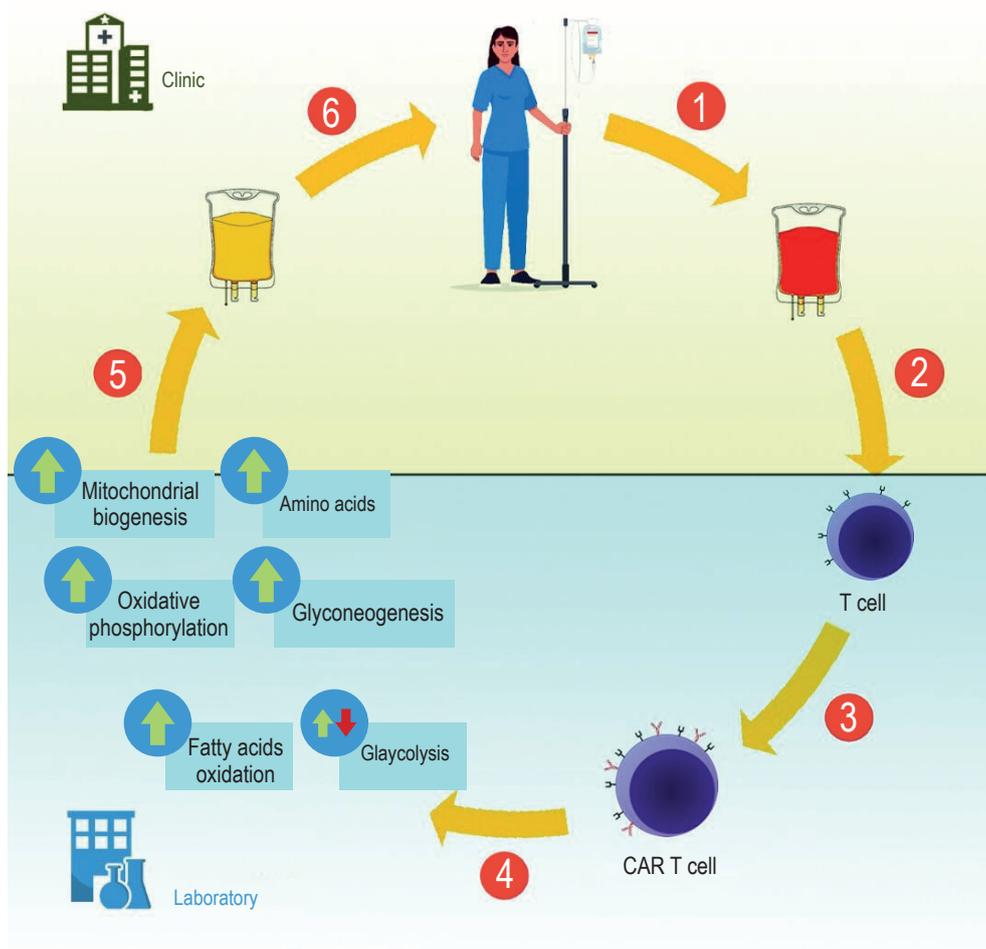


Figure 1. Schematic diagram of manipulation of metabolic pathway of CAR T cells

CoA. This surplus of glucose initiates a metabolic alteration, yielding pyruvate and subsequently lactic acid. Consequently, the shift from oxidative metabolism to lactic acid production induces an acidic transformation within the tumor [25]. Both of these events, hypoxia and acidification, are linked and enhance molecular changes capable of increasing acidosis endurance, promoting tumour growth, evolution, and metastasis, and increasing pharmacological treatment resistance [18, 22].

As well as using similar metabolism pathways and nutrients by immune and tumour cells, they create a competition that leads to cancer cell survival [19, 21, 27] effector T cell functionality occurs, leading to the disruption of memory T cell sub-populations. This decline results in the differentiation of these effector cells into a state characterized by reduced activity, termed T cell exhaustion [28, 29]. T cell exhaustion represents a condition where T cells exhibit diminished functionality, including reduced proliferation, cytokine production, and cytotoxicity. This impairment is associated with increased expression of inhibitory molecules LAG-3, PD-1,

TIM-3, and CTLA-4, which collectively hinder T cell activity. Exhausted T cells also display altered energy metabolism, with decreased ATP production, reduced mitochondrial mass, and a preference for glycolysis over oxidative phosphorylation [31, 32, 33, 35, 36, 38]. Therefore, some signals that originate from the tumour microenvironment, such as acidic pH, hypoxia, nutrient deficiency, and inhibitory factors, can change the metabolic state of immune cells, thereby making changes in immune cell response and function.

Interleukin-7 (IL-7) and IL-23 have been employed as a strategic approach to enhance the longevity and anti-tumour capabilities of CAR T cells. Research has demonstrated that IL-7, in particular, plays a crucial role in preserving the less differentiated state of CAR T cells, thereby mitigating exhaustion [34, 37].

Studies shown that longer and more elevated antitumor activity of naive and memory T cells than effector T cells [41]. Although memory T cells are dependent to fatty acid oxidation (FAO) and have a slightly higher degree of oxidative phosphorylation (OXPHOS) pathways effector cells require aerobic

glycolysis and OXPHOS for energy production [39, 40]. Suitable manipulation of metabolism pathway can maintain CAR T cells in undifferentiated stage and improve their antitumor activity [48].

Elevated glycolytic metabolism in T cells enhances cellular proliferation and cytokine production, notably interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Despite their heightened invasive capabilities, these cells exhibit a brief lifespan and fail to differentiate into memory T cells due to OXPHOS metabolism. Conversely, OXPHOS facilitates memory T cell differentiation but may constrain proliferation, migration, and cytotoxic functionality [23, 43].

The optimal CAR T cell exhibits exceptional qualities, including heightened invasive capabilities, potent cytotoxicity, and prolonged viability. Within the realm of immunotherapy, our discovery of metabolic reprogramming has significantly contributed to the enhancement of immune cell functionality [43].

#### **Strategies to enhance CAR T cell efficacy via metabolic pathways**

##### ***The role of glycolysis***

##### ***Inhibiting glycolysis during T cell expansion and purification***

Metabolic pathway modifications have been shown to influence the proliferation and differentiation processes of T cells in laboratory settings [48]. The manufacturing of CAR T cells *in vitro* encompasses a critical stage wherein purified T cells experience a three-day growth period, leading to a significant elevation in cell numbers. This augmentation is vital prior to their administration into patients. Cytokines, including Interleukin 2 (IL-2), IL-7, IL-15, and IL-21, are introduced into the isolated T cell culture medium, stimulating cell proliferation and enhancing glycolysis [45].

In a clinical trial study for treating patients with B cell lymphomas, PBMCs obtained by leukapheresis will be cultured in the presence of aldesleukin (recombinant IL-2) and anti-CD3 (muromonab-CD3 (OKT3)) for stimulation of T cell proliferation [49].

The binding of Interleukin-2 (IL-2) to its specific receptor, IL-2R, triggers a complex signaling network, ultimately upregulating glycolysis through the Pi3K/Akt-mediated activation of mTOR. This mechanism is pivotal for the metabolic control within T cells. Likewise, IL-7 significantly contributes to the maintenance of glycolytic processes by regulating the expression of key enzymes such as hexokinase 2 (HK2) and Glucose transporter 1 (Glut1), which are fundamental for cellular energy generation. IL-15 and IL-21 exhibit a shared function in T cells, particularly CD8<sup>+</sup> memory T cells, where they stimulate oxidative phosphorylation (OXPHOS), mitochondrial development, and fatty acid oxidation (FAO) by amplifying mTOR signaling [47].

The intricate relationship between metabolic processes and the proliferation of effector cells poses

a critical consideration in designing CAR T cell therapies. The introduction of 2-Deoxy-D-glucose (2DG), a glucose derivative, has the potential to disrupt glycolytic and oxidative phosphorylation pathways by targeting the initial stages of glucose metabolism [46], and the addition of 2DG during expansion by inhibition of glycolysis promotes the formation of memory T cells [28]. As well as indirectly, can inhibit glycolysis. One of the signaling pathways is PI3K/AKT, which with continuous activation has an important role in T cell activation. Inhibitors of PI3K [44] and AKT [42] by inhibition of glycolysis lead to an increase of naive T cells, central memory T cells and CD8<sup>+</sup>T cell cytotoxicity. Some memory cell transcription factors that are inhibited by the mentioned inhibitors include T cell receptor (TCR) /lymphoid enhancer factor (LEF)/-catenin, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), B cell lymphoma 6, forehead box transcription factors (FOXO) and transcriptional regulators [48, 57]. AKT inhibitors also promote Th2 differentiation and memory T cells [53].

Mitochondria, as vital cellular organelles, significantly influence various cellular processes, including migration, metabolic activities, proliferation, and programmed cell death. Research has established a direct correlation between T cell differentiation and mitochondrial characteristics, encompassing mitochondrial dynamics, such as fusion and fission, and mitophagy, the cellular process of eliminating damaged mitochondria [51, 55, 58]. The specialized effector T cells exhibit heightened mitotic activity and predominantly utilize aerobic glycolysis for energy production. Conversely, naive memory T cells maintain their metabolic equilibrium through oxidative phosphorylation, resulting in a higher rate of cellular fusion [50]. T cells must be in a low differentiated state prior to CAR T cell generation. Furthermore, promoting mitochondrial fusion or inhibiting mitochondrial fission could prevent T cell differentiation and increase the OXPHOS metabolism. In addition, mitophagy increases the mitochondrial integrity that prevents the differentiation of memory T cells [54, 56]. There are some mediators which could be used to inhibit glycolysis. For example, pretreatment of cells with ser/threonine Pim kinase inhibits glycolysis and promotes the efficacy of tumour cell clearance [52].

##### ***Increase of gluconeogenesis to improve efficacy of CAR T cell***

The hypothesis posits that cells enduring prolonged acidosis could potentially harness lactate for gluconeogenesis and subsequently engage it in oxidative phosphorylation (OXPHOS). This process is facilitated by the heightened activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1), which converts oxaloacetate (OAA) to phosphoenolpyruvate

(PEP), thereby augmenting gluconeogenesis and alleviating glucose deprivation stress within the tumour microenvironment (TME). Recent studies suggest a potential mechanism for T cell adaptation in the tumour microenvironment (TME). It has been observed that T cells may utilize lactate, a byproduct of tumour cell metabolism, by upregulating the enzyme lactate dehydrogenase B chain (LDHB). This adaptation could enhance the metabolic capabilities of CAR T cells, thereby improving their effectiveness in the TME [62].

#### **Selecting the CAR structure that inhibits glycolysis**

The downstream signaling pathways of costimulatory molecules have a role in metabolic pathways. By selection of suitable costimulatory molecules for the CAR T cell design could improve their efficacy of these cells [60, 61]. Some costimulatory domains such as ICOS [64], CD28 [59], OX40 [63, 65] stimulate glycolysis by upregulating GLUT1, PDK1 and MTOR pathways. However, another costimulatory domain such as; CD137 (4-1BB) through the AMP kinase signaling pathway are favors FAO, OXPHOS and mitochondrial biogenesis that lead to increasing the number of memory T cells [71].

The CAR framework incorporates a PI3K inhibitory domain, and the application of an additional glycolytic inhibitor, specifically a PI3K inhibitor, demonstrated efficacy in halting CAR T cell maturation during a Phase I clinical study [68]. The observed phenomenon suggests a potential elevation in memory-like T cell populations, specifically those expressing LEF1<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, and CCR7<sup>+</sup>. The PI3K/AKT/mTOR pathway's influence on cellular differentiation via glucose metabolism requires further exploration, as the specific mechanisms underlying this interaction are not yet fully understood [68, 70]. Recent studies have demonstrated the enhanced anti-tumour capabilities of CAR T cells incorporating CD28 and 4-1BB costimulatory molecules. These cells, designed to target two distinct tumour-associated antigens with a shared CD3 $\zeta$ -chain, exhibit rapid effector T cell responses and prolonged survival. This longevity is attributed to their metabolic profile, which induces glycolysis while maintaining oxidative functions, crucial for the sustained performance of CAR T cells [69].

#### **CAR T cell maintenance in an undifferentiated stage *in vitro***

Through metabolic engineering of CAR T cells, mimicking the processes of T cells, these cells can be sustained in a less specialized form. This can be achieved by either suppressing glycolysis with 2DG inhibitors or by blocking the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, resulting in an expanded population of memory CAR T cells and enhanced anti-cancer capabilities [42, 66, 71]. Moreover, mitochondria may have an essential role in CAR T cell persistence or differentiation [67].

It seems that adjusting mitochondrial membrane potential or fusion/fission shifts the metabolism into OXPHOS and inhibits glycolysis indirectly. Despite advancements in research, the specific function of mitochondrial biogenesis in modulating metabolic flexibility remains unaddressed in current literature.

#### **The role of CAR T and tumour cell metabolism *in vivo***

*In vitro* studies have shown that inhibiting glycolysis can prolong the survival of CAR T cells. Nevertheless, *in vivo* conditions present a different scenario due to the metabolic competition between CAR T cells and tumour cells. Consequently, augmenting both glycolytic and OXPHOS metabolic pathways in CAR T cells has been found to enhance their antitumor efficacy [77]. Some molecules in TME theoretically affect the function of CAR T cells. For example, although inhibition of the PI3K/AKT pathway *in vitro* prevents the differentiation of CAR T cells [70], activating overexpression of AKT or GLUT1 increases the antitumor activity of effector CAR T cells *in vivo* [73, 74]. The tumor microenvironment (TME) exhibits a complex interplay of cytokines, among which transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) stands out for its inhibitory effects. This cytokine significantly influences glycolytic and OXPHOS processes. Recent studies employing CRISPR technology have revealed that blocking TGF- $\beta$  can enhance glycolysis and OXPHOS in TME-specific CAR T cells. Furthermore, the metabolic competition within the TME is evident as tumor cells' glucose consumption impedes T cell glycolysis, leading to elevated phosphoenolpyruvate (PEP) levels. This increase in PEP is noteworthy due to its involvement in NFAT1 activation within T cells, a crucial component of the antitumor immune response. Nonetheless, further research is warranted to substantiate these findings and elucidate the precise mechanisms involved [76]. There is also a competition between immune cells and tumour cells in TME due to the same nutrient source (glucose) [79]. Glucose is used for glycolysis of tumour cells as well as effector activity of T cells [78]. PD-L1 is a crucial factor in tumour microenvironment regulation, as it is expressed on tumour cells and promotes glycolysis through the activation of the AKT/mTOR pathway. This process intensifies the metabolic competition between immune and tumour cells. Recent research has shown that inhibiting the PD-L1/PD1 pathway using monoclonal antibodies or engineered CARs can significantly enhance the effectiveness of CAR T cell therapy [72, 75, 80]. In addition to their direct impact on tumour cell glycolysis, certain glycolysis inhibitors also influence the metabolic processes of immune cells, presenting a dual effect. Moreover, proper approaches such as using GLUT1 inhibitors or a ketogenic diet could be used to improve CAR T cell efficacy [46]. The application of innovative techniques, such as CRISPR/Cas9, holds the potential to significantly

improve T cell receptor (TCR) signalling and bolster the effectiveness of CAR T cell therapy by targeting diacyl glycerol kinase [81].

#### **The role of CAR T cell culture medium**

The harsh conditions within the tumor micro-environment (TME), characterized by nutrient scarcity and oxygen deprivation, present a significant challenge to the effectiveness of CAR T cell therapy. To address this, a dual-strategy optimization process is required. This involves, primarily, improving the metabolic adaptability of CAR T cells by focusing on glycolysis modulation. Secondly, the precise modification of the culture medium's composition, including nutrient and cytokine content, is crucial to creating a conducive environment for the successful cultivation of CAR T cells [82]. For example, adding arginine into the medium shifts metabolism into OXPHOS and inhibits glycolysis. Furthermore, adding carnosine to TME neutralizes the acidic condition caused by aerobic glycolysis. On the other hand, IL-21 also increases the number of memory CAR T cells by shifting the metabolism of CAR T cells into FAO and OXPHOS pathways [88]. Moreover, IL-7 and IL-15 also cause metabolic adaptability and increase the number of memory CAR T cells by inhibiting glycolysis [84, 85]. However, although IL-2 is needed for the rapid proliferation of T cells, it promotes glycolysis and leads to T cell differentiation. Therefore, more studies are needed for IL-2 replacement [87].

#### **The effects of mitochondrial biogenesis on CAR T cells**

The effector T cells require mitochondrial fission that is controlled by dynamin-related protein1 (Drp1) phosphorylation and glycolysis [53]. However, the proliferation of memory T cells is dependent on mitochondrial fusion and elevated OXPHOS activity, which is facilitated by the dephosphorylation of Drp1 [58]. Thus, memory T cells have more mitochondrial mass than effector T cells [50]. Moreover, enhancing memory or effector T cell numbers by targeting mitochondrial metabolism might represent a strategy to boost CAR T cell therapy [86]. PGC1- $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), a pivotal transcription coactivator, exerts significant control over cellular metabolic processes, particularly mitochondrial biogenesis. Upregulation of PGC1- $\alpha$  in T cells has been linked to enhanced cytokine secretion, mitochondrial functionality, and optimization of OXPHOS and FAO pathways, which are essential for memory T cell metabolism. This modulation may further enhance the functionality of T cells within tumor microenvironments, particularly in cases where OXPHOS is compromised [89]. PGC-1 $\alpha$  activators and immune checkpoint inhibitors exhibit a synergistic relationship, enhancing mitochondrial

metabolism and bolstering the anti-tumor capabilities of T cells through improved metabolic function [88, 89]. Advanced immunotherapy techniques have demonstrated the potential of CAR T cells when modified to enhance PGC-1 expression. This modification leads to the upregulation of critical genes such as ERR, TFAM, and NRF2, which are instrumental in metabolic reprogramming [95]. Activation of the 4-1BB costimulatory domain in CARs through a p38-MAPK-dependent pathway leads to PGC1-dependent mitochondrial fusion and biogenesis. Thus, it enhanced undifferentiated CAR T cells *in vitro* [93].

#### **Oxidative phosphorylation and its role in improving the function of CAR T cells**

Elevated oxidative metabolism is accompanied by an improvement in memory T cell population survival [94]. The engagement of 4-1BB significantly boosts T cell metabolism through mitochondrial fusion, a process mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1) and biogenesis. This enhancement is facilitated by the activation of the p38-microtubule-associated protein kinase (MAPK) signaling pathway [93, 99]. The 4-1BB co-stimulatory molecule enhances oxidative phosphorylation (OXPHOS) and subsequently augments the generation of memory T cells, which exhibit heightened survival capabilities within the organism [85, 97]. Also, The integration of the OX40 costimulatory domain within CAR T cells has been shown to enhance glycolysis, leading to the generation of memory cells. This process is mediated by the TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2), which plays a crucial role in this metabolic reprogramming [65].

In recent studies, it was demonstrated that co-stimulation of OX40 and 4-1BB domains in CAR T cells also improved glucose uptake, glycolysis, and OXPHOS [100]. Also, the transcription factor BATF, in conjunction with NFAT and IRF4, plays a pivotal role in CD8<sup>+</sup>T cell dysfunction. This collaborative mechanism inhibits metabolic processes and induces exhaustion, resulting in a diminished capacity for cytokine production, notably TNF, IL-2, and IFN $\gamma$  [102]. JQ1, a bromodomain and extra-terminal motif (BET) protein inhibitor, has been observed to downregulate BATF expression, leading to enhanced glycolytic and OXPHOS activity. This metabolic shift promotes the maintenance of CD8<sup>+</sup>T cells with a central memory phenotype and stem cell-like characteristics. Furthermore, combining JQ1 with CAR T cell therapy significantly augments their anti-tumor capabilities and persistence *in vivo* [96]. Another strategy to decrease BATF effect on T cell exhaustion is overexpression of the C-Jun transcription factor in CAR T cells. Interestingly, C-Jun seems to compete with BATF/IRF and switch off BATF transcriptional functions at the promoter of the genes [92]. Moreover,

inhibition of lactate dehydrogenase (LDH) causes internalizing of pyruvate into the tricarboxylic acid (TCA) cycle [101]. LDH inhibition by NCI-737 treatment combined with IL-21 increases mitochondrial fusion and the production of memory T cells while suppressing programs of exhaustion T cells. These findings demonstrated metabolic states in T cells with improving anti tumour immunity [101].

#### Amino acid metabolism and CAR T cells

Within the tumor microenvironment (TME), both tumor and associated cells demonstrate the expression of specific amino acid-metabolizing enzymes. These enzymes facilitate the utilization of essential amino acids, which are crucial for the functionality of local T cell populations. Notably, arginine, a vital amino acid for T cell activity, is metabolized by enzymes such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase, which are expressed by tumor-associated macrophages (TAMs). This enzymatic activity leads to a decrease in arginine availability within the TME [103]. The culture medium's nutritional composition has the potential to enhance T cell metabolic activity, offering a significant advantage in adoptive T cell therapy. This can be achieved by incorporating L-arginine, which effectively reduces glycolysis while promoting OXPHOS, thereby optimizing T cell function. Consequently, a proposed strategy involves pre-treating CAR T cells with specific metabolites, including L-arginine, prior to their introduction into the patient's system [82]. Moreover, constructing CAR T cells to express the arginine resynthesizing enzymes such as; ornithine trans carbamylase (OTC) and arginine succinate synthase (ASS), are another way to overcome low arginine levels *in vivo* [103]. As well as researchers developed an lead-guide RNA (dgrNA)-based CRISPR screen in CD8<sup>+</sup>T cells and introduced knocked in or overexpressed proline dehydrogenase 2 (PRODH2) as a new approaches for improving CAR T-based killing. PRODH2 reprograms proline metabolism in primary CD8<sup>+</sup>T cells and enhances CAR T cell therapy in multiple cancer models [98]. The conversion of ATP to adenosine within tumour cells presents a significant challenge, as it depletes the essential ATP required for the optimal functioning of CAR T cells [106]. The presence of adenosine analogues (SCH58261) significantly augments the anti-neoplastic capabilities of CAR T cells by suppressing specific alterations [105]. A proposed method involves the engineering of a CAR (chimeric antigen receptor) that responds to adenosine by fusing the intracellular costimulatory domain of CARs with the extracellular domain of an adenosine receptor. This innovative approach transforms a typically suppressive signal into an activating one, offering a unique strategy in CAR design [104]. The immune metabolite 2-hydroxyglutarate (2HG) exists in two forms, with the S-enantiomer (S-2HG) being the

focus of this discussion. S-2HG production is linked to HIF-1 stabilisation within the body. Notably, CAR T cells enriched with S-2HG demonstrate an increased presence of central memory T cells. In mouse xenograft studies, these S-2HG-treated CAR T cells display heightened anti-tumour capabilities and suppress tumour growth. This metabolite inhibits various  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG)-dependent enzymes, including demethylases and hydroxylases. Among these, the demethylase Ten-eleven translocation 2 (TET2) is a known target, and its inhibition by S-2HG correlates with reduced tumour progression and the promotion of central memory CAR T cells, ultimately enhancing the therapeutic potential of CD19-targeted T cell therapies [107]. In addition, it has an inhibitory role in T cell differentiation into effector cells [109]. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is a crucial enzyme present in tumour cells, facilitating the metabolic conversion of tryptophan into kynurenine [103]. Kynurenin exhibits potent immunosuppressive properties, specifically targeting CAR T cells. This compound suppresses the production of IFN and IL-2, crucial cytokines for T cell function, and induces apoptosis in these cells. Interestingly, inhibiting the enzyme responsible for Kynurenin production, through the use of 1-methyl-tryptophan, appears to rejuvenate CAR T cell activity, offering a potential therapeutic strategy [108]. As well as, shown that kynureninase modified CAR T cells through targeting kynurenine have anti tumour activity in the metabolic immunosuppressive TME with high kynurenine [110]. The metabolite tetrahydrobiopterin (BH4), synthesized by activated T cells, exhibits a regulatory role in mitochondrial bioenergetics and iron homeostasis. Notably, BH4 can counteract the immunosuppressive properties of kynurenine, thereby enhancing anti-tumoral immune responses [113].

Glutamine, an essential amino acid, plays a dual role in cellular processes. It is a prerequisite for the growth of cancer cells, yet simultaneously, it is integral to the functioning of T cells, which are vital components of the immune system [111, 112]. It seems that there is amino acid competition between the T cells and tumour cells [26]. A recent study has identified a glutamine antagonist, JHU083, which exhibits a unique mechanism of action by targeting tumour cell metabolism. This compound effectively inhibits glycolytic and oxidative processes, leading to reduced acidosis and hypoxia within the tumour microenvironment. Consequently, this metabolic modulation enhances the oxidative capacity of effector T cells and promotes their persistence, potentially improving anti-tumour immune responses [114]. This research reveals that intratumoral T cells can exhibit metabolic plasticity with attention to glutamine metabolism deletion and may be a promising direction to pursue in combination with CAR T cells [114]. As

well as demonstrated that glutamine inhibition by glutamine antagonist 6-Diazo-5-oxo-l-norleucine (DON) enhanced mitochondrial OXPHOS utilizing fatty acids and reduced glycolysis of CAR T cells. DON retains more naive T cell or central memory T cell subsets and exhibited stronger killing activity *in vitro* and *in vivo* [115]. Additionally, a promising strategy that causes CAR T cell metabolism adaption to TME is imitating the TME metabolic stresses during ex vivo development. For example, in mouse models, adding T cells in a medium with glutamine inhibitors or in glutamine-depleted culture improves the CD8<sup>+</sup>T cell antitumor activity [117]. Carnosine, a naturally occurring dipeptide, exhibits the ability to neutralize extracellular protons (H<sup>+</sup>) originating from lactate within the media. This process facilitates the redirection of metabolic pathways in CAR T cells, promoting a shift from glycolysis to an oxidative phenotype [116].

#### Lipid metabolism regulation of CAR T cell

It is considered that lipid metabolism reprogramming is an important feature of malignant tumors. In acidic, hypoxic, and nutrition-deficient TMEs, immune cells and cancer cells use lipids for their energy needs [119]. Some studies demonstrated that the incubation of specific cytokines in the culture medium improved CAR T cell therapy through lipid metabolism. For example, IL-7 increased expression of triglyceride synthesis and glycerol transporters and promoted FAO in CAR T cells [121]. IL-15 also upregulates the carnitine palmitoyl transferase enzyme and increases FAO [106]. IL-21 and IL-9 seem to have the same effects and improve FAO [83]. By using IL-7, IL-15, or IL-21 in conjunction with CAR T cells, aerobic glycolysis is switched to FAO and metabolic reprogramming, which enhances mitochondrial fusion and fitness [118].

Recent study has demonstrated that the activation of the NOTCH1 receptor enhances the effectiveness of CD19-targeted CAR T cell immunotherapy. This enhancement is attributed to the upregulation of fatty acid synthesis, heightened OXPHOS activity, and the induction of mitochondrial biogenesis, which collectively support the preservation of a stem cell-like memory T cell population [120]. The study elucidates the mechanism of NOTCH1's impact on T cell function, revealing its role in metabolic reprogramming and the subsequent upregulation of FOXM1, a transcription factor. This process enhances the anti-tumor capabilities of CAR T cells in leukemia models, providing a novel insight into the therapeutic potential of NOTCH1-mediated cellular responses [120]. The connection between cholesterol and its impact on solid cancers and T cell activity is an area of ongoing research. Recent investigations have revealed that suppressing the cholesterol esterification enzyme, ACAT1, leads to elevated cellular cholesterol

levels. This, in turn, enhances the accumulation of TCR on the plasma membrane, resulting in heightened CD8<sup>+</sup>T cell functionality [122]. Nonetheless, other work shows that high cellular cholesterol inhibits glycolysis and upregulates inhibitory markers, leading to exhaustion of tumour infiltrating lymphocytes [124]. Furthermore, inhibition of the Akt pathway by MK2206 increases the FAO pathway in CAR T cells and improves their antitumor activity [20, 42, 123].

#### miRNA targeting in CAR T cell therapy

MicroRNAs (miRNAs) and chimeric antigen receptors (CARs) have the potential to synergistically enhance adoptive T cell therapy through various mechanisms. The integration of miRNAs with CAR T cells presents a powerful approach to cancer treatment. Notably, the IDO enzyme and its derivative, kynurenine, are identified as upstream regulators of miR-143, with IDO substantially elevating its expression. Glut-1 has been confirmed as the target gene of miR-143, which inhibits Glut-1 activity, impedes T cell differentiation, and disrupts glycolysis and glucose uptake. Furthermore, miR-143 upregulation stimulates carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) expression, augmenting FAO and diminishing reliance on glycolysis. This study demonstrates that the overexpression of miR-143 enhances the effectiveness of HER2-CAR T cells against the TE-7 esophageal cancer cell line [125, 126]. High levels of IDO1 are related to the low survival rate of colon cancer (CC) patients. Interferon (IFN) can increase IDO1 expression, resulting in tryptophan degradation and kynurenine formation in TME. In 2018, Huang et al. clarified that miR-153 blocks IDO1 expression in tumour cells, which further improves the CAR T cell therapy against CC. It is a tumour suppressor miRNA that improves the effectiveness of CAR T cell treatment in solid tumours [127]. CD8<sup>+</sup>T cells express HIF-1 and therefore, may induce glycolysis and enhance effector T cell activity. The evidence demonstrates that miR-17-92 targets HIF-1. Overexpression of this miRNA enhances the development of terminal effector T cells and reduces memory T cell formation by improving mTOR function. Therefore, downregulation of miR-17-92 is needed for memory T cell differentiation [128]. In contrast to this study, other research shows that miR-17-92 expression improves interferon (IFN) production and T cell survival. They reported that miR-17-92 expression is decreased in T cells derived from glioblastoma patients, and they assumed that co-expression of miR17-92 in CAR T cells could enhance the efficacy of treatment against this disease [129].

## Conclusion

A new era in cancer has begun in recent years with the use of CAR T cell therapy. In spite of promising results in hematological malignancies, these ap-

proaches have encountered some complications in solid tumors. The success of CAR T cell therapy for patients depends on the CARs' performance, which is influenced by the metabolic fitness of the CARs and the metabolic status of the tumour cells, complexity and high heterogeneity of tumor microenvironment. The efficacy of this immunotherapy appears to be optimized by improving the metabolism of the CARs and harnessing the tumour cells' metabolic state by using of transcriptomic, proteomic, metabolomics and the identification of specific markers for designing the

more effective CAR T cells. Numerous studies support the idea that metabolic reprogramming of CAR T cells, including modifying glycolysis, increasing of OXPHOS, gluconeogenesis, mitochondrial biogenesis, and lipid or amino acid metabolism using various generations of CARs or other methods, may be a useful strategy for production of best CAR T cell and improving clinical outcomes (Table 1). Therefore, more investigation of the metabolic fitness of CAR T cells in response to TME is necessary to improve the

TABLE 1. SOME STUDIES OF MANIPULATING THE METABOLISM TO IMPROVE EFFICACY OF CAR T CELLS

Metabolic alteration	Intervention	Outcome/ result	Year	Reference
<b>Glycolysis</b>	Second-generation of CARs with CD28 domain	Early domination of the effector T cells	2018	[29]
	Second-generation CARs with ICOS domain	Shift to the lipogenesis and glycolysis path and Glut-1 induction	2016	[31]
	Second-generation CARs with CD27 domain	Enhanced T cell anti-tumor function and survival <i>in vivo</i>	2010	[35]
	Using second-generation CAR that co-expressed with T-bet	Up-regulates the expression of glycolytic pathway genes	2018	[36]
	IL-2 used in generating CAR T cells	Effector T cell growth via PI3K/ mTOR path	2020	[46]
	IL-7 used in generating CAR T cells	STAT5 pathway elevates glucose uptake	2008	[44]
	Using of LY294002 (PI3K inhibitor)	Reduce exhaustion of effector T cells	2018	[28]
	Using inhibitors against AKT pathway	Increase glucose uptake and reduce the expression of pro-apoptotic gen	2017	[87]
	Using CRISPR/Cas9 technology and TGFB2R Knockdown	Deleting the negative effect of TGF- $\beta$ and reducing the CAR T cells exhaustion	2020	[50]
	Blocking the PD-L1/PD1 axis	Diminish the tumor cell glycolysis	2013	[45]
Inhibition of mTOR function	Block aerobic glycolysis	2017	[49]	
<b>OXPHOS</b>	Using second-generation CARs with the 4-1BB domain	Induces a more OXPHOS and memory T cells with a higher resistance	2015	[54]
	Co-stimulation of OX40 and 4-1BB domains in CAR T cells	Improved glucose uptake, glycolysis and OXPHOS	2016	[61]
	Diminish in BTAF expression after JQ1 treatment or with C-Jun over-expression in CAR T-cells	Diminish exhaustion and increase glycolysis and OXPHOS	2017	[64]
	LDH inhibition by NCI-737 treatment combined with IL-21	Interning pyruvate into the tricarboxylic acid (TCA) cycle and improve metabolic programming in CARs		

Metabolic alteration	Intervention	Outcome/ result	Year	Reference
<b>Amino acids metabolism</b>	Adding L-arginine in culture medium or constructing CARs to express the arginine resynthesizing enzymes	Compensating arginine deficiency for immune cell	2016	[68]
	Using adenosine analogues	Inhibiting conversion of ATP to adenosine by tumor cells	2015	[69]
	Using CAR T cells with S-2HG	Elevate proportions of memory cells	2020	[67]
	Inhibition of enzyme controls converting tryptophan to Kynurenines (indoleamine 2,3-dioxygenase)	Inhibiting immune-suppressive effect of Kynurenines	2015	[77]
	Using glutamine antagonist (JHU083)	Has suppressive activity on both glycolytic and oxidative metabolic path in tumor cells	2019	[79]
	Carnosine existence in culture media	Neutralize protons (H <sup>+</sup> ) from lactate and improve converting pathway to OXPHOS in CARs	2020	[75]
<b>Lipid metabolism</b>	Adding IL-7,IL-15,IL-19 in the culture medium	Switching aerobic glycolysis towards FAO and improve mitochondrial fitness	2020	[82]
	AKT pathway inhibition	Increases FAO pathway in CAR T cells	2019	[37]
<b>Mitochondrial biogenesis</b>	Activation of the NOTCH1 receptor	Boost fatty acid synthesis, OXPHOS and mitochondrial biogenesis	2020	[83]
	IL-15 used in generating CAR T cells	Improves mitochondrial fitness	2019	[20]
	4-1BB co-stimulated CAR T cells through p38-MAPK dependent pathway	Improves PGC1 $\alpha$ -dependent mitochondrial biogenesis	2018	[29]

function of CAR T cell therapy and its application in clinical trials.

#### Authors' contributions

Mohammad Reza Atashzar and Shekoufeh Hatami designed the project; Fatemeh Kazemi Faezeh Ataei, Sahar Shomeil shushtari, collaborated in writing the

paper. The final manuscript went through review and approval by all authors.

#### Competing interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

1. Akbari B., Ghahri-Saremi N., Soltantoyeh T., Hadjati J., Ghassemi S., Mirzaei H.R. Epigenetic strategies to boost CAR T cell therapy. *Mol. Ther.*, 2021, Vol. 29, no. 9, pp. 2640-2659.
2. Aksoylar H.-I., Tijaro-Ovalle N.M., Boussiotis V.A., Patsoukis N. T cell metabolism in cancer immunotherapy. *Immunometabolism*, 2020, Vol. 2, no. 3, e200020. doi: 10.20900/immunometab20200020.
3. Alizadeh D., Wong R.A., Yang X., Wang D., Pecoraro J.R., Kuo C.-F., Aguilar B., Qi Y., Ann D.K., Starr R., Urak R., Wang X., Forman S.J., Brown C.E. aIL15 Enhances CAR-T cell antitumor activity by reducing mTORC1 activity and preserving their stem cell memory phenotypesuperior antitumor activity of CAR-T cells cultured in IL15. *Cancer Immunol. Res.*, 2019, Vol. 7, no. 5, pp. 759-772.
4. Alsina M., Shah N., Raje N.S., Jagannath S., Madduri D., Kaufman J.L., Siegel D.S., Munshi N.C., Rosenblatt J., Lin Y., Jakubowiak A., Jasielc J., Timm A., Turka A., Mao P., Martin N., Campbell T.B., Hege K., Bitter H., Petrocca F,

Berdeja J.G. Updated results from the phase I CRB-402 study of anti-Bcma CAR-T cell therapy bb21217 in patients with relapsed and refractory multiple myeloma: correlation of expansion and duration of response with T cell phenotypes. *Blood*, 2020, Vol. 136, pp. 25-26.

5. Arcangeli S., Bove C., Mezzanotte C., Camisa B., Falcone L., Manfredi F., Bezzecchi E., Khoury R-E., Norata R., Sanvito F., Ponzoni M., Greco B., Moresco M.-A., Carrabba M.-G., Ciceri F., Bonini C., Bondanza A., Casucci M. CAR T-cell manufacturing from naive/stem memory T-lymphocytes enhances antitumor responses while curtailing cytokine release syndrome. *J. Clin. Invest.*, 2022, Vol. 132, no. 12, e150807. doi: 10.1172/JCI150807.

6. Atkins R.M., Menges M.A., Bauer A., Turner J.G., Locke F.L. Metabolically flexible CAR T Cells (mfCAR-T), with constitutive expression of PGC-1 $\alpha$  resistant to post translational modifications, exhibit superior survival and function in vitro. *Blood*, 2020, Vol. 136, p. 30.

7. Baixauli F, Martín-Cófreces N.B., Morlino G., Carrasco Y.R., Calabia-Linares C., Veiga E., Serrador J-M., Sánchez-Madrid F. The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse. *EMBO J.*, 2011, Vol. 30, no. 7, pp. 1238-1250.

8. Barber D.L., Wherry E.J., Masopust D., Zhu B., Allison J.P., Sharpe A.H., Freeman G.-J., Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 2006, Vol. 439, no. 7077, pp. 682-687.

9. Battram A., Bachiller M., Urbano-Ispizua Á., Martín-Antonio B. 104 BCMA-targeting CAR-T cells expanded in IL-15 have an improved phenotype for therapeutic use compared to those grown in IL-2 or IL-15/IL-7. *BMJ*, 2020, Vol. 8, pp. A115-A115.

10. Beavis P.A., Henderson M.A., Giuffrida L., Mills J.K., Sek K., Cross R.S., Davenport A.-J., John L.-B., Mardiana S., Slaney C.-Y., Ricky W., Johnstone R.-W., Trapani J.-A., Stagg J., Loi S., Kats L., Gyorki D., Kershaw M.H., Darcy P.-K. Targeting the adenosine 2A receptor enhances chimeric antigen receptor T cell efficacy. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 127, no. 3, pp. 929-941.

11. Beavis P.A., Milenkovski N., Henderson M.A., John L.B., Allard B., Loi S., Kershaw M.-H., Stagg J., Darcy P.-K. Adenosine receptor 2A blockade increases the efficacy of anti-PD-1 through enhanced antitumor T-cell responses. *Cancer Immunol. Res.*, 2015, Vol. 3, no. 5, pp. 506-517.

12. Beavis P.A., Slaney C.Y., Kershaw M.H., Gyorki D., Neeson P.J., Darcy P.K. Reprogramming the tumor microenvironment to enhance adoptive cellular therapy. *Semin. Immunol.*, 2016, Vol. 28, no. 1, pp. 64-72.

13. Bishop E.L., Gudgeon N., Dimeloe S. Control of T cell metabolism by cytokines and hormones. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 653605. doi: 10.3389/fimmu.2021.653605.

14. Blackburn S.D., Shin H., Haining W.N., Zou T., Workman C.J., Polley A., Betts M.-R., Freeman G.-J., Vignali D.-A., Wherry E.-J. Coregulation of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 1, pp. 29-37.

15. Bonini C., Mondino A. Adoptive T-cell therapy for cancer: The era of engineered T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2015, Vol. 45, no. 9, pp. 2457-2469.

16. Bose S., Le A. Glucose metabolism in cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2018, Vol. 1063, pp. 3-12.

17. Buck M.D., O'Sullivan D., Geltink R.I.K., Curtis J.D., Chang C.-H., Sanin D.E., Qiu J., Kretz O., Braas D., Windt G.-W., Chen Q., Huang S.-C.-C., O'Neill C.-M., Edelson B.-T., Pearce E.-J., Sesaki H., Huber T.-B., Rambold A.-S., Pearce E.-J. Mitochondrial dynamics controls T cell fate through metabolic programming. *Cell*, 2016, Vol. 166, no. 1, pp. 63-76.

18. Cao Y., Lu W., Sun R., Jin X., Cheng L., He X., Wang L., Yuan T., Lyu C., Zhao M. Anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in combination with nivolumab are safe and effective against relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Front. Oncol.*, 2019, Vol. 9, 767. doi: 10.3389/fonc.2019.00767.

19. Carrio R., Bathe O.F., Malek T.R. Initial antigen encounter programs CD8<sup>+</sup> T cells competent to develop into memory cells that are activated in an antigen-free, IL-7-and IL-15-rich environment. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 12, pp. 7315-7323.

20. Catalán E., Charni S., Jaime P., Aguiló J.I., Enríquez J.A., Naval J., Julián P., Martín V., Alberto A. MHC-I modulation due to changes in tumor cell metabolism regulates tumor sensitivity to CTL and NK cells. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 4, no. 1, e985924. doi: 10.4161/2162402X.2014.985924.

21. Chamoto K., Chowdhury P.S., Kumar A., Sonomura K., Matsuda F., Fagarasan S., Honjo T. Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, Vol. 114, no. 5, pp. E761-E70.

22. Chang C.-H., Curtis J.D., Maggi L.B. Jr., Faubert B., Villarino A.V., O'Sullivan D., Huang S.-C.-C., Windt G.-J.W., Blagih J., Qiu J., Weber J.-D., Pearce E.-J., Jones R.-G., Pearce E.-L. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*, 2013, Vol. 153, no. 6, pp. 1239-1251.

23. Chang C.-H., Qiu J., O'Sullivan D., Buck M.D., Noguchi T., Curtis J.D., Chen Q., Gindin M., Gubin M.-M., van der Windt G.-J.W., Tonc E., Schreiber R.-D., Pearce E.-J., Pearce E.-L. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. *Cell*, Vol. 162, no. 6, pp. 1229-1241.

24. Chatterjee S., Chakraborty P., Daenthansanmak A., Iamsawat S., Andrejeva G., Luevano L.A., Wolf M., Baliga U., Krieg C., Beeson C.-C., Mehrotra M., Hill E.-G., Rathmell J.-C., Yu X.-Z., Kraft A.-S., Mehrotra S. Targeting PIM Kinase with PD1 Inhibition improves immunotherapeutic antitumor T-cell response PIM-K inhibition potentiates ACT. *Clin. Cancer Res.*, 2019, Vol. 25, no. 3, pp. 1036-1049.

25. Chen L., Flies D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 4, pp. 227-242.

26. Corrado M., Pearce E.L. Targeting memory T cell metabolism to improve immunity. *J. Clin. Invest.*, 2022, Vol. 132, no. 1, e148546. doi: 10.1172/JCI148546.
27. Crawford A., Wherry E.J. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.*, 2009, Vol. 21, no. 2, pp. 179-186.
28. Cronin S.J., Seehus C., Weidinger A., Talbot S., Reissig S., Seifert M., Pierson Y., McNeill E., Longhi M. S., Turnes B.-L., Kreslavsky T., Kogler M., Hoffmann D., Ticevic M., Scheffer D.-L., Tortola L., Cikes D., Jais A., Rangachari M., Rao S., Paolino M., Novatchkova M., Aichinger M., Barrett L., Latremoliere A., Wirnsberger G., Lametschwandtner G., Busslinger M., Zicha S., Latini A., Robson S.-C., Waisman A., Andrews N., Costigan M., Channon K.-M., Weiss G., Kozlov A.-V., Tebbe M., Johnsson K., Woolf C.-J., Penninger J.-M. The metabolite BH4 controls T cell proliferation in autoimmunity and cancer. *Nature*, 2018, Vol. 563, no. 7732, pp. 564-568.
29. Cui G., Staron M.M., Gray S.M., Ho P.-C., Amezcua R.A., Wu J., Kaech S.-M. IL-7-induced glycerol transport and TAG synthesis promotes memory CD8<sup>+</sup> T cell longevity. *Cell*, 2015, Vol. 161, no. 4, pp. 750-761.
30. Curran K.J., Pegram H.J., Brentjens R.J. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J. Gene Med.*, 2012, Vol. 14, no. 6, pp. 405-415.
31. Eshhar Z. The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2008, Vol. 181, pp. 329-342.
32. Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, Vol. 90, no. 2, pp. 720-724.
33. Foskolou I.P., Barbieri L., Vernet A., Bargiela D., Cunha P.P., Velica P., Suh E., Pietsch S., Matuleviciute R., Rundqvist H., McIntyre D., Smith K.-G.C., Johnson R.-S. The S enantiomer of 2-hydroxyglutarate increases central memory CD8 populations and improves CAR-T therapy outcome. *Blood Adv.*, 2020, Vol. 4, no. 18, pp. 4483-4493.
34. Fourcade J., Sun Z., Pagliano O., Guillaume P., Luescher I.F., Sander C., Kirkwood J.-M., Olive D., Kuchroo V., Zarour H.-M. CD8<sup>+</sup> T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1 tumor antigen-specific T cells coexpress BTLA and PD-1. *Cancer Res.*, 2012, Vol. 72, no. 4, pp. 887-896.
35. Fraietta J.A., Nobles C.L., Sammons M.A., Lundh S., Carty S.A., Reich T.J., Cogdill A.-P., Morrissette J.J.-D., de Nizio J.-E., Reddy S., Hwang Y., Gohil M., Kulikovskaya I., Nazimuddin F., Gupta M., Chen F., Everett J.-K., Alexander K.-A., Lin-Shiao E., Gee M.-H., Liu X., Young R.-M., Ambrose D., Wang Y., Xu J., Jordan M.-S., Marcucci K.-T., Levine L.B., Garcia K.-C., Zhao Y., Kalos M., Porter D.-L., Kohli R.-M., Lacey S.-F., Berger S.-L., Bushman F.-D., June C.-H., Melenhorst J.J. Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. *Nature*, 2018, Vol. 558, no. 7709, pp. 307-312.
36. Frauwirth K.A., Riley J.L., Harris M.H., Parry R.V., Rathmell J.C., Plas D.R., Elstrom R.-L., June C.-H., Thompson C.-B. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*, 2002, Vol. 16, no. 6, pp. 769-777.
37. Fukumura D., Xu L., Chen Y., Gohongi T., Seed B., Jain R.K. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 16, pp. 6020-6024.
38. Fultang L., Booth S., Yogev O., Martins da Costa B., Tubb V., Panetti S., Stavrou V., Scarpa U., Jankevics A., Lloyd G., Southam A., Lee S.-P., Dunn W.-B., Chesler L., Mussai F., de Santo C. Metabolic engineering against the arginine microenvironment enhances CAR-T cell proliferation and therapeutic activity. *Blood*, 2020, Vol. 136, no. 10, pp. 1155-1160.
39. Geiger R., Rieckmann J.C., Wolf T., Basso C., Feng Y., Fuhrer T., Kogadeeva M., Picotti P., Meissner F., Mann M., Zamboni N., Sallusto F., Lanzavecchia A. L-arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity. *Cell*, 2016, Vol. 167, no. 3, pp. 829-842.e13.
40. Ghassemi S., Martinez-Becerra F.J., Master A.M., Richman S.A., Heo D., Leferovich J., Tu Y., García-Cañaveras J.-C., Ayari A., Lu Y., Wang A., Rabinowitz J.-D., Milone M.-C., June C.-H., O'Connor R.-S. Enhancing chimeric antigen receptor T cell anti-tumor function through advanced media design. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2020, Vol. 18, pp. 595-606.
41. Gross G., Waks T., Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, Vol. 86, no. 24, pp. 10024-10028.
42. Haji-Fatahaliha M., Hosseini M., Akbarian A., Sadreddini S., Jadidi-Niaragh F., Yousefi M. CAR-modified T-cell therapy for cancer: an updated review. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2016, Vol. 44, no. 6, pp. 1339-1349.
43. Hermans D., Gautam S., García-Cañaveras J.C., Gromer D., Mitra S., Spolski R., Li P., Christensen S., Nguyen R., Lin J.-X., Oh J., Du N., Veenbergen S., Fioravanti J., Ebina-Shibuya R., Bleck C., Neckers L.-M., Rabinowitz J.-D., Gattinoni L., Leonard W.-J. Lactate dehydrogenase inhibition synergizes with IL-21 to promote CD8<sup>+</sup> T cell stemness and antitumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, Vol. 117, no. 11, pp. 6047-6055.
44. Hillerdal V., Essand M. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for the treatment of metastatic prostate cancer. *BioDrugs*, 2015, Vol. 29, no. 2, pp. 75-89.
45. Hirabayashi K., Du H., Xu Y., Shou P., Zhou X., Fucá G., Landoni E., Sun C., Chen Y., Savoldo B., Dotti G. Dual targeting CAR-T cells with optimal costimulation and metabolic fitness enhance antitumor activity and prevent escape in solid tumors. *Nat. Cancer*, 2021, Vol. 2, no. 9, pp. 904-918.
46. Ho P.-C., Bihuniak J.D., Macintyre A.N., Staron M., Liu X., Amezcua R., Tsui Y.-C., Cui G., Micevic G., Perales J.-C., Kleinstein S.-H., Abel E.-D., Insogna K.-L., Feske S., Locasale J.-W., Bosenberg M.-W., Rathmell J.-C.,

Kaech S.-M. Phosphoenolpyruvate is a metabolic checkpoint of anti-tumor T cell responses. *Cell*, 2015, Vol. 162, no. 6, pp. 1217-1228.

47. Ho P.-C., Liu P.-S. Metabolic communication in tumors: a new layer of immunoregulation for immune evasion. *J. Immunother. Cancer*, 2016, Vol. 4, no. 1, pp. 1-9.

48. Huang Q., Xia J., Wang L., Wang X., Ma X., Deng Q., Lu Y., Kumar M., Zhou Z., Li L., Zeng Z., Young K.-H., Yi Q., Zhang M., Li Y. miR-153 suppresses IDO1 expression and enhances CAR T cell immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.*, 2018, Vol. 11, no. 1, pp. 1-12.

49. Huang Y., Li D., Qin D., Gou H., Wei W., Wang Y., Wei Y.-Q., Wang W. Interleukin-armed chimeric antigen receptor-modified T cells for cancer immunotherapy. *Gene Ther.*, 2018, Vol. 25, no. 3, pp. 192-197.

50. Jacobs S.R., Herman C.E., MacIver N.J., Wofford J.A., Wieman H.L., Hammen J.J., Rathmell J.-C. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 7, pp. 4476-4486.

51. Jena B., Rushworth D., McNamara G.T., Cooper L.J. Mitochondrial biomass as a measure of fitness for T cells expressing chimeric antigen receptors. *Blood*, 2015, Vol. 126, no. 23, p. 3242.

52. Jiang B. Aerobic glycolysis and high level of lactate in cancer metabolism and microenvironment. *Genes Dis.*, 2017, Vol. 4, no. 1, pp. 25-27.

53. Jiang J., Srivastava S., Zhang J. Starve cancer cells of glutamine: break the spell or make a hungry monster? *Cancers*, 2019, Vol. 11, no. 6, 804. doi: 10.3390/cancers11060804.

54. Jin H.-T., Anderson A.C., Tan W.G., West E.E., Ha S.-J., Araki K., Freeman G.-J., Kuchroo V.-K., Ahmed R. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 33, pp. 14733-14738.

55. John L.B., Kershaw M.H., Darcy P.K. Blockade of PD-1 immunosuppression boosts CAR T-cell therapy. *Oncoimmunology*, 2013, Vol. 2, no. 10, e26286. doi: 10.4161/onci.26286.

56. Joller N., Hafler J.P., Brynedal B., Kassam N., Spoer S., Levin S.D., Sharpe A.-H., Kuchroo V.-K. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 3, pp. 1338-1342.

57. Jones N., Vincent E.E., Cronin J.G., Panetti S., Chambers M., Holm S.R., Sian E., Owens S.-E., Francis N.-J., Finlay D.-K., Thornton C.-A. Akt and STAT5 mediate naïve human CD4+ T-cell early metabolic response to TCR stimulation. *Nat. Commun.*, 2019, Vol. 10, no. 1, pp. 1-13.

58. Jung I.-Y., Kim Y.-Y., Yu H.-S., Lee M., Kim S., Lee J. CRISPR/Cas9-mediated knockout of DGK improves antitumor activities of human T cells. *Cancer Res.*, 2018, Vol. 78, no. 16, pp. 4692-4703.

59. Kagoya Y., Nakatsugawa M., Yamashita Y., Ochi T., Guo T., Anczurowski M., Saso K., Butler M.-O., Arrowsmith C.-H., Hirano N. BET bromodomain inhibition enhances T cell persistence and function in adoptive immunotherapy models. *J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 126, no. 9, pp. 3479-3494.

60. Kawalekar O.U., O'Connor R.S., Fraietta J.A., Guo L., McGettigan S.E., Posey A.D. Jr., Patel P.-R., Guedan S., Scholler J., Keith B., Snyder N.-W., Blair I.-A., Milone M.-C., June C.-H. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 2, pp. 380-390.

61. Kim E.H., Sullivan J.A., Plisch E.H., Tejera M.M., Jatzek A., Choi K.Y., Suresh M. Signal integration by Akt regulates CD8 T cell effector and memory differentiation. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 9, pp. 4305-4314.

62. Klebanoff C.A., Crompton J.G., Leonardi A.J., Yamamoto T.N., Chandran S.S., Eil R.L., Sukumar M., Vodnala S.-K., Hu J., Ji Y., Clever D., Black M.-A., Gurusamy D., Kruhlak M.-J., Jin P., Stroncek D.-F., Gattinoni L., Feldman S.-A., Restifo N.-P. Inhibition of AKT signaling uncouples T cell differentiation from expansion for receptor-engineered adoptive immunotherapy. *JCI insight*, 2017, Vol. 2, no. 23, e95103. doi: 10.1172/jci.insight.95103.

63. Kondo T., Ando M., Nagai N., Tomisato W., Srirat T., Liu B., Mise-Omata S., Ikeda M., Chikuma S., Nishimasu H., Nureki O., Ohmura M., Hayakawa N., Hishiki T., Uchibori R., Ozawa K., Yoshimura A. The NOTCH-FOXO1 axis plays a key role in mitochondrial biogenesis in the induction of human stem cell memory-like CAR-T cells. *Cancer Res.*, 2020, Vol. 80, no. 3, pp. 471-483.

64. Kouidhi S., Ben Ayed F., Benammar Elgaia A. Targeting tumor metabolism: a new challenge to improve immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 353. doi: 10.3389/fimmu.2018.00353.

65. Leone R.D., Zhao L., Englert J.M., Sun I.-M., Oh M.-H., Sun I.-H., Arwood M.-L., Bettencourt I.-A., Patel C.-H., Wen J., Tam A., Blosser R.-L., Prchalova E., Alt J., Rais R., Slusher B.-S., Powell J.-D. Glutamine blockade induces divergent metabolic programs to overcome tumor immune evasion. *Science*, 2019, Vol. 366, no. 6468, pp. 1013-1021.

66. Li L., Li Q., Yan Z.X., Sheng L.S., Fu D., Xu P., Wang L., Zhao W.-L. Transgenic expression of IL-7 regulates CAR-T cell metabolism and enhances in vivo persistence against tumor cells. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, no. 1, 12506. doi: 10.1038/s41598-022-16616-2.

67. Lin H., Cheng J., Mu W., Zhou J., Zhu L. Advances in universal CAR-T cell therapy. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 744823. doi: 10.3389/fimmu.2021.744823.

68. Long A.H., Haso W.M., Shern J.F., Wanhainen K.M., Murgai M., Ingaramo M., Smith J.-P., Walker A.-J., Kohler M.-E., Venkateshwara V.-R., Kaplan R.-N., Patterson G.-H., Fry T.-J., Orentas R.-J., Mackall C.-L. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 6, pp. 581-590.

69. López-Cantillo G., Urueña C., Camacho B.A., Ramírez-Segura C. CAR-T cell performance: how to improve their persistence? *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 878209. doi: 10.3389/fimmu.2022.878209.

70. Loschinski R., Böttcher M., Stoll A., Bruns H., Mackensen A., Mougiakakos D. IL-21 modulates memory and exhaustion phenotype of T-cells in a fatty acid oxidation-dependent manner. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 17, pp. 13125-13138.
71. Lynn R.C., Weber E.W., Sotillo E., Gennert D., Xu P., Good Z., Anbunathan H., Lattin J., Jones R., Tieu V., Nagaraja S., Granja J., Bourcy C.-F.-A., Majzner R., Satpathy A.-T., Quake S.-R., Monje M., Chang H.-Y., Mackall C.-L. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature*, 2019, Vol. 576, no. 7786, pp. 293-300.
72. Ma X., Bi E., Lu Y., Su P., Huang C., Liu L., Qiang Wang Q., Yang M., Kalady M.-F., Qian J., Zhang A., Gupte A.-A., Hamilton D.-J., Zheng C., Yi Q. Cholesterol induces CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Metab.*, 2019, Vol. 30, no. 1, pp. 143-156.e5.
73. Ma X., Shou P., Smith C., Chen Y., Du H., Sun C., Porterfield Kren N., Michaud D., Ahn S., Vincent B., Savoldo B., Pylyayeva-Gupta Y., Zhang S., Dotti G., Xu Y. Interleukin-23 engineering improves CAR T cell function in solid tumors. *Nat. Biotechnol.*, 2020, Vol. 38, no. 4, pp. 448-459.
74. Majzner R.G., Mackall C.L. Tumor antigen escape from CAR T-cell therapy. *Cancer Discov.*, 2018, Vol. 8, no. 10, pp. 1219-1226.
75. Man K., Gabriel S.-S., Liao Y., Gloury R., Preston S., Henstridge D.-C., Pellegrini M., Zehn D., Berberich-Siebelt F., Febbraio M.-A., Shi W., Kallies A. Transcription factor IRF4 promotes CD8 T cell exhaustion and limits the development of memory-like t cells during chronic infection. *Immunity*, 2017, Vol. 47, no. 6, pp. 1129-1141.e5.
76. Marchesi F., Vignali D., Manini B., Rigamonti A., Monti P. Manipulation of glucose availability to boost cancer immunotherapies. *Cancers*, 2020, Vol. 12, no. 10, 2940. doi: 10.3390/cancers12102940.
77. Marofi F., Motavalli R., Safonov V.A., Thangavelu L., Yumashev A.V., Alexander M., Shomali N., Chartrand M.-S., Pathak Y., Jarahian M., Izadi S., Hassanzadeh A., Shirafkan N., Tahmasebi S., Motavalli Khiavi F. CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities. *Stem Cell Res. Ther.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 81. doi: 10.1186/s13287-020-02128-1.
78. Menk A.V., Scharping N.E., Rivadeneira D.B., Calderon M.J., Watson M.J., Dunstane D., Watkins S.-C., Delgoffe G.-M. 4-1BB costimulation induces T cell mitochondrial function and biogenesis enabling cancer immunotherapeutic responses. *J. Exp. Med.*, 2018, Vol. 215, no. 4, pp. 1091-1100.
79. Mousset C.M., Hobo W., de Ligt A., Baardman S., Schaap N.P., Jansen J.H., Waart A.-B.V.-D., Dolstra H. Cell composition and expansion strategy can reduce the beneficial effect of AKT-inhibition on functionality of CD8<sup>+</sup> T cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2020, Vol. 69, no. 11, pp. 2259-2273.
80. Nabe S., Yamada T., Suzuki J., Toriyama K., Yasuoka T., Kuwahara M., Shiraishi A., Takenaka K., Yasukawa M., Yamashita M. Reinforce the antitumor activity of CD8<sup>+</sup> T cells via glutamine restriction. *Cancer Sci.*, 2018, Vol. 109, no. 12, pp. 3737-3750.
81. Ninomiya S., Narala N., Huye L., Yagy S., Savoldo B., Dotti G., Heslop H.-E., Brenner M.-K., Rooney C. M., Ramos C.-A. Tumor indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) inhibits CD19-CAR T cells and is downregulated by lymphodepleting drugs. *Blood*, 2015, Vol. 125, no. 25, pp. 3905-3916.
82. Ohno M., Ohkuri T., Kosaka A., Tanahashi K., June C.H., Natsume A., Okada H. Expression of miR-17-92 enhances anti-tumor activity of T-cells transduced with the anti-EGFRvIII chimeric antigen receptor in mice bearing human GBM xenografts. *J. Immunother. Cancer*, 2013, Vol. 1, no. 1, pp. 1-12.
83. Pacella I., Procaccini C., Focaccetti C., Miacci S., Timperi E., Faicchia D., Severa M., Rizzo F., Coccia E.-M., Bonacina F., Mitro N., Norata G.-D., Rossetti G., Ranzani V., Pagani M., Giorda E., Wei Y., Matarese G., Barnaba V., Piconese S. Fatty acid metabolism complements glycolysis in the selective regulatory T cell expansion during tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2018, Vol. 115, no. 28, pp. E6546-E55.
84. Pellegrino M., del Bufalo F., de Angelis B., Quintarelli C., Caruana I., de Billy E. Manipulating the Metabolism to Improve the Efficacy of CAR T-Cell Immunotherapy. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 1, 14. doi: 10.3390/cells10010014.
85. Quintarelli C., Orlando D., Boffa I., Guercio M., Polito V.A., Petretto A., Lavarello C., Sinibaldi M., Weber G., Bufalo F.-D., Giorda E., Scarsella M., Petrini S., Pagliara D., Locatelli F., Angelis B.-D., Caruana I. Choice of costimulatory domains and of cytokines determines CAR T-cell activity in neuroblastoma. *Oncoimmunology*, 2018, Vol. 7, no. 6, e1433518. doi: 10.1080/2162402X.2018.1433518.
86. Ramos C.A., Heslop H.E., Brenner M.K. CAR-T cell therapy for lymphoma. *Ann. Rev. Med.*, 2016, Vol. 67, pp. 165-183.
87. Roex G., Timmers M., Wouters K., Campillo-Davo D., Flumens D., Schroyens W., Chu W., Berneman Z.-N., Lion E., Luo F., Anguille S.J. Safety and clinical efficacy of BCMA CAR-T-cell therapy in multiple myeloma. *J. Hematol. Oncol.*, 2020, Vol. 13, no. 1, pp. 1-14.
88. Rompton J.G., Sukumar M., Roychoudhuri R., Clever D., Gros A., Eil RL., Tran E., Hanada K.-I., Yu Z., Palmer D.-C., Kerkar S.-P., Michalek R.-D., Upham T., Leonardi A., Acquavella N., Wang E., Marincola F.-M., Gattinoni L., Muranski P., Sundrud M.-S., Klebanoff C.-A., Rosenberg S.-A., Fearon D.-T., Restifo N.-P. Akt inhibition enhances expansion of potent tumor-specific lymphocytes with memory cell characteristics. Akt inhibition improves T-cell antitumor immunity. *Cancer Res.*, 2015, Vol. 75, no. 2, pp. 296-305.
89. Ron-Harel N., Santos D., Ghergurovich J.M., Sage P.T., Reddy A., Lovitch S.B., Dephore N., Satterstrom F.-K., Sheffer M., Spinelli J.-B., Gygi S., Rabinowitz J.-D., Sharpe A.-H., Haigis M.-C. Mitochondrial biogenesis and proteome remodeling promote one-carbon metabolism for T cell activation. *Cell Metab.*, 2016, Vol. 24, no. 1, pp. 104-117.
90. Rosenberg S. CAR T cell receptor immunotherapy for patients with B-cell lymphoma. National Cancer Institute (NCI). Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00924326>.

91. Rostamian H., Fallah-Mehrjardi K., Khakpoor-Koosheh M., Pawelek J.M., Hadjati J., Brown C.E., Mirzaei H.-R. A metabolic switch to memory CAR T cells: Implications for cancer treatment. *Cancer Lett.*, 2021, Vol. 500, pp. 107-118.
92. Salmond R.J. mTOR regulation of glycolytic metabolism in T cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2018, Vol. 6:122.
93. Sanchez-Paulete A.R., Labiano S., Rodriguez-Ruiz M.E., Azpilikueta A., Etxeberria I., Bolaños E., Lang V., Rodriguez M., Aznar A.M., Jure-Kunkel M., Melero I. Deciphering CD137 (4-1BB) signaling in T-cell costimulation for translation into successful cancer immunotherapy. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, no. 3, pp. 513-522.
94. Scharping N.E., Menk A.V., Moreci R.S., Whetstone R.D., Dadey R.E., Watkins S.C., Ferris R.-L., Delgoffe G.-M. The tumor microenvironment represses T cell mitochondrial biogenesis to drive intratumoral T cell metabolic insufficiency and dysfunction. *Immunity*, 2016, Vol. 45, no. 2, pp. 374-388.
95. Shen L., Xiao Y., Zhang C., Li S., Teng X., Cui L., Liu T., Wu N., Lu Z. Metabolic reprogramming by ex vivo glutamine inhibition endows CAR-T cells with less-differentiated phenotype and persistent antitumor activity. *Cancer Lett.*, 2022, Vol. 538, 215710. doi: 10.1016/j.canlet.2022.215710.
96. Simula L., Campanella M., Campello S. Targeting Drp1 and mitochondrial fission for therapeutic immune modulation. *Pharmacol. Res.*, 2019, Vol. 146, 104317. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104317.
97. Siska P.J., van der Windt G.J., Kishton R.J., Cohen S., Eisner W., MacIver N.J., Kater A.-P., Weinberg J.-B., Rathmell J.-C. Suppression of Glut1 and glucose metabolism by decreased Akt/mTORC1 signaling drives T cell impairment in B cell leukemia. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 197, no. 6, pp. 2532-2540.
98. Steentoft C., Migliorini D., King T.R., Mandel U., June C.H., Posey A.D. Jr. Glycan-directed CAR-T cells. *Glycobiology*, 2018, Vol. 28, no. 9, pp. 656-669.
99. Suarez E.R., Chang D.-K., Sun J., Sui J., Freeman G.J., Signoretti S., Zhu Q., Marasco W.-A. Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 23, 34341-34355.
100. Sukumar M., Kishton R.J., Restifo N.P. Metabolic Reprogramming of anti-tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2017, Vol. 46, pp. 14-22.
101. Sukumar M., Liu J., Ji Y., Subramanian M., Crompton J.G., Yu Z., Roychoudhuri R., Palmer D.-C., Muranski P., Karoly E.-D., Mohney R.-P., Klebanoff C.-A., Lal A., Finkel T., Restifo N.-P., Gattinoni L. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8<sup>+</sup> T cell memory and antitumor function. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 10, pp. 4479-4488.
102. Sukumar M., Liu J., Mehta G.U., Patel S.J., Roychoudhuri R., Crompton J.G., Klebanoff C.-A., Ji Y., Li P., Yu Z., Whitehill G.-D., Clever D., Eil R.-L., Palmer D.-C., Mitra S., Rao M., Keyvanfar K., Schrumpp D.-S., Wang E., Marincola F.-M., Gattinoni L., Leonard W.-J., Muranski P., Finkel T., Restifo N.-P. Mitochondrial membrane potential identifies cells with enhanced stemness for cellular therapy. *Cell Metab.*, 2016, Vol. 23, no. 1, pp. 63-76.
103. Sukumar M., Roychoudhuri R., Restifo N.P. Nutrient competition: a new axis of tumor immunosuppression. *Cell*, 2015, Vol. 162, no. 6, pp. 1206-1208.
104. Tang N., Cheng C., Zhang X., Qiao M., Li N., Mu W., Wei X.-F., Han W., Haoyi Wang H. TGF- $\beta$  inhibition via CRISPR promotes the long-term efficacy of CAR T cells against solid tumors. *JCI insight*, 2020, Vol. 5, no. 4, e133977. doi: 10.1172/jci.insight.133977.
105. Teijeira A., Labiano S., Garasa S., Etxeberria I., Santamaría E., Rouzaut A., Enamorado M., Azpilikueta A., Inoges S., Bolaños E., Aznar M.-A., Sánchez-Paulete A.-R., Sancho D., Melero I. Mitochondrial morphological and functional reprogramming following CD137 (4-1BB) costimulation4-1BB (CD137) and mitochondria. *Cancer Immunol. Res.*, 2018, Vol. 6, no. 7, pp. 798-811.
106. Tokarew N., Ogonek J., Endres S., von Bergwelt-Baildon M., Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br. J. Cancer*, 2019, Vol. 120, no. 1, pp. 26-37.
107. Tsurutani N., Mittal P., Rose M.-C.S., Ngoi S.M., Svedova J., Menoret A., Treadway F.-B., Laubenbacher R., Suárez-Ramírez J.-E., Cauley L.-S., Adler A.-J., Vella A.-T. Costimulation endows immunotherapeutic CD8 T cells with IL-36 responsiveness during aerobic glycolysis. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 1, pp. 124-134.
108. van der Windt G.J., Everts B., Chang C.-H., Curtis J.-D., Tori C., Freitas T.-C., Amiel E., Pearce E.-I., Pearce E.-L. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8<sup>+</sup> T cell memory development. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 1, pp. 68-78.
109. van der Windt G.J., O'Sullivan D., Everts B., Huang S.C.-C., Buck M.D., Curtis J.D., Chang C.-H., Smith A.-M., Ai T., Faubert B., Jones R.-G., Pearce E.-J., Pearce E.-L. CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, Vol. 110, no. 35, pp. 14336-14341.
110. Wan H., Xu B., Zhu N., Ren B. PGC-1 $\alpha$  activator-induced fatty acid oxidation in tumor-infiltrating CTLs enhances effects of PD-1 blockade therapy in lung cancer. *Tumori*, 2020, Vol. 106, no. 1, pp. 55-63.
111. Wei F., Wang D., Wei J., Tang N., Tang L., Xiong F., Guo C., Zhou M., Li X., Li G., Xiong W., Zhang S., Zeng Z. Metabolic crosstalk in the tumor microenvironment regulates antitumor immunosuppression and immunotherapy resistance. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2021, Vol. 78, no. 1, pp. 173-193.
112. Weinkove R., George P., Dasyam N., McLellan A.D. Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations. *Clin. Transl. Immunology*, 2019, Vol. 8, no. 5, e1049. doi: 10.1002/cti2.1049.
113. Wu Y., Deng Z., Tang Y., Zhang S., Zhang Y.-Q. Over-expressing Akt in T cells to resist tumor immunosuppression and increase anti-tumor activity. *BMC Cancer*, 2015, Vol. 15, no. 1, pp. 1-10.

114. Xiao C., Tian H., Zheng Y., Yang Z., Li S., Fan T., Xu J., Bai J., Liu J., Deng Z., Li C., He J. Glycolysis in tumor microenvironment as a target to improve cancer immunotherapy. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2022, Vol. 10, 1013885. doi: 10.3389/fcell.2022.1013885.
115. Xu X., Gnanaprakasam J., Sherman J., Wang R. A metabolism toolbox for CAR T therapy. *Front. Oncol.*, 2019, Vol. 9:322.
116. Xu L., Fukumura D., Jain R.K. Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, no. 13, pp. 11368-11374.
117. Xu X., Gnanaprakasam J.R., Sherman J., Wang R. A metabolism toolbox for CAR T therapy. *Front. Oncol.*, 2019, Vol. 9, 322. doi: 10.3389/fonc.2019.00322.
118. Yang Q., Hao J., Chi M., Wang Y., Xin B., Huang J., Lu J., Li J., Sun X., Li C., Huo H., Zhang J., Han Y., Guo C. Superior antitumor immunotherapy efficacy of kynureninase modified CAR-T cells through targeting kynurenine metabolism. *Oncoimmunology*, 2022, Vol. 11, no. 1, 2055703. doi: 10.1080/2162402X.2022.2055703.
119. Yang W., Bai Y., Xiong Y., Zhang J., Chen S., Zheng X., Meng X., Lunyi Li L., Wang J., Xu C., Yan C., Wang L., Chang C.-C.Y., Chang T.-Y., Zhang T., Zhou P., Song B.-L., Liu W., Sun S.-C., Liu X., Li B.-I., Xu C. Potentiating the antitumor response of CD8<sup>+</sup> T cells by modulating cholesterol metabolism. *Nature*, 2016, Vol. 531, no. 7596, pp. 651-655.
120. Ye L., Park J.J., Peng L., Yang Q., Chow R.D., Dong M.B., Lam S.-Z., Guo J., Tang E., Zhang Y., Wang G., Dai X., Du Y., Kim H.-R., Cao H., Errami Y., Clark P., Bersenev A., Montgomery R.-R., Chen S. A genome-scale gain-of-function CRISPR screen in CD8 T cells identifies proline metabolism as a means to enhance CAR-T therapy. *Cell Metab.*, 2022, Vol. 34, no. 4, pp. 595-614.e14.
121. Yu W., Lei Q., Yang L., Qin G., Liu S., Wang D., Ping Y., Zhang Y. Contradictory roles of lipid metabolism in immune response within the tumor microenvironment. *J. Hematol. Oncol.*, 2021, Vol. 14, no. 1, pp. 1-19.
122. Zeng H., Cohen S., Guy C., Shrestha S., Neale G., Brown S.A., Caryn Cloer C., Kishton R.-J., Gao X., Youngblood B., Do M., Li M.-O., Locasale J.-W., Rathmell J.-C., Chi H. mTORC1 and mTORC2 kinase signaling and glucose metabolism drive follicular helper T cell differentiation. *Immunity*, 2016, Vol. 45, no. 3, pp. 540-554.
123. Zhang L., Li W. Rewiring mitochondrial metabolism for CD8<sup>+</sup> T cell memory formation and effective cancer immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1834. doi: 10.3389/fimmu.2020.01834.
124. Zhang M., Jin X., Sun R., Xiong X., Wang J., Xie D., Zhao M.-F. Optimization of metabolism to improve efficacy during CAR-T cell manufacturing. *J. Transl. Med.*, 2021, Vol. 19, no. 1, pp. 1-11.
125. Zhang Q., Ding J., Sun S., Liu H., Lu M., Wei X., Gao X., Zhang X., Fu Q., Zheng Z. Akt inhibition at the initial stage of CAR-T preparation enhances the CAR-positive expression rate, memory phenotype and in vivo efficacy. *Am. J. Cancer Res.*, 2019, Vol. 9, no. 11, 2379-2396.
126. Zhang T., Zhang Z., Li F., Ping Y., Qin G., Zhang C., Zhang Y. miR-143 regulates memory T cell differentiation by reprogramming T Cell Metab. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 201, no. 7, pp. 2165-2175.
127. Zhang Z., Zhang C., Li F., Zhang B., Zhang Y. Regulation of memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation by microRNAs. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2018, Vol. 47, no. 6, pp. 2187-2198.
128. Zheng W., O'Hear C.E., Alli R., Basham J.H., Abdelsamed H.A., Palmer L.E., Jones L.-L., Youngblood B., Geiger T.-L. PI3K orchestration of the in vivo persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells. *Leukemia*, 2018, Vol. 32, no. 5, pp. 1157-1167.
129. Zheng W., O'Hear C.E., Alli R., Basham J.H., Abdelsamed H.A., Palmer L.E., Jones L.-L., Youngblood B., Geiger T.-L. PI3K orchestration of the in vivo persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells. *Leukemia*, 2018, Vol. 32, no. 5, pp. 1157-1167.

**Авторы:**

**Шекуфе Хатами** – отдел биохимии, Университет медицинских наук Фаза, Фаза, Иран

**Фатемех Каземи** – Центр изучения метаболических заболеваний, Институт профилактики некоммуникабельных болезней, Университет медицинских наук Казвин, Казвин, Иран

**Париса Дорудгар** – Стоматологическая школа, Тегеранский университет медицинских наук, Тегеран, Иран

**Сахар Шомейль Шуштари** – PhD, отдел аудиологии, Школа реабилитации, Университет медицинских наук Ахваз-Ундишапур, Ахваз, Иран

**Мохаммад Реза Аташзар** – PhD, отдел иммунологии, Университет медицинских наук Фаза, Фаза, Иран

**Authors:**

**Shekoufeh Hatami**, Department of Biochemistry, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

**Fatemeh Kazemi**, Metabolic Disease Research Center, Institute for Prevention of Non-communicable Diseases, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran

**Parisa Doroudgar**, Dental School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Sahar Shomeil Shushtari**, PhD, Department of Audiology, School of Rehabilitation, Ahvaz Jundishapur University of medical science, Ahvaz, Iran

**Mohammad Reza Atashzar**, PhD, Department of Immunology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

Поступила 30.11.2024  
Принята к печати 23.03.2025

Received 30.11.2024  
Accepted 23.03.2025

# ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ БИОПТАТАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА КАК КРИТЕРИЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЦЕТИЛ-АМИДНОЙ ФОРМЫ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА HLDF-6 ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Мангазеева Е.Д.<sup>1,2</sup>, Студеникина А.А.<sup>1,2</sup>, Михайлова Е.С.<sup>1,2</sup>,  
Морозов Д.В.<sup>3</sup>, Рыжикова С.Л.<sup>4</sup>, Дружинина Ю.Г.<sup>4</sup>, Проскура А.В.<sup>2</sup>,  
Богачук А.П.<sup>5</sup>, Липкин В.М.<sup>5</sup>, Аутеншлюс А.И.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница № 1», г. Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

<sup>5</sup> ФГБУН «Государственный научный центр «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук», Москва, Россия

**Резюме.** Одним из перспективных направлений в терапии онкологических заболеваний является дифференцирующая терапия, направленная на использование агентов, повышающих степень дифференцировки опухолевых клеток и снижающих тем самым злокачественный потенциал неоплазмы. Одним из таких веществ является ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6. Ранее было установлено, что пептид способствует снижению относительного содержания низкодифференцированных клеток в биоптатах рака молочной железы. Однако механизмы влияния пептида на клет-

## Адрес для переписки:

Мангазеева Екатерина Дмитриевна  
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный  
медицинский университет» Министерства  
здравоохранения РФ  
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.  
Тел.: 8 (383) 226-35-60.  
E-mail: lpciip@211.ru

## Address for correspondence:

Ekaterina D. Mangazeeva  
Novosibirsk State Medical University  
52 Krasny Ave  
Novosibirsk  
630091 Russian Federation  
Phone: +7 (383) 226-35-60.  
E-mail: lpciip@211.ru

## Образец цитирования:

Е.Д. Мангазеева, А.А. Студеникина, Е.С. Михайлова,  
Д.В. Морозов, С.Л. Рыжикова, Ю.Г. Дружинина,  
А.В. Проскура, А.П. Богачук, В.М. Липкин,  
А.И. Аутеншлюс «Продукция цитокинов биоптатами  
инвазивной карциномы молочной железы  
неспецифического типа как критерий использования  
ацетил-амидной формы синтетического пептида  
HLDF-6 для дифференцирующей терапии рака  
молочной железы» // Медицинская иммунология, 2025.  
Т. 27, № 4. С. 739-748.  
doi: 10.15789/1563-0625-CPB-3147

© Мангазеева Е.Д. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

E.D. Mangazeeva, A.A. Studenikina, E.S. Mikhailova,  
D.V. Morozov, S.L. Ryzhikova, Yu.G. Druzhinina,  
A.V. Proskura, A.P. Bogachuk, V.M. Lipkin, A.I. Autenshlyus  
“Cytokine production by the bioplates of invasive non-  
specific breast carcinoma as a criterion for the use of acetyl-  
amide form of synthetic HLDF-6 peptide for differentiation  
therapy of breast cancer”, Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 4,  
pp. 739-748.  
doi: 10.15789/1563-0625-CPB-3147

© Mangazeeva E.D. et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-CPB-3147

ки опухоли и ее микроокружения остаются неизвестными. Не исключено, что вектором приложения действия пептида является его воздействие на функциональную активность опухоли. Целью исследования явилось изучение влияния ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на продукцию цитокинов биоптатами инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа. Проведен морфометрический анализ биоптатов, полученных у 40 женщин, больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа, до и после воздействия ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6. Для оценки эффекта от изучаемого пептида предложена оценка индекса влияния HLDF-6, выраженная в условных единицах (у. е.). Показатель ИВ-HLDF-6 0,9 у. е. и менее принят за значимый эффект. В зависимости от величины индекса, пациентки были разделены на две группы. Первую группу составили 27 человек со значимым эффектом от воздействия изучаемого пептида, вторую – 13 пациенток без значимого эффекта. Параллельно в супернатантах биоптатов до и после инкубации с изучаемым пептидом определяли концентрации TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , VEGF, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18 и IL-1 $\beta$  с помощью иммуноферментного метода. Индекс влияния ИВ-HLDF-6-cytokine, выраженный в условных единицах (у. е.), отражал влияние ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на продукцию цитокинов биоптатами опухоли. Исследование показало, что спонтанная продукция GM-CSF в первой группе достоверно ниже, чем во второй. Однако при воздействии исследуемого пептида концентрация этого цитокина значительно нарастает именно группе I по сравнению с группой II, о чем говорит статистически значимое различие в ИВ-HLDF-6-GM-CSF. По результатам ROC-анализа получено хорошее качество модели при изучении ИВ-HLDF-6-GM-CSF и относительного содержания низкодифференцированных клеток, что может послужить основой для использования этого показателя в качестве точки отсечки, используемой для отбора пациенток, которые могут являться кандидатами для дифференцирующей терапии ацетил-амидной формой синтетического пептида HLDF-6.

*Ключевые слова:* рак молочной железы, биоптаты, цитокины, молекулярно-биологические подтипы, клеточная дифференцировка, синтетический пептид HLDF-6

## CYTOKINE PRODUCTION BY THE BIOPTATES OF INVASIVE NON-SPECIFIC BREAST CARCINOMA AS A CRITERION FOR THE USE OF ACETYL-AMIDE FORM OF SYNTHETIC HLDF-6 PEPTIDE FOR DIFFERENTIATION THERAPY OF BREAST CANCER

Mangazeeva E.D.<sup>a, b</sup>, Studenikina A.A.<sup>a, b</sup>, Mikhailova E.S.<sup>a, b</sup>,  
Morozov D.V.<sup>c</sup>, Ryzhikova S.L.<sup>d</sup>, Druzhinina Yu.G.<sup>d</sup>, Proskura A.V.<sup>b</sup>,  
Bogachuk A.P.<sup>e</sup>, Lipkin V.M.<sup>e</sup>, Autenshlyus A.I.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>c</sup> City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>d</sup> JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>e</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Differentiation therapy is a promising direction in treatment of oncological diseases. It is based on usage of agents that increase the degree of tumour cell differentiation, and thereby reduce the malignant potential of the neoplasm. Such effects are shown for the acetyl-amide form of the synthetic peptide HLDF-6. The peptide was previously found to reduce the relative content of low-differentiated cells in breast cancer biopsy specimens. However, the mechanisms of the peptide's effect on tumour cells and its microenvironment remain

unknown. The effect of this peptide may be associated with altered functional activity of the tumour. The aim of our study was to investigate the effect of acetyl-amide form of synthetic HLDF-6 peptide on cytokine production by bioplates of invasive non-specific breast carcinoma. Morphometric analysis of bioplates obtained from 40 women with invasive breast carcinoma of nonspecific type before and after exposure to acetyl-amide form of synthetic peptide HLDF-6 was performed. To evaluate the effect of this peptide, we proposed an estimated index for HLDF-6 effect being expressed in conventional units (c. u.). The index of HLDF-6 influence of 0.9 c. u. and less is accepted as a significant effect. Depending on the index value, the patients were divided into two groups. The first group consisted of 27 patients with a significant effect of the studied peptide, the second group consisted of 13 patients without a significant effect. Concentrations of TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , VEGF, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18 and IL-1 $\beta$  were determined in parallel in supernatants of bioplates before and after incubation with the studied peptide using the enzyme immunoassay technique. The influence (effect) index, IE-HLDF-6-cytokine, expressed in conventional units (c. u.), reflected the effect of the acetyl-amide form of the synthetic HLDF-6 peptide on cytokine production by tumour bioplates. The study showed that spontaneous production of GM-CSF in the first group was significantly lower than in the second group. However, the concentration of this cytokine under the influence of HLDF-6 peptide significantly increases in group I in comparison with group II, as evidenced by statistically significant difference in IE-HLDF-6-cytokine. According to the results of ROC-analysis, a good model quality was obtained in the study of IE-HLDF-6-GM-CSF and relative content of low-differentiated cells, which may serve as a basis for using this index as a cut-off point used for selection of patients who may be candidates for differentiation therapy with acetyl-amide form of synthetic peptide HLDF-6.

*Keywords: breast cancer, tumor biopsies, cytokines, molecular subtypes, cell differentiation, synthetic peptide HLDF-6*

## Введение

Стадирование по TNM и гистологическая классификация являются хорошо известными и широко используемыми маркерами при выборе тактики лечения и определении прогноза у пациентов с онкологическими заболеваниями, в том числе и при раке молочной железы (РМЖ) [12]. Известно также, что степень дифференцировки клеток опухоли является важным показателем опухолевой прогрессии. Чем больше в опухоли низкодифференцированных клеток, тем большим злокачественным потенциалом она обладает [2, 7]. Поэтому одним из направлений в современной терапии злокачественных новообразований является поиск агентов, влияющих на дифференцировку опухолевых клеток [8]. Одним из таких веществ является ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6, представляющая собой химически синтезированный шестичленный фрагмент фактора дифференцировки клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека HLDF. Ранее в нашей лаборатории было показано влияние пептида на степень дифференцировки клеток инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (ИКНТ). Установлено, что ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6 способствует снижению относительного содержания низкодифференцированных клеток в биоптатах ИКНТ [1]. Однако остаются неизвестными механизмы влияния пептида на РМЖ.

Одним из векторов приложения действия дифференцирующего агента может стать его влияние на функциональную активность клеток опухоли и ее микроокружения. По данным литературы известна неоднозначная роль иммунной системы в противоопухолевом ответе организма [4]. Иммунный ответ с точки зрения прогрессирования опухолевого процесса может как ослаблять, так и усиливать инвазивность неоплазмы [9]. Клетки микроокружения и опухолевые клетки используют различные цитокины в качестве химических мессенджеров для обеспечения межклеточной коммуникации. Цитокины, действуя аутокринно или паракринно, участвуют в иммунном ответе в качестве провоспалительных либо противовоспалительных, а также про- и противоонкогенных эффекторов в зависимости от микроокружения. Различные типы цитокинов могут действовать по отдельности, потенцировать либо ослаблять действие друг друга, формировать цитокиновые сети, регулируя тем самым иммунные реакции, а следовательно, и злокачественную прогрессию [16].

**Цель исследования** — изучение продукции цитокинов биоптатами ИКНТ под влиянием ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6.

## Материалы и методы

Материалом исследования служили образцы ИКНТ II степени злокачественности 40 женщин в возрасте 33-87 лет, средний возраст 62 года, ко-

торым было проведено хирургическое лечение на базе маммологического отделения ГKB № 1 г. Новосибирска. В исследование включали пациенток, не имеющих отдаленных метастазов, обострений хронических заболеваний, а также без проведения неoadъювантной терапии. Сведения о стадировании по TNM и гистологической градации предоставлены патологоанатомом. Все пациентки имели размер опухоли T1-T2 и G2-дифференцировку опухоли.

Образцы опухолей объемом 8 мм<sup>3</sup>, полученные от каждой пациентки методом трепанобиопсии помещали в два флакона и инкубировали при температуре 37 °С в течение 72 ч. При этом первый флакон содержал только 1 мл питательной среды DMEM-F12. А во втором флаконе помимо 1 мл питательной среды DMEM-F12 содержалось 20 мкг ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6. После инкубирования образцы опухолей извлекали из среды и фиксировали в 10%-ном растворе формалина для проведения дальнейшего патогистологического исследования. Из зафиксированных в парафин образцов готовили серийные срезы толщиной 4-5 мкм, которые затем окрашивали гематоксилином-эозином. Исследование проводили с помощью световой микроскопии на базе микроскопа Micros MC 300A с использованием объектива ×40. Для проведения морфометрического анализа с использованием цифровой камеры CX 13c (Baumer Electric GmbH, Германия) и программного обеспечения ImageJ 1.42g (Национальный институт здоровья, США) получали 5 микрофотографий каждого образца (2 образца от каждой пациентки). Каждая микрофотография оценивалась с учетом Ноттингемской градирующей системы [14]. При этом такой показатель как относительное содержание низкодифференцированных клеток является самым значимым, поскольку он наиболее четко отражает степень злокачественности опухоли [2]. Низкодифференцированные клетки отличались выраженным ядерным полиморфизмом, высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, наличием большого количества патологических митозов. Для оценки эффекта ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 в каждой паре образцов рассчитывался индекс влияния изучаемого пептида равный отношению процента низкодифференцированных клеток после инкубации образцов с пептидом к проценту низкодифференцированных клеток без инкубации (ИБ-HLDF-6). ИБ-HLDF-6 выражен в условных единицах (у. е.). Значение ИБ-HLDF-6 0,9 у. е. и менее принято как выраженный эффект.

В соответствии с величиной ИБ-HLDF-6 пациентки были разделены на две группы. Первую группу составили 27 человек, у которых ИБ-

HLDF-6 ≤ 0,9 у. е., во вторую группу вошли 13 пациенток с ИБ-HLDF-6 > 0,9 у. е.

Для определения функциональной активности клеток опухоли и микроокружения в биоптатах обеих групп были определены спонтанная и индуцированная ацетил-амидной формой синтетического пептида HLDF-6 продукция цитокинов. Для этого после инкубирования и извлечения биоптатов (см. выше) клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 900 g и 25 °С. В полученных после осаждения клеток супернатантах при помощи наборов для твердофазного иммуноферментного анализа производства АО «Вектор-Бест» (Россия) определяли концентрацию следующих цитокинов: TNFα, IFNγ, VEGF, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18 и IL-1β. Индекс влияния ИБ-HLDF-6-cytokine, выраженный в условных единицах (у. е.), отражал влияние ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на продукцию цитокинов биоптатами опухоли. Показатель высчитывали по формуле: ИБ-HLDF-6-cytokine = А/Б, где А – концентрация цитокина в супернатанте биоптата при воздействии синтетического пептида HLDF-6, а Б – концентрация цитокина в супернатанте биоптата без его воздействия – спонтанная продукция цитокина (СП). Для статистической обработки результатов использовали программный пакет SPSS v22.0 for Windows. Анализ проведен с использованием непараметрического критерия U Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при p < 0,05. Показатели выражали в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Кроме того, проведен корреляционный анализ по Спирмену. Для определения точки отсчета концентрации цитокинов и оценки качества моделей использован ROC-анализ.

## Результаты

Корреляционные связи, полученные при изучении сопряженности относительного содержания низкодифференцированных клеток в изучаемых образцах со спонтанной и индуцированной ацетил-амидной формой синтетического пептида HLDF-6 продукцией цитокинов представлены в таблице 1. Так, в частности, установлено, что процент низкодифференцированных клеток после воздействия ацетил-амидной формы синтетического пептида находится в прямой корреляционной связи со спонтанной и стимулированной пептидом продукцией IL-6. Из данных литературы известно проонкогенное действие этого цитокина при РМЖ. Описана его способность потенцировать пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, а следовательно, прогрессию и метастазирование опухоли [6]. Обратная корреля-

**ТАБЛИЦА 1. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ СПОНТАННОЙ, СТИМУЛИРОВАННОЙ АЦЕТИЛ-АМИДНОЙ ФОРМОЙ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА HUMAN LEUKEMIA DIFFERENTIATION FACTOR (HLDF-6) ПРОДУКЦИЕЙ ЦИТОКИНОВ И ОТНОСИТЕЛЬНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМОЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

TABLE 1. CORRELATIONS BETWEEN SPONTANEOUS, STIMULATED BY ACETYL-AMIDE FORM OF A SYNTHETIC PEPTIDE HUMAN LEUKEMIA DIFFERENTIATION FACTOR (HLDF-6) CYTOKINE PRODUCTION AND THE RELATIVE CONTENT OF LOW-GRADE CELLS IN PATIENTS WITH INVASIVE CARCINOMA OF A NON-SPECIFIC TYPE OF BREAST

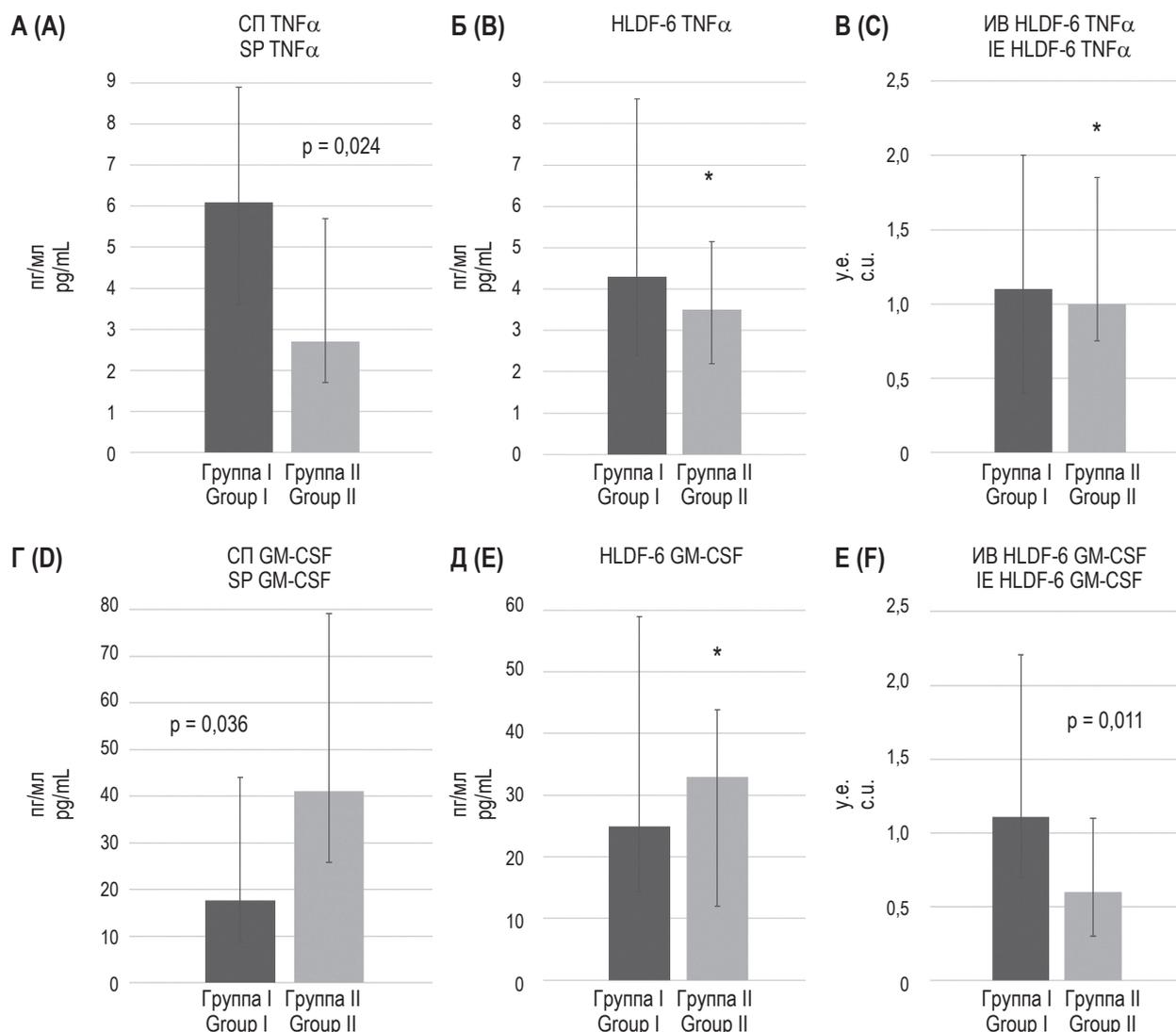
	<b>Исследуемые параметры</b> Investigated parameters	<b>Коэффициент корреляции r (p)</b> Correlation coefficient r (p)
<b>СП IL-17</b> Sp IL-17	<b>Относительное содержание низкодифференцированных клеток</b> Relative content of low-grade cells	0,477 (0,002)
<b>СП G-CSF</b> Sp-G-CSF		-0,627 (0,00001)
<b>СП IL-6</b> Sp-IL-6	<b>Относительное содержание низкодифференцированных клеток после инкубации с HLDF-6</b> Relative content of low-grade cells after incubation with HLDF-6	0,458 (0,003)
<b>СП IL-17</b> Sp-IL-17		0,453 (0,003)
<b>СП TNF<math>\alpha</math></b> Sp-TNF $\alpha$		-0,403 (0,009)
<b>HLDF-6 IL-6</b>		0,417 (0,007)
<b>HLDF-6 IL-8</b>		-0,411 (0,008)
<b>HLDF-6 TNF<math>\alpha</math></b>		-0,448 (0,003)

Примечание. Коэффициент ранговой корреляции рассчитывался по Спирмену.

Note. The rank correlation coefficient was calculated by Spearman.

ляционная связь наблюдается между относительным содержанием низкодифференцированных клеток после воздействия изучаемого пептида и спонтанной, а также индуцированной продукцией TNF $\alpha$ . Следует отметить, что анализ значений спонтанной продукции TNF $\alpha$  клетками опухоли и ее микроокружения у пациенток в исследуемых группах статистически значимо различался (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют об исходно более высокой концентрации данного цитокина в супернатанте опухоли у пациенток, которые положительно отвечали на воздействие дифференцирующего агента. Также исследование выявило статистически значимую разницу между спонтанной и стимулированной ацетил-амидной формой синтетического пептида HLDF-6 концентрацией GM-CSF. Так, спонтанная продукция гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора в первой группе была достоверно ниже, чем во второй. Однако при воздействии исследуемого пептида концентрация GM-CSF значительно возросла именно в группе I по сравнению с группой II, о чем говорит статистически значимое различие

в ИВ-HLDF-6-cytokine на продукцию этого цитокина. Такие результаты скорее всего отражают потенциал клеток опухоли и ее микроокружения к синтезу данного цитокина при воздействии дифференцирующего агента. Для выявления когорты пациенток, которым показано использование ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 в качестве дифференцирующей терапии, изучаемые группы были проанализированы более детально. В частности, произведена оценка каждой группы по принадлежности к тому или иному молекулярному подтипу РМЖ. В соответствии с действующими клиническими рекомендациями выбор терапевтической стратегии невозможен без определения молекулярного подтипа РМЖ. Выделяют 5 основных молекулярных подтипов РМЖ: люминальный А; люминальный В HER2-отрицательный; люминальный В HER2-положительный; HER2-положительный не люминальный и тройной негативный РМЖ [3]. Более того, известна интратуморальная неоднородность даже внутри одного молекулярного подтипа [15]. Эта черта наиболее характерна для нелюминальных, в частности для тройного



**Рисунок 1.** Спонтанная и стимулированная ацетил-амидной формой синтетического пептида Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF-6) продукция цитокинов, а также индекс влияния (ИБ-HLDF-6) на продукцию цитокинов биоптатами инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (ИКНТ) при различной реакции клеток опухоли на дифференцирующую активность HLDF-6

Примечание. \* – недостоверные различия ( $p \geq 0,05$ ); группа I – с реакцией на HLDF-6, группа II – без реакции на HLDF-6.

Figure 1. Spontaneous and stimulated by acetyl-amide form of synthetic peptide Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF-6) production of cytokines, as well as Indices of effect of the HLDF (IEHLDF-6) on the production of cytokines in biopates of invasive breast carcinoma of a nonspecific type (IBC NST) with different reactions of tumor cells to the differentiating activity of HLDF-6.

Note. \*, unreliable differences ( $p \geq 0.05$ ); group I, with reaction to HLDF-6; group II, without reaction to HLDF-6.

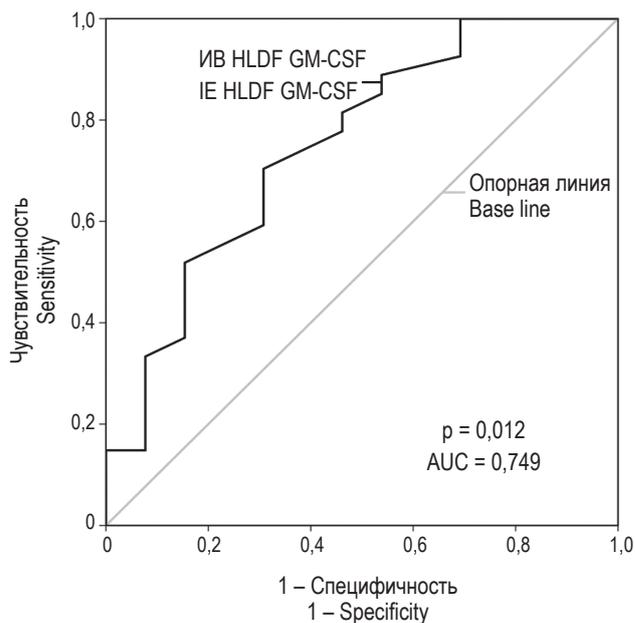
негативного РМЖ, что обуславливает его наибольшую злокачественность по сравнению с люминальными подтипами [10]. При анализе исследуемых групп по точному критерию Фишера обнаружено, что в группе I встречаемость люминальных форм РМЖ достоверно выше ( $p = 0,046$ ). Так, среди пациенток с эффектом от воздействия ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 в основном преобладали люминальные формы РМЖ: 24 из 27 пациенток в группе относились к люминальным подтипам, что составило 89%. В частности, 14 имели люминальный А,

9 – люминальный В HER2-отрицательный и 1 – люминальный В HER2-положительный подтип. Оставшиеся три пациентки отнесены к нелюминальным подтипам (2 – тройной негативный подтип и 1 HER2-положительный не люминальный подтип). Тогда как в группе пациенток, у которых ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6 не оказывала эффекта (13 пациенток), была более гетерогенной по составу молекулярных подтипов. Из 13 пациенток в группе I, 5 имели нелюминальный, а именно тройной негативный подтип, что составило 39%.

Оставшиеся 8 пациенток отнесены к люминальным подтипам: 4 с люминальным А и 4 с люминальным В HER2-отрицательным подтипом. Кроме того, были проанализированы группы по наличию метастатических очагов в регионарных лимфатических узлах. Оказалось, что по точному критерию Фишера ( $p = 0,047$ ) в группе с эффектом от влияния изучаемого пептида встречаемость пациенток без лимфогенного метастазирования была выше. Среди них преобладали пациентки без метастатических очагов в регионарных лимфатических узлах (21 из 27 пациенток, что составило 78%). Еще у 4 пациенток обнаруживалось поражение 1 регионарного лимфатического узла, и у 2 – поражение двух регионарных лимфатических узлов. Тогда как группа пациенток, у которых ацетил-амидная форма синтетического пептида HLDF-6 не оказывала эффекта, включала 6 из 13 пациенток с лимфогенным метастазированием, что составило 46%. Из них одиночный метастаз обнаружен у двух человек, 2 метастаза – у двух и более 4 метастазов – у двух человек. Еще у 7 пациенток не обнаруживалось поражения регионарных лимфатических узлов.

## Обсуждение

В ходе проведенного нами исследования было установлено, что влияние ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на ИКНТ неоднородно. В соответствии с полученными результатами эффект от воздействия пептида обусловлен принадлежностью РМЖ к тому или иному молекулярному подтипу, выраженностью лимфогенного метастазирования, а также функциональной активностью клеток опухоли и ее микроокружения. При изучении влияния ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на продукцию цитокинов у пациенток из группы с эффектом от воздействия изучаемого пептида по сравнению с группой без эффекта обнаружен потенциал к синтезу гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора GM-CSF при воздействии дифференцирующего агента, о чем свидетельствует статистически значимое изменение ИВ-HLDF-6-cytokine на продукцию этого цитокина. Роль GM-CSF в туморогенезе неоднозначна. Как следует из названия, этот цитокин способствует образованию нейтрофилов, макрофагов, моноцитов и дендритных клеток из гемопоэтических клеток предшественников. В то же время GM-CSF регулирует активность эпителиальных и эндотелиальных клеток. В свою очередь, этот цитокин продуцируется различными клетками в ответ на иммунные стимулы. Так, например, IL-10 подавляет выработку GM-CSF, тогда как IL-6, напротив, способствует синтезу



**Рисунок 2.** ROC-кривая, характеризующая качество ROC-модели при изучении индекса влияния ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 на продукцию GM-CSF (ИБ-HLDF-6-GM-CSF) и относительного содержания низкодифференцированных клеток в группе I (с эффектом от воздействия пептида)

Примечание. \* – значения площади под кривой (AUC): 0,9-1 – отличное качество модели; 0,8-0,9 – очень хорошее качество модели; 0,7-0,8 – хорошее качество модели; 0,6-0,7 – среднее качество модели; 0,5-0,6 – неудовлетворительное качество модели.

Figure 2. ROC curve characterizing the quality of the ROC model when studying the index of the influence of the acetyl-amide form of the synthetic peptide HLDF-6 on the production of GM-CSF (IE-HLDF-6-GM-CSF) and the relative content of low differentiated cells in group I (with the effect of influence of the peptide)

Note. \*, area under the curve (AUC) values: 0.9-1, excellent model quality; 0.8-0.9, very good quality of the model; 0.7-0.8, good quality model; 0.6-0.7, average quality of the model; 0.5-0.6, unsatisfactory quality of the model.

фактора [11]. Таким образом, в зависимости от формирующихся цитокиновых цепей GM-CSF может как усиливать, так и подавлять иммунный ответ при раке. В литературе описано прямое ингибирующее действие цитокина на стволовые раковые клетки, а также способность препятствовать ангиогенезу через воздействие на VEGF [4]. Имеются сведения об использовании данного цитокина в качестве вспомогательного средства в иммунотерапии РМЖ [13]. С целью определения точки отсчета ИВ-HLDF-6-GM-CSF как критерия для использования ацетил-амидной формы синтетического пептида HLDF-6 в качестве дифференцирующего агента при терапии РМЖ

был проведен ROC-анализ. При анализе ROC-кривых (AUC 0,749 – хорошее качество модели,  $p = 0,012$ ) обнаружено, что превышение установленных пороговых значений соответствовало наличию эффекта от воздействия изучаемого пептида, т. е. снижению относительного содержания низкодифференцированных клеток в образцах РМЖ, тогда как значения ниже пороговой отсечки – отсутствию эффекта пептида на процент низкодифференцированных клеток (рис. 2). Чувствительность показателя составила 70%, специфичность – 70%. На основании проведенных расчетов было предложено использование ИВ-HLDF-6-GM-CSF более 0,75 как показателя, применяемого для отбора когорты пациенток в качестве кандидаток для дифференцирующей терапии ацетил-амидной формой синтетического пептида HLDF-6.

## Заключение

Результаты настоящего исследования показали, что ацетил-амидная форма синтетиче-

ского пептида HLDF-6 оказывает выраженное дифференцирующее действие на клетки ИКНТ, что проявляется снижением относительного содержания низкодифференцированных клеток и изменением цитокинового спектра опухоли. Эффект пептида ассоциирован с принадлежностью опухоли к люминальным молекулярным подтипам, с отсутствием или минимальной выраженностью лимфогенного метастазирования, а также с потенциалом клеток опухоли и ее микроокружения к продукции GM-CSF. Проведенный ROC-анализ позволяет рассматривать индекс влияния HLDF-6 на продукцию GM-CSF (ИВ-HLDF-6-GM-CSF > 0,75) как потенциальный прогностический критерий эффективности применения пептида. Таким образом, полученные *in vitro* данные открывают перспективы для дальнейших *in vivo* исследований, направленных на оценку терапевтического эффекта HLDF-6 и обоснование его клинического применения в составе персонализированных схем лечения РМЖ.

## Список литературы / References

1. Аутеншлюс А.И., Жураковский И.П., Маринкин И.О., Богачук А.П., Липкин В.М. Средство, снижающее относительное содержание низкодифференцированных и повышающее относительное содержание высокодифференцированных клеток в инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа. Патент № 2786528 С1, 21.12.2022. [Autenshlus A.I., Zhurakovskiy I.P., Marinkin I.O., Bogachuk A.P., Lipkin V.M. A remedy that reduces the relative content of low-differentiated and increases the relative content of highly differentiated cells in invasive breast carcinoma of a non-specific type. Patent No. 2786528 C1, 21.12.2022].
2. Пауков В.С. Клиническая патология. М.: Литтерра, 2018. 768 с. [Paukov V.S. Clinical pathology]. Moscow: Litterra, 2018. 768 p.
3. Поспехова Н.И., Головина Д.А., Филиппова М.Г., Семьянихина А.В., Дранко С.Л., Данишевич А.М., Строганова А.М. Молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы у носителей мутаций в гене BRCA1 // Успехи молекулярной онкологии, 2020. Т. 7, № 4. С. 29-36. [Pospekhova N.I., Golovina D.A., Filippova M.G., Semyanikhina A.V., Dranko S.L., Danishevich A.M., Stroganova A.M. Molecular biological subtypes of breast cancer in brca1 mutation carriers. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2020, Vol. 7, no. 4, pp. 29-36. (In Russ.)]
4. Becher B., Tugues S., Greter M. GM-CSF: From growth factor to central mediator of tissue inflammation. *Immunity*, 2016, Vol. 4, no. 5, pp. 963-973.
5. Cruceriu D., Baldasici O., Balacescu O., Berindan-Neagoe I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell. Oncol. (Dordr.)*, 2020, Vol. 43, no. 1, pp. 1-18.
6. Erez N., Glanz S., Raz Y., Avivi C., Barshack I. Cancer Associated Fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, Vol. 437, no. 3, pp. 397-402.
7. Erić I., Petek Erić A., Kristek J., Koprivčić I., Babić M. Breast cancer in young women: pathologic and immunohistochemical features. *Acta Clin. Croat.*, 2018, Vol. 57, no. 3, pp. 497-502.
8. Fotinós J., Barberis L., Condat C.A. Effects of a differentiating therapy on cancer-stem-cell-driven tumors. *J. Theor. Biol.*, 2023, Vol. 572, 111563. doi: 10.1016/j.jtbi.2023.111563.
9. Habanjar O., Bingula R., Decombat C., Diab-Assaf M., Caldefie-Chezet F., Delort L. Crosstalk of inflammatory cytokines within the breast tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 4, 4002. doi: 10.3390/ijms24044002.
10. Howard F.M., Olopade O.I. Epidemiology of triple-negative breast cancer: a review. *Cancer J.*, 2021, Vol. 27, no. 1, pp. 8-16.
11. Kumar A., Taghi Khani A., Sanchez Ortiz A., Swaminathan S. GM-CSF: A double-edged sword in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 901277. doi: 10.3389/fimmu.2022.901277.
12. Li J., Chen Z., Su K., Zeng J. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 7, pp. 8500-8505.

13. Mihalik N.E., Steinberger K.J., Stevens A.M., Bobko A.A., Hoblitzell E.H., Tseytlin O., Akhter H., Dziadowicz S.A., Wang L., O'Connell R.C., Monaghan K.L., Hu G., Mo X., Khramtsov V.V., Tseytlin M., Driesschaert B., Wan E.C.K., Eubank T.D. Dose-specific intratumoral GM-CSF modulates breast tumor oxygenation and antitumor immunity. *J. Immunol.*, 2023, Vol. 211, no. 10, pp. 1589-1604.
14. Rakha E.A., Reis-Filho J.S., Baehner F., Dabbs D.J., Decker T., Eusebi V., Fox S.B., Ichihara S., Jacquemier J., Lakhani S.R., Palacios J., Richardson A.L., Schnitt S.J., Schmitt F.C., Tan P.H., Tse G.M., Badve S., Ellis I.O. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.*, 2010, Vol. 12, no. 4, 207. doi: 10.1186/bcr2607.
15. Turner K.M., Yeo S.K., Holm T.M., Shaughnessy E., Guan J.L. Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2021, Vol. 321, no. 2, pp. 343-354.
16. Yang Z., Zeng H., Li J., Zeng N., Zhang Q., Hou K., Li J., Yu J., Wu Y. Dissecting the emerging role of cancer-associated adipocyte-derived cytokines in remodeling breast cancer progression. *Heliyon*, 2024, Vol. 10, no.15, e35200. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e35200.

---

**Авторы:**

**Мангазеева Е.Д.** — младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; младший научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Студеникина А.А.** — к.м.н., старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Михайлова Е.С.** — научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Морозов Д.В.** — к.м.н., заведующий патологоанатомическим отделением ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница № 1», г. Новосибирск, Россия

**Рыжикова С.Л.** — начальник лаборатории цитокинов АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

**Дружинина Ю.Г.** — ведущий биотехнолог лаборатории цитокинов АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

**Проскура А.В.** — научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Mangazeeva E.D.**, Junior Researcher, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Junior Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Studenikina A.A.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Mikhailova E.S.**, Researcher, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Morozov D.V.**, PhD (Medicine), Head, Pathoanatomical Department, City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

**Ryzhikova S.L.**, Head, Cytokine Laboratory, JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russian Federation

**Druzhinina Yu.G.**, Leading Biotechnologist, Cytokine Laboratory, JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russian Federation

**Proskura A.V.**, Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

**Богачук А.П.** — к.х.н., инженер-исследователь лаборатории белков гормональной регуляции ФГБУН «Государственный научный центр “Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” Российской академии наук», Москва, Россия

**Липкин В.М.** — д.х.н., профессор, член-корр. РАН, главный научный сотрудник лаборатории белков гормональной регуляции ФГБУН «Государственный научный центр “Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” Российской академии наук», Москва, Россия

**Аутеншлюс А.И.** — д.б.н., профессор, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; главный научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

**Bogachuk A.P.**, PhD (Chemistry), Research Engineer, Laboratory of Hormonal Regulation Proteins, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Lipkin V.M.**, PhD, MD (Chemistry), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Laboratory of Hormonal Regulation Proteins, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Autenshlyus A.I.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Chief Researcher, Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 20.11.2024  
Отправлена на доработку 21.11.2024  
Принята к печати 23.03.2025

Received 20.11.2024  
Revision received 21.11.2024  
Accepted 23.03.2025

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННОЙ ЭНДОКРИНОТЕРАПИИ С CDK4/6-ИНГИБИТОРАМИ ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Султанбаев А.В.<sup>1, 2, 3</sup>, Тузанкина И.А.<sup>4, 5</sup>, Колядина И.В.<sup>6, 7</sup>,  
Насретдинов А.Ф.<sup>1</sup>, Мусин Ш.И.<sup>1</sup>, Султанбаева Н.И.<sup>1</sup>,  
Меньшиков К.В.<sup>1, 2, 3</sup>, Измайлов А.А.<sup>1</sup>, Султанбаев М.В.<sup>2</sup>, Кудлай Д.А.<sup>8, 9, 10</sup>

<sup>1</sup> ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ «Республиканский медико-генетический центр» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

<sup>4</sup> ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук», г. Екатеринбург, Россия

<sup>5</sup> ГАУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Россия

<sup>6</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>7</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>8</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

<sup>9</sup> ФГБУ «Государственный научный центр “Институт иммунологии” Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

<sup>10</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

**Резюме.** Люминальные (HR<sup>+</sup>) HER2<sup>-</sup> подтипы рака молочной железы (РМЖ) всегда привлекали онкологов эффективностью применения малотоксичной гормонотерапии. Появление ингибиторов циклин-зависимых киназ в арсенале противоопухолевой лекарственной терапии позволило полу-

### Адрес для переписки:

Султанбаев Александр Валерьевич  
ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан  
450054, Россия, Республика Башкортостан,  
г. Уфа, пр. Октября, 73/1.  
Тел.: 8 (965) 949-21-97.  
E-mail: rkodrb@yandex.ru

### Address for correspondence:

Aleksandr V. Sultanbaev  
Republican Clinical Oncology Dispensary  
73/1 Oktyabrya Ave  
Ufa, Republic of Bashkortostan  
450054 Russian Federation  
Phone: +7 (965) 949-21-97.  
E-mail: rkodrb@yandex.ru

### Образец цитирования:

А.В. Султанбаев, И.А. Тузанкина, И.В. Колядина, А.Ф. Насретдинов, Ш.И. Мусин, Н.И. Султанбаева, К.В. Меньшиков, А.А. Измайлов, М.В. Султанбаев, Д.А. Кудлай «Иммунологические аспекты эффективности комбинированной эндокринотерапии с CDK4/6-ингибиторами при распространенном HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> раке молочной железы» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 4. С. 749-760.  
doi: 10.15789/1563-0625-EOC-3199

© Султанбаев А.В. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

A.V. Sultanbaev, I.A. Tuzankina, I.V. Kolyadina, A.F. Nasretdinov, Sh.I. Musin, N.I. Sultanbaeva, K.V. Menshikov, A.A. Izmailov, M.V. Sultanbaev, D.A. Kudlay “Efficiency of combined endocrine therapy with CDK4/6 inhibitors in metastatic HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> breast cancer: Immunological aspects”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 4, pp. 749-760.  
doi: 10.15789/1563-0625-EOC-3199

© Sultanbaev A.V. et al., 2025  
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-EOC-3199

читать оптимальный контроль над опухолевой прогрессией, даже в случае висцерального поражения. Успехи в данной области сделали новую комбинированную эндокринотерапию (ЭТ) с CDK4/6-ингибиторами стандартом первой линии лечения распространенного HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> РМЖ. Оценка взаимосвязи опухолевой прогрессии и иммунного надзора чаще ассоциировались с тройным негативным подтипом, при котором отмечаются сравнительно большие уровни мутационной нагрузки и, как следствие, появление опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Однако данные некоторых исследований указывают на возможное влияние иммунных факторов на течение люминальных подтипов РМЖ. Основываясь на этих выводах, целью нашей работы стала оценка влияния различных иммунологических и клинических факторов на эффективность комбинированной ЭТ с CDK4/6-ингибиторами при метастатическом HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> РМЖ, в первую очередь в контексте оценки состояний дефицита иммунной системы по уровням эксцизионных колец Т-клеточного рецептора (TREC) и κ-делеционного элемента В-клеток (KREC). В исследование была включена 51 пациентка с люминальным HER2-негативным РМЖ, получившая комбинированную ЭТ с CDK4/6-ингибиторами в сочетании с эндокринным агентом. Результаты исследования указали на снижение уровней TREC с увеличением возраста пациенток. Был отмечен более низкий уровень TREC в периферической крови пациенток, которые имели худшие исходы лечения: низкий уровень ответа на терапию, быстрое прогрессирование или смертельный исход, а также отмечена значимая взаимосвязь летального исхода и низких уровней κ-делеционного элемента В-клеток (KREC), что говорит о важной роли данных иммунных факторов в прогнозе заболевания.

*Ключевые слова:* HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> рак молочной железы, CDK4/6-ингибиторы, эндокринотерапия мРМЖ, противоопухолевый иммунитет, TREC, KREC

## EFFICIENCY OF COMBINED ENDOCRINE THERAPY WITH CDK4/6 INHIBITORS IN METASTATIC HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> BREAST CANCER: IMMUNOLOGICAL ASPECTS

Sultanbaev A.V.<sup>a, b, c</sup>, Tuzankina I.A.<sup>d, e</sup>, Kolyadina I.V.<sup>f, g</sup>,  
Nasretidinov A.F.<sup>a</sup>, Musin Sh.I.<sup>a</sup>, Sultanbaeva N.I.<sup>a</sup>, Menshikov K.V.<sup>a, b, c</sup>,  
Izmailov A.A.<sup>a</sup>, Sultanbaev M.V.<sup>b</sup>, Kudlay D.A.<sup>h, i, j</sup>

<sup>a</sup> Republican Clinical Oncology Dispensary, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

<sup>b</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

<sup>c</sup> Republican Medical Genetic Center of Republic of Bashkortostan, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

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

<sup>e</sup> Sverdlovsk Region Regional Pediatric Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>f</sup> Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

<sup>g</sup> V. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

<sup>h</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

<sup>i</sup> State Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation

<sup>j</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Luminal HER2-negative subtypes of breast cancer have always attracted oncologists due to their sensitivity to low-toxicity hormone therapy. The emergence of new inhibitors of cyclin-dependent kinases has allowed hormone therapy to achieve optimal control of tumor growth, being prescribed even for visceral lesions. Recent advances in this area have provided novel mode of hormonal therapy as the first-line standard for extended HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> breast cancer. Evaluation of the relationship between tumor progression and immune surveillance was more often associated with the triple-negative subtype characterized by relatively high levels of mutational load and tumor-infiltrating lymphocytes. However, data from some studies suggest a possible

relationship between immunity and luminal types of breast cancer. On the basis of these conclusions, the aim of our work was to evaluate different immunological and clinical factors in view of effectiveness of combined endocrine therapy with CDK4/6 inhibitors in metastatic luminal HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> breast cancer, primarily in the context of assessing immune deficiency conditions by the levels of T-cell receptor excision circles (TREC) and κ-deletion element of B cells (KREC). The study included 51 patients with luminal HER2-negative breast cancer who received combined endocrine therapy with CDK4/6 inhibitors. The results of the study indicated a decrease in TREC levels with increasing patients' age. A decrease in the absolute number of TREC was noted in peripheral blood of patients with worse treatment outcomes, i.e., insufficient response to therapy, rapid progression or death, along with significant intercorrelation between lethal outcomes and low levels of B cell κ-deletion element (KREC) thus suggesting an important role of these immune factors in clinical prognosis. Hence, we consider prognostic significance of T cell receptor excision rings in the patients' peripheral blood. This factor may affect treatment outcomes and survival rates.

*Keywords:* HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> breast cancer, CDK4/6 inhibitors, endocrinotherapy, antitumor immunity, TREC, KREC

## Введение

Рак молочной железы (РМЖ) – сложное гетерогенное заболевание, определяемое активацией различных сигнальных путей в опухоли и наличием (или отсутствием) экспрессии соответствующих рецепторов в опухолевых клетках [7]. У больных с РМЖ в зависимости от индекса пролиферации, уровня экспрессии HER2 и гормональных рецепторов выделяют 5 суррогатных биологических подтипов заболевания, при этом в 65-70% случаев встречается люминальный (HR<sup>+</sup>) HER2<sup>-</sup> РМЖ [4, 6, 17]. В настоящее время применение комбинации гормонотерапии с ингибиторами циклин-зависимых киназ 4/6-го типа в лечении распространенного люминального HER2<sup>-</sup> РМЖ предпочтительной иницирующей стратегией лечения [7, 8].

Роль иммунной системы в реализации противоопухолевого ответа при РМЖ известна уже много лет [10, 24]. Для люминального рака характерна невысокая иммуногенность, что обусловлено низким количеством инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TILs) [11, 13]. Тем не менее исследования ряда авторов демонстрируют, что люминальный В-подтип РМЖ, в отличие от люминального А-подтипа, характеризуется более высоким уровнем мутационной нагрузки (ТМВ), уровнем TILs и наличием лигандов к рецептору программируемой клеточной смерти (PD-L1) [13, 15, 21, 23], что позволяет предположить влияние иммунных факторов на течение заболевания и прогноз.

В настоящее время активно изучается потенциал противоопухолевой активности коллаборации эндокринотерапии с иммунотерапией при HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> РМЖ; так, в исследовании II фазы I-SPY2 пациентам назначалась комбинация CDK4/6-ингибиторов и пембролизумаба с целью увеличения уровня объективного ответа [19]. Было продемонстрировано взаимное синергич-

ное усиление ответа как на CDK4/6-ингибиторы, так и на пембролизумаб; однако такая терапия приводила к развитию серьезных нежелательных явлений [12, 18, 20, 22].

Необходимо отметить, что кроме ТМВ и антигенной нагрузки в формировании специфического противоопухолевого иммунитета ключевая роль отводится Т-клеточным рецепторам. Маркером разнообразия репертуара рецепторов иммунокомпетентных клеток к различным антигенам являются эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора (TREC) и κ-делеционного элемента В-клеток (KREC), которые представляют собой внехромосомные структуры ДНК [14].

**Целью** данной работы явилась оценка влияния различных иммунологических и клинических факторов на эффективность комбинированной эндокринотерапии у больных с метастатическим люминальным HER2-негативным РМЖ.

## Материалы и методы

В исследование включена 51 пациентка с HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> мРМЖ в возрасте от 34 до 79 лет (медиана – 61 год). Распределение пациентов по характеру сайта метастазирования и биологическому подтипу РМЖ представлены в таблице 1.

Всем пациентам перед началом терапии CDK4/6-ингибитором (палбоциклибом) выполнялся забор венозной крови в вакуумную пробирку с калиевыми солями ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты). Для выделения РНК/ДНК из клинического материала использовался комплект реагентов «РИБО-преп», который предназначен для выделения тотальной РНК/ДНК из клинического материала для последующего анализа методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Количественный анализ TREC и KREC проводили с использованием набора реагентов «ИММУНО-БИТ» (ООО «АБВ-тест», Россия) методом поли-

**ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ ПО ХАРАКТЕРУ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ И СУРРОГАТНЫМ ПОДТИПАМ РМЖ**

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS BY THE NATURE OF METASTASIS AND SURROGATE SUBTYPES OF BREAST CANCER

Показатели Indicators	Категории Categories	Абсолютное количество пациентов (n) Absolute number of patients (n)	Доля пациентов от группы (%) Percentage of patients from the group (%)
<b>Суррогатные подтипы РМЖ</b> Surrogate subtypes of breast cancer	<b>Люминальный А</b> Luminal A	31	60,8
	<b>Люминальный В</b> Luminal B	20	39,2
<b>Висцеральные метастазы</b> Visceral metastases	<b>Имеются</b> Present	25	49,0
	<b>Отсутствуют</b> Absent	26	51,0
<b>Невисцеральные метастазы</b> Non-visceral metastases	<b>Имеются</b> Present	40	78,4
	<b>Отсутствуют</b> Absent	11	21,6
<b>Метастазы в печень</b> Liver metastases	<b>Имеются</b> Present	9	17,6
	<b>Отсутствуют</b> Absent	42	82,4
<b>Метастазы в легкие</b> Lung metastases	<b>Имеются</b> Present	18	35,3
	<b>Отсутствуют</b> Absent	33	64,7
<b>Метастазы в головной мозг</b> Brain metastases	<b>Имеются</b> Present	1	2,0
	<b>Отсутствуют</b> Absent	50	98,0
<b>Костные метастазы</b> Bone metastases	<b>Имеются</b> Present	27	52,9
	<b>Отсутствуют</b> Absent	24	47,1

меразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Использовался анализатор: амплификатор Real-time CFX96, Bio-Rad Laboratories, США. Детектирующий амплификатор ДТ-96, ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия. Аналитическая чувствительность тест-системы:  $1 \times 10^3$  копий/мл. Аналитическая специфичность тест-системы: 100%.

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с использованием программы StatTech v. 4.6.1 (разработчик – ООО «Статтех», Россия). Для оценки диагностической значимости количественных признаков при прогнозировании определенного исхода, применялся метод анализа ROC-кривых. Разделяющее значение количественного призна-

ка в точке cut-off определялось по наивысшему значению индекса Юдена. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

На фоне терапии комбинированной ЭТ с палбоциклибом прогрессирование заболевания зарегистрировано у 20 пациентов, медиана выживаемости без прогрессирования составила 18 месяцев; медиана ОВ – 24 месяца, умерло 11 из 51 пациентки. Показатели выживаемости и уровня эксцизионных колец рекомбинации участков ДНК представлены в таблице 2.

Максимальным ответом на фоне проводимой терапии был частичный и полный ответы (52,9 и

**ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСЦИЗИОННЫХ КОЛЕЦ И ВЫЖИВАЕМОСТИ**

TABLE 2. RESULTS OF DETERMINING THE LEVEL OF EXCISION RINGS AND SURVIVAL

Показатели Indicators	Медиана, Ме Median, Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$ $Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Абсолютное количество пациентов (n) Absolute number of patients (n)	Минимальное значение Minimum value	Максимальное значение Maximum value
<b>ВБП (месяц)</b> PFS (month)	18,00	9,00-30,50	51	3,00	96,00
<b>ОВ (месяц)</b> OS (month)	24,00	13,00-33,50	51	7,00	96,00
<b>TREC, копий/10<sup>5</sup> клеток</b> TREC, copies/10 <sup>5</sup> cells	17,83	4,12-52,19	51	0,00	197,33
<b>KREC, копий/10<sup>5</sup> клеток</b> KREC, copies/10 <sup>5</sup> cells	337,00	115,81-855,20	51	0,26	4751,55

**Примечание.**  $Q_{0,25}-Q_{0,75}$  – межквартильный интервал. \* – различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ ). ОВ – общая выживаемость; ВБП – выживаемость без прогрессирования.

Note.  $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ , interquartile range. \*, differences in indicators are statistically significant ( $p < 0.05$ ). OS, overall survival; PFS, progression-free survival.

9,8% соответственно), стабилизацию опухолевого процесса имели 29,4% больных, прогрессирование имели 7,8% больных (табл. 3).

При оценке связи TREC и возраста была установлена обратная корреляционная связь ( $\rho = -0,524$ ;  $p < 0,001$ ) (рис. 1). Наблюдаемая зависимость TREC от возраста описывается уравнением парной линейной регрессии:  $Y_{TREC} = -2,004 \times X_{\text{возраст}} + 156\,029$ . Из полученных результатов следует, что при увеличении возраста пациентки на 1 год следует ожидать уменьшение TREC на 2004 копий/10<sup>5</sup> клеток. Полученная модель объясняет 20,2% наблюдаемой дисперсии TREC. Полученные нами результаты подтверждают

уменьшение медианы уровня TREC с увеличением возраста пациентов, что отмечено другими авторами [1, 16].

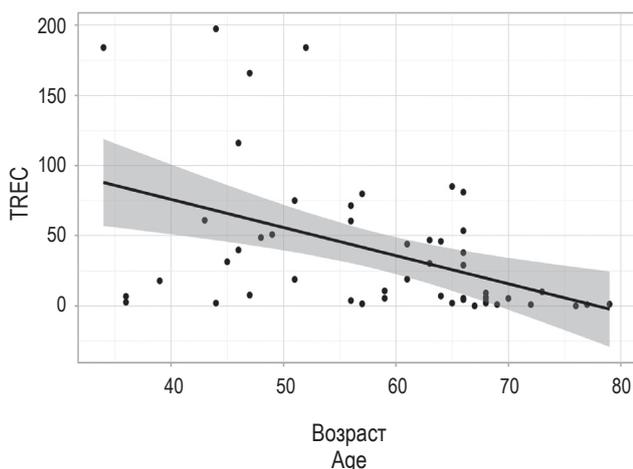
Был проведен корреляционный анализ взаимосвязи возраста и KREC. При оценке связи KREC и возраста в рассматриваемой группе пациенток связь отсутствовала.

При анализе зависимости уровня TREC и прогрессирования опухолевого процесса статистически значимой зависимости не выявлено ( $p = 0,370$ ) (табл. 4). При этом показатели более низкого уровня TREC у пациентов с прогрессированием опухолевого процесса (7,38 vs

**ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ ОТВЕТА НА КОМБИНИРОВАННУЮ ЭТ У ПАЦИЕНТОВ В ИССЛЕДОВАНИИ**

TABLE 3. RESPONSE RATES TO COMBINATION ET IN PATIENTS IN THE STUDY

Ответ на терапию Response to therapy	Абсолютное количество пациентов (n) Absolute number of patients (n)	Доля пациентов от группы (%) Proportion of patients from the group (%)	$M \pm m$ , 95% доверительный интервал $M \pm m$ , 95% confidence interval
<b>Полный ответ</b> Complete response	5	9,8	3,3-21,4
<b>Частичный ответ</b> Partial response	27	52,9	38,5-67,1
<b>Стабилизация</b> Stabilization	15	29,4	17,5-43,8
<b>Прогрессия</b> Progression	4	7,8	2,2-18,9



**Рисунок 1. График регрессионной функции, характеризующий зависимость TREC (копий/10<sup>5</sup> клеток – ось ординат) от возраста (лет – ось абсцисс)**

Figure 1. Graph of the regression function characterizing the dependence of TREC (copies/10<sup>5</sup> cells, ordinate axis) on age (years, abscissa axis)

30,27) могут свидетельствовать о наличии у них Т-клеточного иммунодефицита.

Выполнена оценка зависимости вероятности прогрессии от уровня TREC с помощью ROC-анализа. Площадь под ROC-кривой составила  $0,575 \pm 0,082$  с 95% ДИ: 0,415-0,735. Полученная модель не была статистически значимой ( $p = 0,370$ ). Пороговое значение TREC в точке cut-off, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена, составило 19000 копий/10<sup>5</sup> клеток, а прогрессию заболевания следует прогнозировать при значении TREC ниже данной величины. Чувствительность и специфичность модели составили 70,0 и 58,1% соответственно.

При оценке зависимости уровня TREC и летальности больных была отмечена тенденция более низких показателей медианы TREC у умерших пациентов по сравнению с живыми (5,35 vs 24,  $p = 0,067$ ) (табл. 5). Полученные результаты демонстрируют, что в группе умерших пациенток чаще наблюдалась иммуносупрессия, которая значительно ограничивает вероятность форми-

**ТАБЛИЦА 4. АНАЛИЗ TREC В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАКТА ПРОГРЕССИРОВАНИЯ БОЛЕЗНИ**

TABLE 4. TREC ANALYSIS DEPENDING ON THE FACT OF DISEASE PROGRESSION

Показатель Indicator	Категории Categories	TREC, копий/10 <sup>5</sup> клеток TREC, copies/10 <sup>5</sup> cells			p
		Медиана, Me Median, Me	Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub>	Абсолютное количество пациентов (n) Absolute number of patients (n)	
Прогрессирование опухолевого процесса Tumor progression	Отсутствует No	30,27	4,88-60,73	31	0,370
	Есть yes	7,38	3,49-40,61	20	

Примечание. Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub> – межквартильный интервал.

Note. Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>, interquartile range.

**ТАБЛИЦА 5. АНАЛИЗ TREC И ЛЕТАЛЬНОСТЬ ПАЦИЕНТОВ**

TABLE 5. TREC ANALYSIS AND PATIENT MORTALITY

Категории Categories	TREC, копий/10 <sup>5</sup> клеток TREC, copies/10 <sup>5</sup> cells			p
	Медиана, Me Median, Me	Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub>	Абсолютное количество пациентов (n) Absolute number of patients (n)	
Жив Alive	24,00	5,38-60,61	40	0,067
Умер Dead	5,35	1,35-22,48	11	

Примечание. Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub> – межквартильный интервал.

Note. Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>, interquartile range.

рования специфического противоопухолевого иммунитета.

Нами также выполнена оценка зависимости риска смерти от уровня TREC с помощью ROC-анализа. Площадь под ROC-кривой составила  $0,682 \pm 0,084$  с 95% ДИ: 0,516-0,847. Полученная модель не была статистически значимой ( $p = 0,067$ ). Пороговое значение TREC в точке cut-off, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена, составило 7,710 копий/ $10^5$  клеток. Смерть пациенток следует прогнозировать при значении уровня TREC ниже данной величины. Чувствительность и специфичность модели составили 72,7 и 67,5% соответственно.

При оценке уровня TREC в зависимости от ответа на терапию не удалось выявить статисти-

чески значимых различий ( $p = 0,488$ ). При этом необходимо отметить, что чем выше медиана уровня TREC, тем лучше объективный ответ на проводимую терапию, что может указывать на важную роль иммунной системы в формировании объективного ответа при распространенном РМЖ. Максимальный уровень медианы TREC (45,95) имели пять больных с полным ответом на комбинированную ЭТ, а минимальный (9,19) – 4 пациента с прогрессированием опухолевого процесса (табл. 6).

При сопоставлении уровня KREC в зависимости от ответа на терапию не удалось выявить статистически значимых различий ( $p = 0,304$ ). При этом максимально высокий показатель медианы KREC (458,11) имели пациенты без прогрессирования, в то время как у больных с прогрессирова-

ТАБЛИЦА 6. АНАЛИЗ TREC В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ

TABLE 6. TREC ANALYSIS DEPENDING ON THE RESPONSE TO THERAPY

Ответ на терапию Response to therapy	TREC, копий/ $10^5$ клеток TREC, copies/ $10^5$ cells			p
	Медиана, Me Median, Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$ $Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Абсолютное количество пациентов (n) Absolute number of patients (n)	
Полный ответ Complete response	45,97	30,27-81,00	5	0,488
Частичный ответ Partial response	17,83	4,56-51,09	27	
Стабилизация Stabilization	9,24	1,74-62,92	15	
Прогрессирование Progression	9,19	6,09-12,71	4	

Примечание. ПО – полный ответ;  $Q_{0,25}-Q_{0,75}$  – межквартильный интервал.

Note. CR, complete response;  $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ , interquartile range.

ТАБЛИЦА 7. АНАЛИЗ KREC В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА

TABLE 7. KREC ANALYSIS DEPENDING ON TUMOR PROGRESSION

Показатель Indicator	KREC, копий/ $10^5$ клеток KREC, copies/ $10^5$ cells			p
	Медиана, Me Median, Me	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$ $Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Абсолютное количество пациентов (n) Absolute number of patients (n)	
Нет прогрессии No progression	458,11	206,19-1033,01	31	0,014*
Прогрессия Progression	158,87	74,29-332,57	20	

Примечание.  $Q_{0,25}-Q_{0,75}$  – межквартильный интервал. \*, различия показателей статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Note.  $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ , interquartile range. \*, differences in indicators are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

ТАБЛИЦА 8. АНАЛИЗ KREC В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СМЕРТИ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 8. KREC ANALYSIS ACCORDING TO PATIENT DEATH

Показатель Indicator	KREC, копий/10 <sup>5</sup> клеток KREC, copies/10 <sup>5</sup> cells			p
	Me	Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub>	n	
Жив Alive	379,16	132,65-954,74	40	0,216
Умер Died	178,88	98,91-435,08	11	

нием уровень KREC был в 3 раза ниже (158,87), различия высоко значимы,  $p = 0,014$  (табл. 7).

Выполнена оценка зависимости вероятности прогрессия от KREC с помощью ROC-анализа. Площадь под ROC-кривой составила  $0,705 \pm 0,073$  с 95% ДИ: 0,563-0,847. Полученная модель была статистически значимой ( $p = 0,014$ ). Пороговое значение KREC в точке cut-off, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена, составило 201670 копий/10<sup>5</sup> клеток. Прогрессию следует прогнозировать при значении KREC ниже данной величины. Чувствительность и специфичность модели составили 70,0 и 77,4% соответственно. Полученные данные демонстрируют выраженную иммуносупрессию у больных с прогрессией заболевания, что обусловлено в том числе и негативным воздействием опухолевой ткани на специфический гуморальный иммунитет.

При анализе KREC и летальности пациентов удалось выявить статистически значимых различий ( $p = 0,216$ ) (табл. 8).

Выполнена оценка зависимости смерти от уровня KREC с помощью ROC-анализа. Площадь под ROC-кривой составила  $0,623 \pm 0,091$  с 95% ДИ: 0,444-0,801. Полученная модель не была статистически значимой ( $p = 0,216$ ). Пороговое значение KREC в точке cut-off, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена, составило 185,250. Смерть прогнозировалась при значении KREC ниже данной величины. Чувствительность и специфичность модели составили 72,7% и 70,0% соответственно.

## Обсуждение

Комбинированная ЭТ с CDK4/6-ингибиторами является приоритетной иницирующей линией лечения больных с распространенным HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> РМЖ. При этом развитие эндокринорезистентности на фоне такой терапии представляет собой нетривиальную задачу для выбора дальнейшей лечебной стратегии [7, 9, 17]. Исследование роли различных иммунных маркеров,

таких как TREC и KREC, в предсказании ответа на лечение и оценку прогноза заболевания представляет значительный клинический интерес.

Люминальный HER2-негативный РМЖ традиционно считался злокачественной опухолью с низкой иммуногенностью. Однако исследования последних лет подвергли данный постулат сомнению, а поиск новых иммунных предикторов развития ответа является актуальным и своевременным [2, 3, 5].

Результаты нашего исследования показали важные связи между уровнями эксцизионных колец Т-клеточного рецептора (TREC) и к-делеционного элемента В-клеток (KREC) с клиническими исходами, что говорит о негативной роли клеточного и гуморального иммунодефицита в прогнозе заболевания у больных с распространенным HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> РМЖ. Установление пороговых значений TREC, ниже которых значительно возрастает риск прогрессирования и смерти, может стать основой для выбора персонализированного подхода к терапии. Использование маркеров, таких как TREC и KREC, в качестве прогностических индикаторов представляет собой многообещающий подход, который может помочь в селекции пациентов для более агрессивного или альтернативного лечения.

Из полученных нами результатов следует, что у больных РМЖ на фоне комбинированной ЭТ с CDK4/6-ингибиторами снижение количества TREC в крови может свидетельствовать о наличии иммунодефицита. Представленные данные указывают на возможность использования метода определения уровня TREC для прогнозирования риска прогрессии и смерти. На фоне терапии палбоциклибом распространенного HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> РМЖ отмечается численное снижение медианы концентрации эксцизионных колец Т-клеточного рецептора при прогрессировании опухолевого процесса, что указывает на Т-клеточный иммунодефицит. Кроме того, отмечена значимая взаимосвязь летального исхода и низких уровней к-делеционного элемента

В-клеток (KREC), что говорит о важной роли гуморального иммунитета в прогнозе заболевания.

Современные подходы лечения РМЖ требуют более глубокого понимания иммунологических взаимоотношений между опухолью и организмом в целом. Данное исследование приближает понимание происходящих иммунологических изменений у пациентов при назначении различных схем противоопухолевой лекарственной терапии и патогенетическое обоснование их использования для активации противоопухолевого иммунитета.

## Заключение

В данной работе впервые представлены результаты исследования уровня TREC у больных с метастатическим РМЖ, определена прогностическая значимость уровня эксцизионных колец Т-клеточного рецептора и κ-делеционного элемента В-клеток (KREC). Дальнейшее развитие иммуноонкологии позволит учитывать изменения показателей TREC и KREC в динамике и использовать прогностическое значение этих изменений на результаты лечения и показатели выживаемости.

## Список литературы / References

1. Давыдова Н.В., Продеус А.П., Образцов И.В., Кудлай Д.А., Корсунский И.А. Референсные значения концентрации TREC и KREC у взрослых // *Врач*, 2021. Т. 32, № 6. С. 21-28. [Davydova N.V., Prodeus A.P., Obratsov I.V., Kudlay D., Korsunsky I.A. Reference values for TREC and KREC concentrations in adults. *Vrach = The Doctor*, 2021, Vol. 32, no. 6, pp. 21-28. (In Russ.)]
2. Колядина И.В. По следам SABCS 2022: TOP-12 исследований по распространенному раку молочной железы, которые могут изменить нашу клиническую практику // *Современная онкология*, 2023. Т. 25, № 1. С. 46-54. [Kolyadina I.V. Following in the footsteps of SABCS 2022: top 12 advanced breast cancer studies that could change our clinical practice: A review. *Sovremennaya onkologiya = Journal of Modern Oncology*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 46-54. (In Russ.)]
3. Колядина И.В. По следам SABCS 2022: TOP-16 исследований по раннему раку молочной железы, которые могут изменить нашу клиническую практику // *Современная онкология*, 2023. Т. 25, № 1. С. 35-45. [Kolyadina I.V. Following in the footsteps of SABCS 2022: top 16 early breast cancer studies that could change our clinical practice: A review. *Sovremennaya onkologiya = Journal of Modern Oncology*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 35-45. (In Russ.)]
4. Колядина И.В. Эскалация адъювантной эндокринотерапии раннего гормонозависимого HER2-отрицательного рака молочной железы: кому, когда и зачем? // *Опухоли женской репродуктивной системы*, 2024. Т. 20, № 1. С. 89-103. [Kolyadina I.V. Escalation of adjuvant endocrine therapy for early hormone-dependent HER2-negative breast cancer: to whom, when and why? *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy = Tumors of Female Reproductive System*, 2024, Vol. 20, no. 1, pp. 89-103. (In Russ.)]
5. Морозов Д.А., Колядина И.В., Поддубная И.В., Чумаков П.М., Ганьшина И.П., Хохлова С.В., Кометова В.В., Родионов В.В. Взаимосвязь TILs в биопсийном материале и класса остаточной опухолевой нагрузки RCB после неoadъювантной химиотерапии у больных с агрессивными подтипами рака молочной железы II-III стадии. // *Вопросы онкологии*, 2022. Т. 68, № S3. С. 370-371. [Morozov D.A., Kolyadina I.V., Poddubnaya I.V., Chumakov P.M., Ganshina I.P., Khokhlova S.V., Kometova V.V., Rodionov V.V. Relationship between TILs in biopsy material and the class of residual tumor load rcb after neoadjuvant chemotherapy in patients with aggressive subtypes of stage II-III breast cancer. *Voprosy onkologii = Issues of Oncology*, 2022, Vol. 68, no. S3, pp. 370-371. (In Russ.)]
6. Новикова Е.А., Крохалев В.Я., Костромина О.В., Демидов С.М., Сазонов С.В. Возрастные особенности распределения частоты встречаемости люминального А молекулярно-биологического подтипа рака молочной железы // *Вестник уральской медицинской академической науки*, 2021. Т. 18, №1. С. 35-42. [Novikova E.A., Krokholev V.Y., Kostromina O.V., Demidov S.M., Sazonov S.V. Age-Related Features of the Distribution of the Frequency of Occurrence of Luminal A Molecular-Biological Subtype of Breast Cancer. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*, 2021, Vol. 18, no. 1, pp. 35-42. (In Russ.)]
7. Семиглазов В.Ф., Криворотько П.В., Семиглазова Т.Ю., Артамонова Е.В., Артемьева А.С., Багрова С.Г., Болотина Л.В., Бит-Сава Е.М., Божок А.А., Владимиров Л.Ю., Горбунова В.А., Геокчан-Кждрян А.К., Деньгина Н.В., Жукова Л.Г., Закиряходжаев А.Д., Имянитов Е.Н., Колядина И.В., Королева И.А., Кудайбергенова А.Г., Манихас А.Г., Новиков С.Н., Орлова Р.В., Палтуев Р.М., Петровский А.В., Пароконная А.А., Портной С.М., Раскин Г.А., Родионов В.В., Савелов Н.А., Семиглазов В.В., Стенина М.Б., Смагулова К.К., Строяковский Д.Л., Топузов Э.Э., Трофимова О.П., Фролова М.А., Ходорович О.С., Шатова Ю.С. I Санкт-Петербургский международный консенсус по диагностике и лечению рака молочной железы «Белые ночи 2024» // *Вопросы онкологии*, 2024. Т. 70. № 6. С. 1175-1188. [Semiglazov V.F.,

Krivorotko P.V., Semiglazova T.Y., Artamonova E.V., Artemyeva A.S., Bagrova S.G., Bolotina L.V., Bit-Sava E.M., Bozhok A.A., Vladimirova L.Yu., Gorbunova V.A., Geokchyan-Kzhdryan A.K., Dengina N.V., Zhukova L.G., Zakiryakhodzhaev A.D., Imyanitov E.N., Kolyadina I.V., Koroleva I.A., Kudaibergenova A.G., Manikhas A.G., Novikov S.N., Orlova R.V., Paltuev R.M., Petrovsky A.V., Parokonnaya A.A., Portnoy S.M., Raskin G.A., Rodionov V.V., Savelov N.A., Semiglazov V.V., Stenina M.B., Smagulova K.K., Stroyakovskiy D.L., Topuzov E.E., Trofimova O.P., Frolova M.A., Khodorovich O.S., Shatova Yu.S. I St. Petersburg International Consensus on the Diagnosis and Treatment of Breast Cancer “White Nights 2024”. *Voprosy onkologii = Issues of Oncology*, Vol. 70, no. 6, pp. 1175-1188. (In Russ.)]

8. Султанбаев А.В., Колядина И.В., Насретдинов А.Ф., Меньшиков К.В., Аскарров В.Е., Мусин Ш.И., Ахматгареева К.Т., Султанбаева Н.И., Забелин В.М., Аюпов Р.Т., Измайлов А.А. Палбоциклиб в реальной клинической практике: результаты одноцентрового наблюдательного исследования // Медицинский совет, 2024. Т. 18, № 21. С. 42-50. [Sultanbaev A.V., Kolyadina I.V., Nasretdinov A.F., Menshikov K.V., Askarov V.E., Musin S.I., Akhmetgareeva K.T., Sultanbaeva N.I., Zabelin V.M., Ayupov R.T., Izmailov A.A. Palbociclib in real clinical practice: Results of a single-center observational study. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2024, Vol. 18, no. 21, pp. 42-50. (In Russ.)]

9. Султанбаев А.В., Колядина И.В., Меньшиков К.В., Мусин Ш.И., Насретдинов А.Ф., Султанбаева Н.И., Рахимов Р.Р., Липатов Д.О., Меньшикова И.А., Измайлов А.А., Липатова Е.Е. Эффективность и безопасность алпелисиба у больных с HR+ HER2-негативным метастатическим раком молочной железы в реальной клинической практике: результаты одноцентрового ретроспективного исследования // Современная онкология, 2024. Т. 26, № 1. С. 65-72. [Sultanbaev A.V., Kolyadina I.V., Menshikov K.V., Musin Sh.I., Nasretdinov A.F., Sultanbaeva N.I., Rakhimov R.R., Lipatov D.O., Menshikova I.A., Izmailov A.A., Lipatova E.E. Efficacy and safety of alpelisib in patients with HR+ HER2-negative metastatic breast cancer in real clinical practice: Results of a single-center observational retrospective study. *Sovremennaya onkologiya = Journal of Modern Oncology*, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 65-72. (In Russ.)]

10. Султанбаев А.В., Тузанкина И.А., Мусин Ш.И., Колядина И.В., Меньшиков К.В., Султанбаев М.В., Гилязова И.Р., Кудлай Д. Специфический противоопухолевый иммунитет и механизмы ускользания опухоли от иммунологического надзора // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена, 2024. Т. 13, № 6. С. 70-77. [Sultanbaev A.V., Tuzankina I.A., Musin Sh.I., Kolyadina I.V., Menshikov K.V., Sultanbaev M.V., Gilyazova I.R., Kudlay D.A. Specific antitumour immunity and mechanisms of tumour escape from immunological surveillance. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A. Gertsena = P.A. Herzen Journal of Oncology*, 2024, Vol. 13, no. 6, pp. 70-77. (In Russ.)]

11. Cha S.M., Park J.W., Lee Y.J., Lee H.J., Lee H., Lee I.W., Gong G., Park S.H., Lee H J., Jeong, B.K. SPP1+ macrophages in HR+ breast cancer are associated with tumor-infiltrating lymphocytes. *NPJ Breast Cancer*, 2024, Vol. 10, no. 1, 83. doi: 10.1038/s41523-024-00695-7.

12. Goel S., DeCristo M.J., Watt A.C., BrinJones H., Sceneay J., Li B.B., Khan N., Ubellacker J.M., Xie S., Metzger-Filho O., Hoog J., Ellis M.J., Ma C.X., Ramm S., Krop I.E., Winer E.P., Roberts T.M., Kim H.J., McAllister S.S., Zhao J.J. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature*, 2017, Vol. 548, no. 7668, pp. 471-475.

13. Goldberg J., Pastorello R.G., Vallius T., Davis J., Cui Y.X., Agudo J., Waks A.G., Keenan T., McAllister S.S., Tolanev S.M., Mittendorf E.A., Guerriero J.L. The Immunology of Hormone Receptor Positive Breast Cancer. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 674192. doi: 10.3389/fimmu.2021.674192.

14. Hoolehan W., Harris J.C., Byrum J.N., Simpson D.A., Rodgers K.K. An updated definition of V(D)J recombination signal sequences revealed by high-throughput recombination assays. *Nucleic Acids Res.*, 2022, Vol. 50, no. 20, pp. 11696-11711.

15. Hrubesz G., Leigh J., Ng T.L. Understanding the relationship between breast cancer, immune checkpoint inhibitors, and gut microbiota: a narrative review. *Transl. Breast Cancer Res.*, 2024, Vol. 5, 31. doi: 10.21037/tbcr-24-14.

16. Kwok J.S.Y., Cheung S.K.F., Ho J.C.Y., Tang I.W.H., Chu P.W.K., Leung E.Y.S., Lee P.P.W., Cheuk D.K.L., Lee V., Ip P., Lau Y.L. Establishing Simultaneous T Cell Receptor Excision Circles (TREC) and K-Deleting Recombination Excision Circles (KREC) Quantification Assays and Laboratory Reference Intervals in Healthy Individuals of Different Age Groups in Hong Kong. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1411. doi: 10.3389/fimmu.2020.01411.

17. Loibl S., Poortmans P., Morrow M., Denkert C., Curigliano G. Breast cancer. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10286, pp. 1750-1769.

18. Masuda J., Sakai H., Tsurutani J., Tanabe Y., Masuda N., Iwasa T., Takahashi M., Futamura M., Matsumoto K., Aogi K., Iwata H., Hosonaga M., Mukohara T., Yoshimura K., Imamura C.K., Miura S., Yamochi T., Kawabata H., Yasojima H., Tomioka N., Takano T. Efficacy, safety, and biomarker analysis of nivolumab in combination with abemaciclib plus endocrine therapy in patients with HR-positive HER2-negative metastatic breast cancer: a phase II study (WJOG11418B NEWFLAME trial). *J. Immunother. Cancer*, 2023, Vol. 11, no. 9, e007126. doi: 10.1136/jitc-2023-007126.

19. Nanda R., Liu M.C., Yau C., Asare S., Hylton N., Van't Veer L., Perlmutter J., Wallace A.M., Chien A.J., Forero-Torres A., Ellis E., Han H., Clark A.S., Albain K.S., Boughey J.C., Elias A.D., Berry D.A., Yee D., DeMichele A.,

Esserman L. Pembrolizumab plus standard neoadjuvant therapy for high-risk breast cancer (BC): Results from I-SPY 2. *J. Clin. Oncol.*, 2017, Vol. 35, no. 15 Suppl., 506. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.506.

20. Rugo H.S., Kabos P., Beck J.T., Jerusalem G., Wildiers H., Sevillano E., Paz-Ares L., Chisamore M.J., Chapman S.C., Hossain A.M., Chen Y., Tolaney S.M. Abemaciclib in combination with pembrolizumab for HR+, HER2- metastatic breast cancer: Phase 1b study. *NPJ Breast Cancer*, 2022, Vol. 8, no. 1, 118. doi: 10.1038/s41523-022-00482-2.

21. Savas P., Salgado R., Denkert C., Sotiriou C., Darcy P.K., Smyth M.J., Loi S. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2016, Vol. 13, no. 4, pp. 228-241.

22. Schaefer D.A., Beckmann R.P., Dempsey J.A., Huber L., Forest A., Amaladas N., Li Y., Wang Y.C., Rasmussen E.R., Chin D., Capen A., Carpenito C., Staschke K.A., Chung L.A., Litchfield L.M., Merzoug F.F., Gong X., Iversen P.W., Buchanan S., de Dios A., Novosiadly R.D., Kalos M. The CDK4/6 inhibitor abemaciclib induces a T cell inflamed tumor microenvironment and enhances the efficacy of PD-L1 checkpoint blockade. *Cell Rep.*, 2018, Vol. 22, no. 11, pp. 2978-2994.

23. Stanton S.E., Adams S., Disis M.L. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol.*, 2016, Vol. 2, no. 10, pp. 1354-1360.

24. Sultanbaev A.V., Kolyadina I.V., Sultanbaev M., Musin Sh., Menshikov K., Sultanbaeva N., Kudlay D., Tuzankina I. Options for enhancing specific antitumor immunity in patients with melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2024, Vol. 42, no. 16 Suppl., e21547. doi: 10.1200/JCO.2024.42.16\_suppl.e21547.

---

**Авторы:**

**Султанбаев А.В.** — к.м.н., доцент кафедры педагогики и психологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующий отделом противоопухолевой лекарственной терапии ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан; врач-онколог ГБУЗ «Республиканский медико-генетический центр» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

**Тузанкина И.А.** — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук»; главный детский иммунолог Министерства здравоохранения Свердловской области, г. Екатеринбург, Россия

**Коядина И.В.** — д.м.н., профессор кафедры онкологии и паллиативной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации; ведущий научный сотрудник отделения противоопухолевой лекарственной терапии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Насретдинов А.Ф.** — врач-онколог заведующий отделением противоопухолевой лекарственной терапии № 2 ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

**Мусин Ш.И.** — к.м.н., заведующий хирургическим отделением № 6 ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

---

**Authors:**

**Sultanbaev A.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pedagogics and Psychology, Bashkir State Medical University; Head, Department of Antitumor Drug Therapy, Republican Clinical Oncology Dispensary; Clinical Oncologist, Republican Medical Genetic Center of Republic of Bashkortostan, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

**Tuzankina I.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Chief Researcher, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Chief Pediatric Immunologist Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, Russian Federation

**Kolyadina I.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Oncology and Palliative Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education; Professor, Leading Researcher, Department of Antitumor Drug Therapy, V. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

**Nasretdinov A.F.**, Clinical Oncologist, Head, Department of Antitumor Drug Therapy No. 2, Republican Clinical Oncology Dispensary, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

**Musin Sh.I.**, PhD (Medicine), Head, Surgical Department No. 6, Republican Clinical Oncology Dispensary, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

**Султанбаева Н.И.** — врач-онколог отделения противоопухолевой лекарственной терапии № 1 ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

**Меньшиков К.В.** — к.м.н., доцент кафедры онкологии с курсами онкологии и патологической анатомии Института дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач-онколог отдела химиотерапии ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан; врач-онколог ГБУЗ «Республиканский медико-генетический центр» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

**Измайлов А.А.** — д.м.н., главный врач ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Республики Башкортостан, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

**Султанбаев М.В.** — к.х.н., доцент кафедры фармакологии Института дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

**Кудлай Д.А.** — д.м.н., член-корр. РАН, профессор кафедры фармакологии Института фармации ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет); ведущий научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины и молекулярной иммунологии ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства»; профессор кафедры фармакогнозии и промышленной фармации факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

**Sultanbaeva N.I.**, Clinical Oncologist, Department of Antitumor Drug Therapy No. 1, Republican Clinical Oncology Dispensary, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

**Menshikov K.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Oncology with Courses of Oncology and Pathological Anatomy, Institute of Additional Professional Education, Bashkir State Medical University; Clinical Oncologist, Chemotherapy Department, Republican Clinical Oncology Dispensary; Clinical Oncologist, Republican Medical Genetic Center of Republic of Bashkortostan, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

**Izmailov A.A.**, PhD, MD (Medicine), Chief Physician, Republican Clinical Oncology Dispensary, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

**Sultanbaev M.V.**, PhD (Chemistry), Associate Professor, Department of Pharmacology, Institute of Additional Professional Education, Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

**Kudlay D.A.**, PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Department of Pharmacology, Institute of Pharmacy, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Leading Researcher, Laboratory of Personalized Medicine and Molecular Immunology, State Research Center “Institute of Immunology” of the Federal Medical and Biological Agency; Professor, Department of Pharmacognosy and Industrial Pharmacy, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Поступила 23.02.2025  
Принята к печати 23.03.2025

Received 23.02.2025  
Accepted 23.03.2025

## АССОЦИАЦИИ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К СТЕРОИДНЫМ ГОРМОНАМ, И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Поленок Е.Г.<sup>1</sup>, Гордеева Л.А.<sup>1</sup>, Костянко М.В.<sup>2</sup>, Антонов А.В.<sup>3</sup>,  
Байрамов П.В.<sup>3</sup>, Вержбицкая Н.Е.<sup>3</sup>, Захаров В.Н.<sup>3</sup>, Колпинский Г.И.<sup>4,5</sup>,  
Глушков А.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

<sup>3</sup> ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

<sup>5</sup> ГАУЗ «Клинический консультативно-диагностический центр имени И.А. Колпинского», г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Ранее обнаружили, что у больных раком молочной железы (РМЖ) активно пролиферирующие опухоли, содержащие > 20% клеток, экспрессирующих протеин Ki-67, встречались чаще, если в сыворотке крови повышались уровни антител против эстрадиола и прогестерона (IgA<sub>1</sub>-E2 и IgA<sub>1</sub>-Pg). При повышении уровней соответствующих антиидиотипических антител (IgG<sub>2</sub>-E2 и IgG<sub>2</sub>-Pg) такие опухоли встречались реже. Генетические механизмы индивидуальных особенностей образования антител и анти-антител, специфичных к стероидным гормонам, оставались неизвестными. Цель исследования – выявить предполагаемые взаимосвязи полиморфных локусов генов *IL1A* (rs1800587), *IL1B* (rs16944), *IL6* (rs1554606, rs1800795, rs1800796), *IL10* (rs1800896) и *TNFA* (rs1800629) с содержанием в сыворотке крови IgA<sub>1</sub>-E2, IgA<sub>1</sub>-Pg, IgG<sub>2</sub>-E2, IgG<sub>2</sub>-Pg и Ki-67 положительных клеток в опухоли у больных РМЖ. Антитела и анти-антитела в сыворотке больных РМЖ (I стадия – 661 и II-IV стадии – 741) исследовали с помощью ELISA. Однонуклеотидные полиморфизмы генов цитокинов определяли стандартными методами ПЦР. Содержание в опухоли Ki-67 положительных клеток у 484 больных РМЖ с I стадией и у 551 – со II-IV стадиями исследовали с помощью иммуногистохимического ме-

### Адрес для переписки:

Поленок Елена Геннадьевна  
Институт экологии человека ФГБНУ «Федеральный  
исследовательский центр угля и углехимии Сибирского  
отделения Российской академии наук»  
650065, Россия, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10.  
Тел.: 8 (3842) 57-50-79.  
E-mail: egpolenok@mail.ru

### Address for correspondence:

Elena G. Polenok  
Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal  
and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy  
of Sciences  
10 Leningradsky Ave  
Kemerovo  
650065 Russian Federation  
Phone: +7 (3842) 57-50-79.  
E-mail: egpolenok@mail.ru

### Образец цитирования:

Е.Г. Поленок, Л.А. Гордеева, М.В. Костянко,  
А.В. Антонов, П.В. Байрамов, Н.Е. Вержбицкая,  
В.Н. Захаров, Г.И. Колпинский, А.Н. Глушков  
«Ассоциации антител, специфичных к стероидным  
гормонам, и полиморфизма генов цитокинов  
с пролиферацией опухоли у больных раком молочной  
железы» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27,  
№ 4. С. 761-774.  
doi: 10.15789/1563-0625-AOS-3154

© Поленок Е.Г. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

E.G. Polenok, L.A. Gordeeva, M.V. Kostyanko, A.V. Antonov,  
P.V. Bayramov, N.E. Verzhbitskaya, V.N. Zakharov,  
G.I. Kolpinskiy, A.N. Glushkov “Associations of steroid-specific  
antibodies and polymorphisms of cytokine genes with tumor  
proliferation in breast cancer patients”, *Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 4,  
pp. 761-774.  
doi: 10.15789/1563-0625-AOS-3154

© Polenok E.G. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-AOS-3154

тогда. У больных со II-IV стадиями РМЖ с генотипом GG гена *IL6* (rs1800796) активно пролиферирующие опухоли встречались чаще, чем у больных с генотипом CG (63,3% vs 48,6%,  $p = 0,02$ ). По индивидуальным комбинациям уровней идиотипических и антиидиотипических антител выделили три иммунологического фенотипа, по-разному ассоциированных с пролиферацией опухоли у больных РМЖ со II-IV стадиями. У больных с «нейтральным» иммунологическим фенотипом активно пролиферирующие опухоли (Ki-67 > 20% клеток) встречались в 61,5% случаев. У больных с «тормозящим» фенотипом такие опухоли выявляли в 47,3% случаев ( $p = 0,02$  по сравнению с «нейтральным»). У больных со «стимулирующим» фенотипом активно пролиферирующие опухоли были диагностированы в 71,2% ( $p = 0,047$  по сравнению с «нейтральным»,  $p < 0,001$  по сравнению с «тормозящим»). Удельный вес больных с каждым из выделенных иммунологических фенотипов не различался при I и II-IV стадиях. «Стимулирующий» фенотип обнаруживали чаще у носителей генотипа GG *IL6* (rs1800796), чем у носителей генотипа CG (26,8% vs 19,1%,  $p = 0,028$ ). Таким образом, иммуномодуляция пролиферативной активности опухоли идиотипическими и антиидиотипическими антителами, специфичными к стероидным гормонам, у больных РМЖ была детерминирована rs1800796 полиморфизмом гена *IL6*.

*Ключевые слова:* рак молочной железы, антитела, интерлейкины, эстрадиол, прогестерон, Ki-67

## ASSOCIATIONS OF STEROID-SPECIFIC ANTIBODIES AND POLYMORPHISMS OF CYTOKINE GENES WITH TUMOR PROLIFERATION IN BREAST CANCER PATIENTS

Polenok E.G.<sup>a</sup>, Gordeeva L.A.<sup>a</sup>, Kostyanko M.V.<sup>b</sup>, Antonov A.V.<sup>c</sup>, Bayramov P.V.<sup>c</sup>, Verzhbitskaya N.E.<sup>c</sup>, Zakharov V.N.<sup>c</sup>, Kolpinskiy G.I.<sup>d,e</sup>, Glushkov A.N.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

<sup>b</sup> Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

<sup>c</sup> Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

<sup>d</sup> Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

<sup>e</sup> Kemerovo Clinical Diagnostic Center, Kemerovo, Russian Federation

**Abstract.** Earlier it was shown that actively proliferating tumors with Ki-67 positive cells > 20% are more frequently detected in breast cancer patients (BC) with high serum levels of autoantibodies against estradiol and progesterone (IgA1-E2 and IgA1-Pg), and less common in BC with high levels of corresponding antiidiotypic autoantibodies (IgG2-E2 and IgG2-Pg). The genetic factors for development of these auto-antibodies are still unknown. The purpose of this study was to search for associations between polymorphic loci of the *IL1A* (rs1800587), *IL1B* (rs16944), *IL6* (rs1554606, rs1800795, rs1800796), *IL10* (rs1800896) and *TNFA* (rs1800629) genes and serum levels of IgA<sub>1</sub>-E2, IgA1-Pg, IgG2-E2, IgG<sub>2</sub>-Pg as compared with tumor levels of Ki-67-positive cells in BC patients. Antibodies and antiantibodies specific to steroid hormones were assessed by means of ELISA technique, being studied in 661 BC stage I patients, and in 741 patients with stage II-IV disease. Single nucleotide polymorphisms of cytokine genes were determined by PCR technique in DNA isolated from lymphocytes. Ki-67-expressing cells were detected using immunohistochemical technique in tumor samples of 484 stage I BC patients, and in 551 patients with disease of II-IV stage. Higher levels of Ki-67 positive tumor cells were found in patients with stages II-IV breast cancer carrying GG genotype of *IL6* gene (rs1800796) more frequently than in patients with the CG genotype (63.3% vs. 48.6%,  $p = 0.02$ ). Three immunological phenotypes have been found according to individual combinations of studied idiotypic and antiidiotypic antibodies differently associated with tumor proliferation in BC patients (stage II-IV). Highly proliferating tumors (Ki-67 positive cells > 20%) were found in 61.5% BC patients with “neutral” immunological phenotype; in 47.3% BCP with “inhibition” phenotype ( $p = 0.02$  vs. “neutral”), and in 71.2% ( $p = 0.047$  vs. “neutral”,  $p < 0.001$  vs. “inhibition”). The frequency of BC patients with any mentioned immunological phenotype was

not changed from I to II-IV stages of the disorder. The “stimulating” phenotype was found more often in carriers of the GG *IL6* genotype (rs1800796) than in persons with CG genotype (26.8% vs. 19.1%,  $p = 0.028$ ). In conclusion, immunomodulation of tumor proliferation by idiotypic and antiidiotypic antibodies specific to steroid hormones was associated with functional polymorphism rs1800796 of the *IL6* gene.

**Keywords:** breast cancer, antibodies, cytokines, estradiol, progesterone, Ki-67

Работа выполнена в рамках государственного задания АААА-А21-121011590009-9 (проект VI.59.1.1 Программы фундаментальных научных исследований СО РАН).

## Введение

Важным критерием в диагностике молекулярно-биологического подтипа рака молочной железы (РМЖ) и в выборе оптимального варианта лечения является экспрессия в опухоли маркера клеточной пролиферации протеина Ki-67 [11, 16]. Известно влияние сывороточных гормонов и стероид-связывающего глобулина сыворотки крови на возникновение и рост РМЖ [6, 7]. Однако участие аутоантител, специфичных к стероидным гормонам и к их клеточным рецепторам, в прогрессии стероид-зависимых опухолей остается малоизученным.

Ранее обнаружили [1], что у больных РМЖ II-IV стадий опухоли с высоким содержанием Ki-67 положительных клеток (> 20%) встречались чаще, если в сыворотке крови повышались уровни антител класса А, специфичных к эстрадиолу и прогестерону (IgA<sub>1</sub>-E2 и IgA<sub>1</sub>-Pg). И, наоборот, при повышении уровней соответствующих антиидиотипических антител класса G (IgG<sub>2</sub>-E2 и IgG<sub>2</sub>-Pg) такие опухоли встречались реже. Исследование индивидуальных комбинаций указанных антител позволило выделить отдельные иммунологические фенотипы, ассоциированные с высокой и низкой пролиферативной активностью опухоли у больных РМЖ. Предположили, что индивидуальные особенности образования антител, способных участвовать в регуляции прогрессии гормональных опухолей, обусловлены полиморфными вариантами генов цитокинов.

Ассоциации полиморфизма генов цитокинов [9, 15, 17, 20] и содержания их белковых продуктов в сыворотке крови [5, 8, 14] с РМЖ были неоднократно продемонстрированы. Обнаружены взаимосвязи между уровнями цитокинов в крови больных РМЖ и количеством Ki-67 экспрессирующих клеток в опухоли [3, 8]. Однако влияние полиморфных локусов генов цитокинов на образование антител и анти-антител, специфичных к стероидным гормонам, оставалось неизвестным.

**Цель исследования** — выявить предполагаемые взаимосвязи полиморфных локусов генов

*IL1A* (rs1800587), *IL1B* (rs16944), *IL6* (rs1554606, rs1800795, rs1800796), *IL10* (rs1800896) и *TNFA* (rs1800629) с содержанием в сыворотке крови IgA<sub>1</sub>-E2, IgA<sub>1</sub>-Pg, IgG<sub>2</sub>-E2, IgG<sub>2</sub>-Pg и Ki-67 положительных клеток в опухоли у больных РМЖ.

## Материалы и методы

Материалом исследования послужили лимфоциты и сыворотка крови у 1402 больных РМЖ (I стадия — 661, II — 528, III-IV — 213 человек), а также трепан-биоптаты опухоли у некоторых из них (I стадия — 484, II — 400, III-IV — 151 человек) в постменопаузе до начала специального противоопухолевого лечения. Медиана возраста составила 65 лет с интерквартильным интервалом 59-71 год.

Дизайн исследования соответствовал этическим стандартам Хельсинкской декларации (2013) и Правилам клинической практики в Российской Федерации, утвержденным Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 и был одобрен локальным этическим комитетом Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН (протокол № 83/2 от 15.10.2024). Все больные РМЖ давали информированное письменное согласие на участие в исследовании.

Из лимфоцитов выделяли ДНК с помощью метода фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом, образцы ДНК хранили при -20 °С. Стандартными методами ПЦР, описанными ранее [2], определяли единичные нуклеотидные замены в генах *IL1A* (rs1800587), *IL1B* (rs16944), *IL6* (rs1554606, rs1800795, rs1800796), *IL10* (rs1800896) и *TNFA* (rs1800629).

Образцы сыворотки хранили при -70 °С до выполнения неконкурентного иммуноферментного анализа по ранее описанной методике [1]. Уровни IgA<sub>1</sub>-E2 и IgA<sub>1</sub>-Pg определяли, используя конъюгаты E2 и Pg с бычьим сывороточным альбумином в качестве адсорбированных антигенов и козы антитела против IgA человека, меченные пероксидазой хрена (Invitrogen, США), в качестве проявляющих агентов. Уровни IgG<sub>2</sub>-E2 и IgG<sub>2</sub>-Pg исследовали с помощью адсорбированных моноклональных антител против E2 и Pg в коммерческих наборах «ИммуноФА-Эстрадиол» и «ИммуноФА-ПГ» (АО «НВО ИммуноТех», Мо-

сква) и козьих антител против IgG человека, меченных пероксидазой хрена (Invitrogen, США).

Для анализа Ki-67 применяли стандартный иммуногистохимический метод с использованием кроличьих антител 30-9 (CONFIPM, Ventana, США).

С помощью пакета статистических программ Statistica 8.0, (StatSoft Inc., США) и онлайн-калькулятора <https://www.snpstats.net/start.htm> проводили анализ полученных результатов. Использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона для оценки соответствия частоты генотипов генов цитокинов равновесию Харди–Вайнберга (HWE). Характер распределения количественных показателей определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка и статистически значимые различия между сравниваемыми группами ( $p < 0,05$ ) выявляли по непараметрическому критерию  $\chi^2$  с поправкой Йейтса (Yates) на непрерывность вариации. Взаимосвязи между уровнями идиотипических и антиидиотипических антител оценивали с помощью ранговой корреляции по Спирмену. Пороговые значения (cut-off) уровней исследуемых антител были рассчитаны на основе ROC-анализа между больными РМЖ I стадии с низким ( $\leq 20\%$ ) и высоким ( $> 20\%$ ) содержанием Ki-67 положительных клеток в опухоли [10].

## Результаты

Сначала исследовали взаимосвязи между содержанием в сыворотке больных РМЖ идиотипических антител, специфичных к стероидным гормонам, и соответствующих антиидиотипических антител. Оказалось, что коррелируют между собой уровни только IgA<sub>1</sub>-E2 с IgA<sub>1</sub>-Pg ( $r_s = 0,69$ ,  $p < 0,001$ ) и только IgG<sub>2</sub>-E2 с IgG<sub>2</sub>-Pg ( $r_s = 0,17$ ,  $p < 0,001$ ). Взаимосвязи между уровнями идиотипических антител, с одной стороны, и уровнями антиидиотипических антител, с другой стороны, отсутствовали.

Затем с помощью ROC-анализа рассчитали пограничные значения уровней исследуемых антител (cut-off value), по которым больные на I стадии РМЖ с низким ( $\leq 20\%$ ) и высоким ( $> 20\%$ ) содержанием в опухоли Ki-67-положительных клеток имели наиболее значимые различия. Затем распределили больных I и II-IV стадией РМЖ по содержанию в опухоли протеина Ki-67, с одной стороны, и по индивидуальным комбинациям уровней исследуемых антител в сыворотке крови, с другой стороны. Выделили последовательно следующие иммунологические фенотипы: идиотипические (IgA<sub>1</sub>-E2 + IgA<sub>1</sub>-Pg), антиидиотипические (IgG<sub>2</sub>-E2 + IgG<sub>2</sub>-Pg) и идиотип-антиидиотипические (IgA<sub>1</sub>-E2 + IgA<sub>1</sub>-Pg + IgG<sub>2</sub>-E2 + IgG<sub>2</sub>-Pg). Полученные результаты такого анализа представлены в таблице 1.

Больные РМЖ по содержанию в опухоли Ki-67 положительных клеток и выделенным идиотипическим иммунологическим фенотипам распределились следующим образом. У больных с I стадией РМЖ с высоким содержанием Ki-67  $> 20\%$  представительство каждого из указанных фенотипов (комбинации IgA<sub>1</sub>-E2 + IgA<sub>1</sub>-Pg) встречалось примерно с одинаковой частотой (34,0-45,6%), различия между ними были незначимыми ( $p = 0,489$ ).

У больных со II-IV стадией РМЖ с одновременно низкими уровнями IgA<sub>1</sub>-E2  $\leq 3$  + IgA<sub>1</sub>-Pg  $\leq 2$  (комбинация 1.1) и с низким уровнем одного из этих антител при высоком другом (комбинации 1.2 и 1.3) опухоли с Ki-67  $> 20\%$  встречались в 59,1-54,3%. В среднем ( $1,5 = 1,1+1,2+1,3$ ) эта частота составляла 57,9%. В отличие от них у больных с одновременно высокими уровнями IgA<sub>1</sub>-E2  $> 3$  + IgA<sub>1</sub>-Pg  $> 2$  (комбинация 1.4) опухоли с Ki-67  $> 20\%$  обнаруживали чаще, в 68,6%. Различия между комбинациями 1.4 и 1.5 оказались статистически значимыми ( $p = 0,02$ ).

Аналогичный анализ больных РМЖ по антиидиотипам IgG<sub>2</sub>-E2 и IgG<sub>2</sub>-Pg показал отсутствие искомым взаимосвязей с содержанием Ki-67 в опухоли при I стадии. У больных II-IV стадиями РМЖ при одновременно низких уровнях IgG<sub>2</sub>-E2  $\leq 4$  + IgG<sub>2</sub>-Pg  $\leq 2,5$  (комбинация 2.1) и низких уровнях одного из этих антител в комбинации с высоким уровнем другого (комбинации 2.2 и 2.3) опухоли с Ki-67  $> 20\%$  встречались в 62,8–70,5% случаев (в среднем в 64,9%, комбинация 2.5). При одновременно высоких уровнях IgG<sub>2</sub>-E2  $> 4$  + IgG<sub>2</sub>-Pg  $> 2,5$  такая частота была значительно ниже (50,8%) и различия между подгруппами 2.4 и 2.5 оказались статистически значимыми ( $p = 0,005$ ).

Таким образом, у больных РМЖ на II-IV стадиях активно пролиферирующие опухоли (Ki-67  $> 20\%$ ) встречались в 61,5% случаев без учета влияния исследуемых антител. Однако при некоторых комбинациях идиотипических антител IgA<sub>1</sub>-E2 + IgA<sub>1</sub>-Pg (1.4) и антиидиотипических антител IgG<sub>2</sub>-E2 + IgG<sub>2</sub>-Pg (2.1+2.2+2.3) эта величина была больше, 68,6% и 64,9% соответственно. При других комбинациях (1.1+1.2+1.3 и 2.4) она оказалась меньше, 57,9% и 50,8% соответственно. Комплексный анализ условно стимулирующих и условно тормозящих пролиферацию опухоли идиотипических и антиидиотипических иммунологических фенотипов показал следующее (продолжение табл. 1).

У больных II-IV стадией РМЖ с одновременно стимулирующими идиотипическими и антиидиотипическими фенотипами (комбинация 3.1) активно пролиферирующие опухоли обнаруживались в 71,2%. Если один из указанных фенотипов

**ТАБЛИЦА 1. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) БОЛЬНЫХ РМЖ С НИЗКИМ ( $\leq 20\%$ ) И ВЫСОКИМ ( $> 20\%$ ) СОДЕРЖАНИЕМ В ОПУХОЛИ Ki-67 ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КОМБИНАЦИЙ НИЗКИХ ( $\leq$ ) И ВЫСОКИХ ( $>$ ) УРОВНЕЙ ИДИОТИПИЧЕСКИХ (IgA<sub>1</sub>) И АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ (IgG<sub>2</sub>) ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИТЕЛ**

TABLE 1. NUMBERS (n) AND FREQUENCY (%) OF BCP WITH LOW ( $\leq 20\%$ ) AND HIGH ( $> 20\%$ ) LEVELS OF TUMOR Ki-67 POSITIVE CELLS DEPENDING ON PERSONAL COMBINATIONS OF LOW ( $\leq$ ) AND HIGH ( $>$ ) LEVELS OF STUDIED IDIOTYPIC (IgA<sub>1</sub>) AND ANTIIDIOTYPIC (IgG<sub>2</sub>) ANTIBODIES

Комбинации антител Antibodies combinations	РМЖ I стадии BCP I stage (n = 484)		РМЖ II-IV стадий BCP II-IV stages (n = 551)	
	Ki-67 $\leq 20\%$	Ki-67 $> 20\%$	Ki-67 $\leq 20\%$	Ki-67 $> 20\%$
	n/%	n/%	n/%	n/%
1.1. IgA <sub>1</sub> -E2 $\leq 3$ + IgA <sub>1</sub> -Pg $\leq 2$	133/59,9	89/40,1	91/40,9	131/59,1
1.2. IgA <sub>1</sub> -E2 $> 3$ + IgA <sub>1</sub> -Pg $\leq 2$	33/66,0	17/34,0	26/41,3	37/58,7
1.3. IgA <sub>1</sub> -E2 $\leq 3$ + IgA <sub>1</sub> -Pg $> 2$	32/59,3	22/40,7	37/45,7	44/54,3
1.4. IgA <sub>1</sub> -E2 $> 3$ + IgA <sub>1</sub> -Pg $> 2$	86/54,4	72/45,6	58/31,4	127/68,6
$\chi^2$ (p), df = 3	2,4 (0,49)		6,5 (0,09)	
1.5. (1.1+1.2+1.3)	198/60,7	128/39,3	154/42,1	212/57,9
$\chi^2$ (p1.4-1.5), df = 1	1,5 (0,22)		5,5 (0,02)	
2.1. IgG <sub>2</sub> -E2 $\leq 4$ + IgG <sub>2</sub> -Pg $\leq 2,5$	88/56,8	67/43,2	66/35,7	119/64,3
2.2. IgG <sub>2</sub> -E2 $> 4$ + IgG <sub>2</sub> -Pg $\leq 2,5$	51/57,9	37/42,1	23/29,5	55/70,5
2.3. IgG <sub>2</sub> -E2 $\leq 4$ + IgG <sub>2</sub> -Pg $> 2,5$	63/59,4	43/40,6	58/37,2	98/62,8
2.4. IgG <sub>2</sub> -E2 $> 4$ + IgG <sub>2</sub> -Pg $> 2,5$	82/60,7	53/39,3	65/49,2	67/50,8
$\chi^2$ (p), df = 3	0,5 (0,92)		9,9 (0,02)	
2.5. (2.1+2.2+2.3)	202/57,9	147/42,1	147/35,1	272/64,9
$\chi^2$ (p2.4-2.5), df = 1	0,2 (0,64)		7,9 (0,005)	
3.1. IgG <sub>2</sub> (1.1+1.2+1.3) + IgA <sub>1</sub> (2.4)	60/51,3	57/48,7	42/28,8	104/71,2
3.2. IgG <sub>2</sub> (1.1+1.2+1.3) + IgA <sub>1</sub> (2.1+2.2+2.3)	142/61,2	90/38,8	105/38,5	168/61,5
3.3. IgG <sub>2</sub> (1.4) + IgA <sub>1</sub> (2.4)	26/63,4	15/36,6	16/41,0	23/59,0
3.4. IgG <sub>2</sub> (1.4) + IgA <sub>1</sub> (2.1+2.2+2.3)	56/59,6	38/40,4	49/52,7	44/47,3
$\chi^2$ (p), df = 3	3,7 (0,30)		13,9 (0,004)	
3.5 (3.2+3.3)	168/61,5	105/38,5	121/38,3	191/61,2
$\chi^2$ (p3.1-3.5), df = 1	3,1 (0,08)		3,9 (0,047)	
$\chi^2$ (p3.4-3.5), df = 1	0,05 (0,83)		5,1 (0,02)	
$\chi^2$ (p3.1-3.4), df = 1	1,1 (0,29)		12,8 ( $< 0,001$ )	

был условно стимулирующим, а другой – тормозящим (комбинация 3.2 и 3.3), то эти величины равнялись 61,5% и 59,0% соответственно. При сочетании условно тормозящих IgA<sub>1</sub> + IgG<sub>2</sub> комбинаций (3.4) активно пролиферирующие опухоли встречались в 47,3% случаев.

В результате в группе больных РМЖ II-IV стадий можно выделить три идиотип-антиидиотипических фенотипа по отношению к пролиферативной активности опухоли:

– нейтральный (комбинация 3.5 = 3.2+3.3), при котором удельный вес больных с Ki-67  $> 20\%$

(61,2%) не отличался от средней величины по группе (61,5%);

– стимулирующий (комбинация 3.4), при котором доля больных с Ki-67  $> 20\%$  (71,2%) оказалась статистически значимо больше по сравнению с нейтральным ( $p = 0,047$ );

– тормозящий (комбинация 3.1), при котором активно пролиферирующие опухоли встречались реже по сравнению с нейтральным (47,3%,  $p = 0,020$ ).

Различия между больными со стимулирующим и тормозящим идиотип-антиидиотипическими

**ТАБЛИЦА 2. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) БОЛЬНЫХ РМЖ С НИЗКИМ ( $\leq 20\%$ ) И ВЫСОКИМ ( $> 20\%$ ) СОДЕРЖАНИЕМ В ОПУХОЛИ КИ-67 ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ**

TABLE 2. NUMBERS (n) AND FREQUENCY (%) OF BCP WITH LOW ( $\leq 20\%$ ) AND HIGH ( $> 20\%$ ) LEVELS OF TUMOR Ki-67 POSITIVE CELLS DEPENDING ON STUDIED CYTOKINES GENES POLYMORPHISMS

Гены, генотипы, аллели Genes, genotypes, alleles	РМЖ I стадии BCP stage I (n = 484)		РМЖ II-IV стадий BCP stages II-IV (n = 551)	
	Ki-67 $\leq 20\%$	Ki-67 $> 20\%$	Ki-67 $\leq 20\%$	Ki-67 $> 20\%$
	n/%	n/%	n/%	n/%
<b>IL1A (rs1800587)</b>				
CC	136/57,9	99/42,1	110/37,7	182/62,3
TC	120/60,9	77/39,1	86/40,8	125/59,2
TT	26/56,5	20/43,5	15/34,1	29/65,9
C	392/58,8	275/41,2	306/38,5	489/61,5
T	172/59,5	117/40,5	116/38,8	183/61,2
p	0,83		0,93	
<b>IL1B (rs16944)</b>				
CC	131/61,8	81/38,2	86/38,1	140/61,9
CT	127/56,9	96/43,1	99/39,6	151/60,4
TT	24/54,5	20/45,5	27/36,0	48/64,0
C	389/60,1	258/39,9	271/38,6	431/61,4
T	175/56,3	136/43,7	153/38,3	247/61,7
p	0,24		0,91	
<b>IL6 (rs1554606)</b>				
GG	72/54,5	60/45,5	62/40,3	92/59,7
GT	140/60,6	91/39,4	101/39,5	155/60,5
TT	70/59,8	47/40,2	48/34,3	92/65,7
G	284/57,4	211/42,6	225/39,9	339/60,1
T	280/60,2	185/39,8	197/36,8	339/63,2
p	0,38		0,30	
<b>IL6 (rs1800795)</b>				
GG	80/55,6	64/44,4	72/43,1	95/56,9
GC	140/60,3	92/39,7	95/36,8	163/63,2
CC	63/59,4	43/40,6	44/35,2	81/64,8
G	300/57,7	220/42,3	239/40,4	353/59,6
C	266/59,9	178/40,1	183/36,0	325/64,0
p	0,49		0,15	
<b>IL6 (rs1800796)</b>				
GG	249/60,3	164/39,7	174/36,4	304/63,6
CG	32/47,1	36/52,9	37/51,4	35/48,6
CC	2/100	0/0	0/0	0/0
G	530/59,3	364/40,7	385/37,5	643/62,5
C	36/50,0	36/50,0	37/51,4	35/48,6
$\chi^2$ (pGG-CG), df = 1	3,7 (0,06)		5,3 (0,02)	
$\chi^2$ (pGG-CG), df = 3	10,4 (0,016)			
$\chi^2$ (pG-C), df = 1	2,0 (0,16)		4,9 (0,03)	
$\chi^2$ (pG-C), df = 3	8,4 (0,04)			
<b>IL10 (rs1800896)</b>				
AA	103/62,0	63/38,0	71/37,2	120/62,8
GA	121/57,6	89/42,4	106/40,3	157/59,7
GG	60/57,7	44/42,3	34/35,4	62/64,6
A	327/60,3	215/39,7	248/38,4	397/61,6
G	241/57,7	177/42,3	174/38,2	281/61,8
p	0,43		0,94	

Таблица 2 (окончание)  
Table 2 (continued)

Гены, генотипы, аллели Genes, genotypes, alleles	РМЖ I стадии BCP stage I (n = 484)		РМЖ II-IV стадий BCP stages II-IV (n = 551)	
	Ki-67 ≤ 20%	Ki-67 > 20%	Ki-67 ≤ 20%	Ki-67 > 20%
	n/%	n/%	n/%	n/%
<b>TNFA (rs1800629)</b>				
<b>GG</b>	221/58,3	158/41,7	161/36,8	277/63,2
<b>GA</b>	57/58,8	40/41,2	48/44,4	60/55,6
<b>AA</b>	6/85,7	1/14,3	2/50,0	2/50,0
<b>G</b>	499/58,4	356/41,6	370/37,6	614/62,4
<b>A</b>	69/62,2	42/37,8	52/44,8	64/55,2
<b>p</b>	0,45		0,12	

фенотипами по частоте диагностированных активно пролиферирующих опухолей оказалось статистически высоко значимыми ( $p < 0,001$ ).

В связи с этим возникает вопрос: с чем связаны столь значимые для прогрессии РМЖ различия по обозначенным иммунологическим фенотипам? В частности, зависят ли индивидуальные особенности образования аутоантител и анти-антител к стероидным гормонам от полиморфных локусов генов цитокинов?

Анализ распределения больных РМЖ по содержанию в опухоли Ki-67 в зависимости от изучаемых вариантов генов цитокинов показал следующее (табл. 2). Искомые взаимосвязи обнаружены только с полиморфным локусом rs1800796 гена *IL6*. При I стадии РМЖ опухоли Ki-67 > 20% встречались у больных с генотипом GG реже, чем у больных с генотипом CG (39,7% vs 52,9%,  $df = 1$ ,  $p = 0,06$ ). При II-IV стадиях, наоборот, активно пролиферирующие опухоли обнаруживали чаще у больных с генотипом GG, чем с генотипом CG (63,3% vs 48,6%,  $df = 1$ ,  $p = 0,02$ ). Соответственно, частота выявления Ki-67 > 20% опухолей от I ко II-IV стадиям возрастала у больных с генотипом GG на 23,9%, а у больных с генотипом CG снижалась на 4,3% ( $df = 3$ ,  $p = 0,016$ ). Аналогичные различия проявились при сравнении носительства аллелей G и C (62,5% vs 48,6%,  $df = 1$ ,  $p = 0,03$ ; возрастание у G на 21,7%, снижение у C на 1,4%,  $p = 0,04$ ).

Удельный вес больных с активно пролиферирующими опухолями не зависел от принадлежности больных к тому или иному генотипу других исследованных генов цитокинов.

Для решения основной задачи настоящей работы выполнили анализ распределения больных РМЖ по выделенным иммунологическим фенотипам в зависимости от генотипа изучаемых генов цитокинов. Предварительно выяснили, что представительство каждого из указанных фенотипов не различалось у больных с I и со II-IV стадиями РМЖ. Это свидетельствовало о том,

что иммунологический фенотип, присущий пациенткам в начале заболевания, не изменялся при дальнейшем росте опухоли, и послужило обоснованием для объединения больных I и II-IV стадиями в поисках искомых взаимосвязей с полиморфными локусами генов цитокинов.

Анализ распределения больных РМЖ по идиотипическим фенотипам (IgA<sub>1</sub>) показал следующее (табл. 3). Стимулирующий пролиферацию опухоли иммунологический фенотип (комбинация 1.4 по таблице 1) встречался чаще у носителей генотипа GG *IL6* (rs1800796), чем у носителей генотипа CG (33,7% vs 23,8%,  $p < 0,01$ ). Соответственно, у носителей аллелей G и C: 32,9% vs 24,9%  $p = 0,02$ . Во всех остальных случаях искомых взаимосвязей изучаемых полиморфных локусов генов цитокинов с идиотипическими фенотипами не обнаружено.

Не выявили статистически достоверных ассоциаций вариантов генов цитокинов с антиидиотипическими иммунологическими фенотипами (полученные данные в виде отдельной таблице не представлены). Частота обнаружений комбинаций 2.4 и 2.5 по таблице 1 была примерно одинаковой при каждом генотипе исследованных генов.

В таблице 4 показано, что удельный вес больных РМЖ с каждым из 3 выделенных идиотип-антиидиотипических фенотипов не зависел от полиморфизма в генах цитокинов как при анализе генотипов, так и при анализе отдельных аллелей. Небольшие искомые различия обнаружены между генотипами GG и CG гена *IL6* (rs1800796). У больных с генотипом GG стимулирующий иммунологический фенотип встречался чаще, чем у больных с генотипом CG (26,8% vs 19,1%). И, наоборот, нейтральный и тормозящий иммунологические фенотипы обнаруживали реже у носителей генотипа GG, чем у носителей генотипа CG (73,2% vs 80,9%  $p = 0,028$ ).

Вместе с тем выяснилось, что образование некоторых из исследованных антител по-

**ТАБЛИЦА 3. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) БОЛЬНЫХ РМЖ С РАЗЛИЧНЫМИ ИДИОТИПИЧЕСКИМИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ФЕНОТИПАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ**

**TABLE 3. NUMBERS (n) AND FREQUENCY (%) OF BCP WITH DIFFERENT IDIOTYPIC IMMUNOLOGICAL PHENOTYPES DEPENDING ON STUDIED CYTOKINES GENES POLYMORPHISMS**

Гены, генотипы, аллели Genes, genotypes, alleles	Идиотипические иммунологические фенотипы (комбинации IgA <sub>1</sub> ) Idiotypic immunological phenotypes (IgA <sub>1</sub> combinations)	
	1.1 + 1.2 + 1.3	1.4
<b>IL1A (rs1800587)</b>		
CC	502/68,7	229/31,3
TC	365/67,0	180/33,0
TT	78/67,2	38/32,8
C	1369/68,2	638/31,8
T	521/67,1	256/32,9
<b>IL1B (rs16944)</b>		
CC	416/68,3	193/31,7
CT	425/66,7	212/33,3
TT	106/69,3	47/30,7
C	1257/67,8	598/32,2
T	637/67,6	306/32,4
<b>IL6 (rs1554606)</b>		
GG	270/70,1	115/29,9
GT	457/67,1	224/32,9
TT	221/66,4	112/33,6
G	997/68,7	454/31,3
T	899/66,7	448/33,3
<b>IL6 (rs1800795)</b>		
GG	295/69,4	130/30,6
GC	457/67,7	218/32,3
CC	197/65,2	105/34,8
G	1047/68,7	478/31,3
C	851/66,5	428/33,5
<b>IL6 (rs1800796)</b>		
GG	802/66,3	407/33,7*
CG	144/76,2	45/23,8
CC	2/50,0	2/50,0
G	1748/67,1	859/32,9**
C	148/75,1	49/24,9
<b>IL10 (rs1800896)</b>		
AA	318/68,1	149/31,9
GA	441/66,7	220/33,3
GG	188/69,4	83/30,6
A	1077/67,5	518/32,5
G	817/67,9	386/32,1
<b>TNFA (rs1800629)</b>		
GG	740/67,1	363/32,9
GA	198/69,5	87/30,5
AA	11/78,6	3/21,4
G	1678/67,4	813/32,6
A	220/70,3	93/29,7

Примечание. \* pGG-CG = 0,001; \*\* pG-C = 0,02.

Note. \* pGG-CG = 0.001; \*\* pG-C = 0.02.

**ТАБЛИЦА 4. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) БОЛЬНЫХ РМЖ С РАЗЛИЧНЫМИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ ФЕНОТИПАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ИССЛЕДУЕМЫХ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ**

TABLE 4. NUMBERS (n) AND FREQUENCY (%) OF BCP WITH DIFFERENT IMMUNOLOGICAL PHENOTYPES DEPENDING ON STUDIED CYTOKINES GENES POLYMORPHISMS

Гены, генотипы, аллели Genes, genotypes, alleles	Идиотип-антиидиотипические иммунологические фенотипы (комбинации IgA <sub>1</sub> + IgG <sub>2</sub> ) Idiotype-antiidiotypic immunological phenotypes (IgA <sub>1</sub> + IgG <sub>2</sub> combinations)		
	Нейтральный Neutral (3.5)	Тормозящий Braking (3.4)	Стимулирующий Stimulating (3.1)
	n/%	n/%	n/%
<b>IL1A (rs1800587)</b>			
CC	419/57,3	127/17,4	185/25,3
TC	312/57,2	89/16,3	144/26,4
TT	60/51,7	27/23,3	29/25,0
C	1150/57,3	343/17,1	514/25,6
T	432/55,6	143/18,4	202/26,0
<b>IL1B (rs16944)</b>			
CC	348/57,1	110/18,1	151/24,8
CT	354/55,6	103/16,1	180/28,3
TT	91/59,5	30/19,6	32/20,9
C	1050/56,6	323/17,4	482/26,0
T	536/56,8	163/17,3	244/25,9
<b>IL6 (rs1554606)</b>			
GG	212/55,1	78/20,2	95/24,7
GT	401/58,9	102/15,0	178/26,1
TT	182/54,7	63/18,9	88/26,4
G	825/56,9	258/17,8	368/25,3
T	765/56,8	228/16,9	354/26,3
<b>IL6 (rs1800795)</b>			
GG	236/55,5	83/19,5	106/24,9
GC	398/59,0	104/15,4	173/25,6
CC	163/54,0	56/18,5	83/27,5
G	870/57,0	270/17,7	385/25,2
C	724/56,6	216/16,9	339/26,5
<b>IL6 (rs1800796)</b>			
GG	679/56,2	206/17,0	324/26,8*
CG	117/61,8	36/19,1	36/19,1
CC	2/50,0	0/0	2/50,0
G	1475/56,6	448/17,2	684/26,2
C	121/61,4	36/18,3	40/20,3
<b>IL10 (rs1800896)</b>			
AA	270/57,8	83/17,8	114/24,4
GA	358/54,2	123/18,6	180/27,2
GG	167/61,6	37/13,7	67/24,7
A	898/56,3	289/18,1	408/25,6
G	692/57,5	197/16,4	314/26,1
<b>TNFA (rs1800629)</b>			
GG	631/57,2	183/16,6	289/26,2
GA	159/55,8	56/19,6	70/24,6
AA	8/57,1	4/28,6	2/14,3
G	1421/57,0	422/16,9	648/26,0
A	175/55,9	64/20,4	74/23,6

Примечание. \* pGG-CG = 0,028 в сравнении с 3.4+3.5.

Note. \* pGG-CG = 0.028 compared to 3.4+3.5.

**ТАБЛИЦА 5. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) БОЛЬНЫХ РМЖ С НИЗКИМИ ( $\leq$ ) И ВЫСОКИМИ ( $>$ ) УРОВНЯМИ ИДИОТИПИЧЕСКИХ (IgA<sub>1</sub>) И АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ (IgG<sub>2</sub>) АНТИТЕЛ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ**

**TABLE 5. NUMBERS (n) AND FREQUENCY (%) OF BCP WITH LOW ( $\leq$ ) AND HIGH ( $>$ ) LEVELS OF IDIOTYPIC (IgA<sub>1</sub>) AND ANTIIDIOTYPIC (IgG<sub>2</sub>) ANTIBODIES DEPENDING ON STUDIED CYTOKINES GENES POLYMORPHISMS**

Гены, генотипы, аллели Genes, genotypes, alleles	РМЖ I стадии / BCP stage I (n = 661)		РМЖ II-IV стадий / BCP stages II-IV (n = 741)	
	IgA <sub>1</sub> -Pg $\leq$ 2	IgA <sub>1</sub> -Pg $>$ 2	IgA <sub>1</sub> -Pg $\leq$ 2	IgA <sub>1</sub> -Pg $>$ 2
	n/%	n/%	n/%	n/%
<b>IL1B (rs16944)</b>				
CC	180/60,8	116/39,2	149/47,6	164/52,4
CT	168/54,7	139/45,3	178/53,9	152/46,1
TT	21/39,6	32/60,4	62/62,0	38/38,0
C	528/71,5	371/28,5	476/49,8	480/50,2
T	210/50,8	203/49,2	302/56,9	228/43,1
$\chi^2$ (pCC-TT), df = 2	7,4 (0,006)		5,7 (0,02)	
$\chi^2$ (pCC-TT), df = 3	23,4 (< 0,001)			
$\chi^2$ (pC-T), df = 1	6,8 (0,009)		6,8 (0,01)	
$\chi^2$ (pC-T), df = 3	19,6 (< 0,001)			
Гены, генотипы, аллели Genes, genotypes, alleles	IgG <sub>2</sub> -E2 $\leq$ 4	IgG <sub>2</sub> -E2 $>$ 4	IgG <sub>2</sub> -E2 $\leq$ 4	IgG <sub>2</sub> -E2 $>$ 4
	n/%	n/%	n/%	n/%
<b>IL6 (rs1800796)</b>				
GG	332/58,3	237/41,7	406/63,4	234/36,6
CG	38/43,7	49/56,3	67/65,7	35/34,3
CC	2/50,0	2/50,0	0/0	0/0
G	702/57,3	523/42,7	879/63,6	503/36,4
C	42/44,2	53/55,8	67/65,7	35/34,3
$\chi^2$ (pGG-CG), df = 1	6,0 (0,01)		0,1 (0,74)	
$\chi^2$ (pGG-CG), df = 3	6,8 (0,08)			
$\chi^2$ (pG-C), df = 1	5,6 (0,02)		0,1 (0,75)	
$\chi^2$ (pG-C), df = 3	6,6 (0,09)			
Гены, генотипы, аллели Genes, genotypes, alleles	IgG <sub>2</sub> -Pg $\leq$ 2,5	IgG <sub>2</sub> -Pg $>$ 2,5	IgG <sub>2</sub> -Pg $\leq$ 2,5	IgG <sub>2</sub> -Pg $>$ 2,5
	n/%	n/%	n/%	n/%
<b>IL10 (rs1800896)</b>				
AA	103/46,4	119/53,6	104/42,4	141/57,6
GA	156/52,5	141/47,5	179/49,2	185/50,8
GG	67/48,6	71/51,4	73/54,9	60/45,1
A	362/48,9	379/51,1	387/45,3	467/54,7
G	290/50,6	283/49,4	325/51,6	305/48,4
$\chi^2$ (pAA-GG), df = 1	0,1 (0,77)		4,9 (0,03)	
$\chi^2$ (pAA-GG), df = 3	6,2 (0,10)			
$\chi^2$ (pA-G), df = 1	0,3 (0,56)		5,5 (0,02)	
$\chi^2$ (pA-G), df = 3	6,5 (0,09)			
<b>TNFA (rs1800629)</b>				
GG	267/51,9	247/48,1	283/48,0	306/52,0
GA	56/40,9	81/59,1	71/47,9	77/52,1
AA	4/44,4	5/55,6	2/40,0	3/60,0
G	590/50,6	575/49,4	637/48,0	689/52,0
A	64/41,3	91/58,7	75/47,5	83/52,5
$\chi^2$ (pGG-GA), df = 1	4,9 (0,03)		0,01 (0,94)	
$\chi^2$ (pGG-GA), df = 3	5,6 (0,13)			
$\chi^2$ (pG-A), df = 1	4,4 (0,04)		0,003 (0,96)	
$\chi^2$ (pG-A), df = 3	5,9 (0,12)			

отдельности взаимосвязано с определенными полиморфными локусами изучаемых генов цитокинов. В частности (табл. 5), высокие уровни  $IgA_1$ -Pg > 2 встречались чаще у больных с генотипом ТТ, чем у больных с генотипом СС гена *IL1B* (rs16944): 60,4% vs 39,2% ( $p = 0,006$ ) на I стадии РМЖ и, наоборот, реже у больных с генотипом ТТ, чем у больных с генотипом СС, на II-IV стадиях (38,0% vs 52,4%,  $p = 0,02$ ). При этом удельный вес больных с  $IgA_1$ -Pg > 2 на II-IV стадиях был больше на 13,2%, чем на I стадии, у носителей генотипа СС, а у носителей генотипа ТТ, наоборот, меньше на 22,4% ( $p < 0,001$ ). Аналогичные ассоциации  $IgA_1$ -Pg у больных проявлялись при анализе аллелей С и Т гена *IL1B*.

Высокие уровни  $IgG_2$ -E2 > 4 обнаруживали чаще у носителей генотипа СG *IL6* (rs1800796), чем у носителей генотипа GG у больных с I стадией РМЖ (56,3% vs 41,7%,  $p = 0,01$ ), но не со II-IV стадиями. Удельный вес больных с I стадией РМЖ с аллелями С и G по отдельности составил 55,8% и 42,7% соответственно ( $p = 0,02$ ).

Содержание в сыворотке  $IgG_2$ -Pg оказалось ассоциированным с вариантами генов *IL10* (rs1800896) и *TNFA* (rs1800629). Высокие уровни  $IgG_2$ -Pg > 2,5 встречались чаще у больных с генотипом АА, чем у больных с генотипом GG гена *IL10* на II-IV стадиях РМЖ (57,6% vs 45,1%,  $p = 0,03$ ), но не на I стадии. Удельный вес больных с высокими уровнями  $IgG_2$ -Pg и генотипом GA был больше, чем с генотипом GG *TNFA* (rs1800629) на I стадии РМЖ (59,1% vs 48,1%,  $p = 0,03$ ), но не на II-IV стадиях.

## Обсуждение

Исследование механизмов регуляции пролиферативной активности опухоли у больных РМЖ представляется актуальной задачей в связи с необходимостью выбора врачом наиболее оптимальной схемы химио-гормонотерапии в каждом конкретном случае. Если внеклеточные факторы стимулируют пролиферацию опухоли, стандартный алгоритм лечения может быть ужесточен. И наоборот, тормозящее влияние внеклеточных факторов предполагает более «мягкое» применение противоопухолевых препаратов с минимизацией сопутствующих осложнений.

В настоящей работе подтвердили ранее полученные данные [1] о влиянии антител против сывороточных гормонов и соответствующих антиидиотипических антител на пролиферативную активность опухоли у больных РМЖ. В частности показано синергическое действие  $IgA_1$ -E2 и  $IgA_1$ -Pg, стимулирующих пролиферацию опухоли, и синергическое антипролиферативное действие  $IgG_2$ -E2 и  $IgG_2$ -Pg.

Среди больных РМЖ выделили условно три иммунологических фенотипа в соответствии с индивидуальными комбинациями исследованных антител, по-разному ассоциированных с содержанием в опухоли Ki-67 положительных клеток. У больных с «нейтральным» фенотипом количество Ki-67-экспрессирующих клеток в опухоли не отличалось от величины, средней для больных на II-IV стадиях РМЖ, без учета индивидуальных уровней антител (61,2% и 61,5% соответственно). Таких больных в общей выборке было 56,8%. У больных со «стимулирующим» фенотипом активно пролиферирующие опухоли встречались чаще, в 71,2%. Таких случаев в общей выборке было 25,7%. У больных с «тормозящим» фенотипом опухоли с высоким содержанием Ki-67 положительных клеток обнаруживали реже, в 47,3%, и таких случаев было 17,5%.

Причины столь различных по влиянию на прогрессию опухоли индивидуальных особенностей образования исследованных антител остаются неизвестными. Индукторами синтеза идиотипических антител против стероидных гормонов могут быть ДНК-аддукты их метаболитов, обнаруженные у больных РМЖ [18, 19], в которых низкомолекулярные гормоны выступают в роли гаптенных. Вероятной причиной образования антиидиотипических антител могут быть мутации в гормон-связывающих центрах стероидных рецепторов у больных РМЖ [4, 12]. Соответствующие структурные изменения рецепторов могли бы индуцировать синтез специфических антител, которые в наших исследованиях проявляются как антиидиотипические. Однако гипотетические взаимосвязи гормональных аддуктов и мутантных форм гормональных рецепторов с образованием соответствующих идиотипических и антиидиотипических антител остаются неисследованными.

Появление антиидиотипических антител могло бы быть следствием образования идиотипических антител по теории иммунологических цепей Йерне [13]. Однако в настоящем исследовании нам не удалось обнаружить взаимосвязей уровней  $IgA_1$ -E2 и  $IgA_1$ -Pg с уровнями  $IgG_2$ -E2 +  $IgG_2$ -Pg, что свидетельствует о независимых механизмах их образования.

Какими бы ни были причины образования антител, специфичных к стероидным гормонам и их рецепторам, сила иммунного ответа (уровень антител в сыворотке), очевидно, контролируется цитокинами. В настоящей работе впервые обнаружены ассоциации вариантов генов *IL1B* (rs16944) с уровнями  $IgA_1$ -Pg; *IL6* (rs1800796) с  $IgG_2$ -E2; *IL10* (rs1800896) с  $IgG_2$ -Pg; *TNFA* (rs1800629) с  $IgG_2$ -Pg.

Более того, впервые выявлена искомая взаимосвязь генотипов генов цитокинов с иммунологическим фенотипом, индивидуальной совокупностью уровней идиотипических и антиидиотипических антител. У носителей генотипа GG *IL6* (rs1800796) стимулирующий пролиферацию опухоли иммунологический фенотип встречался чаще, чем у носителей генотипа CG. Примечательно, что у больных с генотипом GG активно пролиферирующие опухоли были обнаружены чаще, чем у больных с генотипом CG. Это доказывает, что взаимосвязь полиморфизма rs1800796 гена *IL6* с пролиферацией РМЖ обу-

словлена влиянием вариантов гена на образование комплекса антител, специфичных к E2 и P<sub>g</sub>, и к их рецепторам, модифицирующим пролиферацию опухоли.

## Заключение

Иммуноанализ аутоантител, специфичных к стероидным гормонам и к их рецепторам, в совокупности с определением полиморфных локусов генов цитокинов рекомендуется для изучения внеклеточных механизмов регуляции прогрессии РМЖ и других гормонозависимых опухолей.

## Список литературы / References

1. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Байрамов П.В., Вержбицкая Н.Е., Антонов А.В., Колпинский Г.И., Костянко М.В. Антитела и анти-антитела, специфичные к эстрадиолу и прогестерону, и пролиферативная активность опухоли у больных раком молочной железы // Сибирский онкологический журнал, 2024. Т. 23, № 3. С. 73-85. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Bayramov P.V., Verzhbitskaya N.E., Antonov A.V., Kolpinsky G.I., Kostyanko M.V. Antibodies and anti-antibodies specific to estradiol and progesterone and tumor proliferation in breast cancer patients. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2024, Vol. 23, no. 3, pp. 73-85. (In Russ.)]
2. Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Воронина Е.Н., Колпинский Г.И., Луценко В.А., Брежнева Е.В., Костянко М.В., Вафин И.А., Глушков А.А. Ассоциации антител к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону с полиморфными вариантами генов цитокинов у женщин в постменопаузе // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 171-180. [Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Voronina E.N., Kolpinsky G.I., Lutsenko V.A., Brezhneva E.V., Kostyanko M.V., Vafin I.A., Glushkov A.A. Association of antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone with gene polymorphisms of cytokines in postmenopausal women. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 171-180. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-АОА-1794.
3. Студеникина А.А., Михайлова Е.С., Архипов С.А., Вараксин Н.А., Проскура А.В., Аутеншлюс А.И. Биомаркеры крови и маркер пролиферации Ki-67 при раке молочной железы // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2. С. 357-366. [Studenikina A.A., Mikhaylova E.S., Arkhipov S.A., Varaksin N.A., Proskura A.V., Autenshlyus A.I. Blood biomarkers and Ki-67 proliferation marker in breast cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 357-366. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-BBA-2570.
4. Alluri P.G., Speers C., Chinnaiyan A.M. Estrogen receptor mutations and their role in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.*, 2014, Vol. 16, no. 6, pp. 494-502.
5. Cui Y., Cui S., Lu W., Wang Ya., Zhuo Z., Wang R., Zhang D., Wu X., Chang L., Zuo X., Zhang W., Mei H., Zhang M. CRP, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , and IL6 levels and the risk of breast cancer: a twosample Mendelian randomization study. *Sci. Rep.*, 2024, Vol. 14, no. 1, 1982. doi: 10.1038/s41598-024-52080-w.
6. Dimou N.L., Papadimitriou N., Gill D., Christakoudi S., Murphy N., Gunter M.J., Travis R.C., Key T.J., Fortner R.T., Haycock P.C., Lewis S.J., Muir K., Martin R.M., Tsilidis K.K. Sex hormone binding globulin and risk of breast cancer: a Mendelian randomization study. *Int. J. Epidemiol.*, 2019, Vol. 48, no. 3, pp. 807-816.
7. Fortunati N., Catalano M.G., Boccuzzi G., Frairia R. Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG), estradiol and breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2010, Vol. 316, no. 1, pp. 86-92.
8. Girdhar A., Raju K., Prasad K. Association between interleukin 6 immunohistochemical and plasma levels in invasive ductal carcinoma breast: a cross-sectional study. *Biomed Res. Ther.*, 2023, Vol. 10, no. 8, pp. 5843-5854.
9. Gordeeva L.A., Mun S.A., Voronina E.N., Polenok E.G., Sokolova E.A., Verzhbitskaya N.E., Antonov A.V., Lutsenko V.A., Filipenko M.L., Glushkov A.N. Association between cytokine gene polymorphisms and breast cancer in postmenopausal women. *Adv. Gerontol.*, 2021, Vol. 11, no. 1, pp. 44-52.
10. Greiner M., Pfeiffer D., Smith R.D. Principles and practical application of the receiver operating characteristic analysis for diagnostic test. *Prev. Vet. Med.*, 2000, Vol. 45, pp. 23-41.
11. Hacking S.M., Wang Y. Practical issues of Ki-67 evaluation in breast cancer clinical practice. *J. Clin. Transl. Pathol.*, 2022, Vol. 2, no. 2, pp. 53-56.
12. Harrod A., Lai C.F., Goldsbrough I., Simmons G.M., Oppermans N., Santos D.B., Györfy B., Allsopp R.C., Toghiani B.J., Balachandran K., Lawson M., Morrow C.J., Surakala M., Carnevalli L.S., Zhang P., Guttery D.S., Shaw J.A., Coombes R.C., Buluwela L., Ali S. Genome engineering for estrogen receptor mutations reveals differential

responses to anti-estrogens and new prognostic gene signatures for breast cancer. *Oncogene*, 2022, Vol. 41, no. 44, pp. 4905-4915.

13. Jerne N.K. Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol. Rev.*, 1984, Vol. 79, pp. 5-24.

14. Kozłowski L., Zakrzewska I., Tokajuk P., Wojtukiewicz M.Z. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz. Akad. Med. Białymst.*, 2003, Vol. 48, pp. 82-84.

15. Lafrenie R., Bewick M., Buckner C., Conlon M. Plasma cytokine levels and cytokine genetic polymorphisms in patients with metastatic breast cancer receiving high-dose chemotherapy. *Immuno*, 2023, Vol. 3, no. 1, pp. 16-34.

16. Nielsen T.O., Leung S.C.Y., Rimm D.L., Dodson A., Acs B., Badve S., Denkert C., Ellis M.J., Fineberg S., Flowers M., Kreipe H.H., Laenkholm A.V., Pan H., Penault-Llorca F.M., Polley M.Y., Salgado R., Smith I.E., Sugie T., Bartlett J.M.S., McShane L.M., Dowsett M., Hayes D.F. Assessment of Ki67 in breast cancer: updated recommendations from the international Ki67 in breast cancer working group. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 2021, Vol. 113, no. 7, pp. 808-819.

17. Peng X., Shi J., Sun W., Ruan X., Guo Y., Zhao L., Wang J., Li B. Genetic polymorphisms of IL-6 promoter in cancer susceptibility and prognosis: a meta-analysis. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 15, pp. 12351-12364.

18. Pruthi S., Yang L., Sandhu N.P., Ingle J.N., Beseler C.L., Suman V.J., Cavalieri E.L., Rogan E.G. Evaluation of serum estrogen-DNA adducts as potential biomarkers for breast cancer risk. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2012, Vol. 132, no. 1-2, pp. 73-79.

19. Yager J.D. Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention – A review. *Steroids*, 2015, Vol. 99 (Pt A), pp. 56-60.

20. Zhu R.M., Lin W., Zhang W., Ren J.T., Su Y., He J.R., Lin Y., Su F.X., Xie X.M., Tang L.Y., Ren Z.F. Modification effects of genetic polymorphisms in FTO, IL-6, and HSPD1 on the associations of diabetes with breast cancer risk and survival. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 6, e0178850. doi: 10.1371/journal.pone.0178850.

---

#### Авторы:

**Поленок Е.Г.** — к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

**Гордеева Л.А.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

**Костянко М.В.** — ведущий инженер кафедры фундаментальной и прикладной химии Института фундаментальных наук ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

**Антонов А.В.** — заведующий отделением опухолей молочной железы ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

**Байрамов П.В.** — к.м.н., заведующий патологоанатомическим отделением ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

#### Authors:

**Polenok E.G.**, PhD (Pharmacy), Leading Researcher, Immunochemistry Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

**Gordeeva L.A.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

**Kostyanko M.V.**, Leading Engineer, Department of Fundamental and Applied Chemistry, Institute of Fundamental Sciences, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

**Antonov A.V.**, Head, Breast Cancer Department, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

**Bayramov P.V.**, Head, Pathoanatomical Department, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

**Вержбицкая Н.Е.** — к.м.н., врач-патологоанатом патологоанатомического отделения ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

**Захаров В.Н.** — главный врач ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

**Колпинский Г.И.** — д.м.н., профессор кафедры лучевой диагностики, лучевой терапии и онкологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»; главный врач ГАУЗ «Клинический консультативно-диагностический центр имени И.А. Колпинского», г. Кемерово, Россия

**Глушков А.Н.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

**Verzhbitskaya N.E.**, PhD (Medicine), Pathologist, Pathologoanatomical Department, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

**Zakharov V.N.**, Main Physician, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

**Kolpinskiy G.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Radiology, Radiotherapy and Oncology Kemerovo State Medical University; Main Physician, Kemerovo Clinical Diagnostic Center, Kemerovo, Russian Federation

**Glushkov A.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

---

Поступила 01.12.2024  
Принята к печати 23.03.2025

---

Received 01.12.2024  
Accepted 23.03.2025

## **МИКРОРНК И ГЕНЫ-МИШЕНИ КАК РЕГУЛЯТОРЫ ИММУННЫХ СИГНАЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ**

**Кит О.И., Гвалдин Д.Ю., Петрусенко Н.А., Тимошкина Н.Н.,  
Савченко Д.А., Новикова И.А.**

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ,  
г. Ростов-на-Дону, Россия*

**Резюме.** Колоректальный рак (КРР) относится к числу наиболее распространенных онкозаболеваний в мире, сопряженных с высоким уровнем смертности. В последнее время получили развитие иммунотерапевтические подходы лечения КРР, которые позволили добиться длительной и стойкой ремиссии у определенной группы больных. Успех иммунотерапии зависит от иммунных процессов, сопряженных с онкогенезом в толстой кишке. Ключевую роль в модуляции иммунного окружения опухоли играет активность генов, регулирующих дифференцировку и функции иммунных клеток, а также пул микроРНК, осуществляющих посттранскрипционный контроль экспрессии генов-мишеней. В связи с этим целью нашей работы являлось исследование экспрессионных профилей иммунно-ассоциированных генов и микроРНК для определения иммунных сигнальных механизмов рака толстой кишки и поиска потенциальных терапевтических мишеней. В исследование вошли 18 человек (12 женщин, 6 мужчин, медиана возраста – 66 лет) с диагнозом «ЗНО толстой кишки», проходивших лечение на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии» в 2018-2019 гг. Все опухоли имели статус микросателлитной нестабильности. Транскрипционные профили микроРНК и генов иммунного ответа были определены методом секвенирования следующего поколения. По результатам исследования, количество дифференциально экспрессирующихся в опухоли микроРНК составило 28, из них 15 микроРНК с повышенной экспрессией и 13 микроРНК с пониженной экспрессией. Из 395 исследованных генов дифференциально экспрессирующимися были 156, среди которых 62 гена обладали повышенной экспрессией и 94 – пониженной. Идентификация клеточных популяций на основании транскрипционного паттерна опухолей выявила присутствие 4 типов иммунных клеток: нейтрофилы, В-лимфоциты, CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты и макрофаги М1. Нейтрофилы оказались наиболее распространенным типом клеток (16 из 18 образцов). Поэтапный анализ наличия возможных связей между транскрипционными паттернами позволил отобрать 713 пар микроРНК-мРНК. После фильтрации по валидированным взаимодействиям количество пар составило 24, на основании чего была скон-

### **Адрес для переписки:**

*Петрусенко Наталья Александровна  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ  
344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63.  
Тел.: 8 (863) 200-10-00, 300-02-00.  
E-mail: petrusenko-natulya@mail.ru*

### **Address for correspondence:**

*Natalia A. Petrusenko  
National Medical Research Centre for Oncology  
63 14<sup>th</sup> Line  
Rostov-on-Don  
344037 Russian Federation  
Phone: +7 (863) 200-10-00, 300-02-00.  
E-mail: petrusenko-natulya@mail.ru*

### **Образец цитирования:**

*О.И. Кит, Д.Ю. Гвалдин, Н.А. Петрусенко,  
Н.Н. Тимошкина, Д.А. Савченко, И.А. Новикова  
«МикроРНК и гены-мишени как регуляторы иммунных  
сигнальных механизмов рака толстой кишки»  
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 4.  
С. 775-788. doi: 10.15789/1563-0625-MAT-3150  
© Кит О.И. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0*

### **For citation:**

*O.I. Kit, D.Yu. Gvaldin, N.A. Petrusenko, N.N. Timoshkina,  
D.A. Savchenko, I.A. Novikova "MicroRNAs and target genes  
as regulators of colon cancer immune signaling", Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025,  
Vol. 27, no. 4, pp. 775-788.  
doi: 10.15789/1563-0625-MAT-3150  
© Kit O.I. et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-MAT-3150*

струирована сеть взаимодействий микроРНК-мРНК, которая участвовала в регуляции множества иммунных сигнальных механизмов и контроля клеточного цикла. В большинстве выделенных сигналингах присутствовал *CDK1*, для которого известны доступные терапевтические ингибиторы, находящиеся на разных этапах клинических испытаний. Описанные в работе возможности воздействия на *CDK1* могут послужить заделом для дальнейших клинических исследований и разработке терапевтических стратегий, основанных на молекулярно-селективном подавлении иммунных механизмов онкогенеза колоректального рака.

*Ключевые слова:* транскриптом, микроРНК, иммунное микроокружение, колоректальный рак, NGS, *CDK1*, таргетная терапия

## MiRNAs AND TARGET GENES AS REGULATORS OF COLON CANCER IMMUNE SIGNALING

Kit O.I., Gvaldin D.Yu., Petrusenko N.A., Timoshkina N.N.,  
Savchenko D.A., Novikova I.A.

*National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation*

**Abstract.** Colorectal cancer (CRC) is among the most common oncological diseases in the world, associated with a high mortality rate. Recently, immunotherapeutic approaches to the treatment of CRC have been developed, which have enabled achievement of long-term and stable remission in a certain group of patients. The success of immunotherapy depends on the immune processes associated with oncogenesis in the colon. The key role in modulating immune environment of the tumor is played by the activity of genes regulating differentiation and functions of immune cells, as well as by a variety of microRNAs that perform post-transcriptional expression control of target genes. In this regard, the aim of our work was to study the expression profiles of immune-associated genes and microRNAs to determine the immune signaling mechanisms of colon cancer and search for potential therapeutic targets. The study included 18 persons (12 women, 6 men, median age – 66 years) diagnosed with colon cancer, having been treated at the National Medical Research Center of Oncology in 2018-2019. All tumors had microsatellite instability status. The transcription profiles of microRNAs and immune response genes were determined by next-generation sequencing. The study has revealed 28 differentially expressed microRNAs in the tumor tissues, including 15 microRNAs with increased expression and 13 microRNAs with decreased expression. Of the 395 genes examined, 156 were differentially expressed, including 62 genes with increased expression and 94 genes with decreased activity. Identification of cell populations based on the transcriptional pattern of tumors has discerned four types of immune cells: neutrophils, B lymphocytes, CD8<sup>+</sup>T lymphocytes, and M1 macrophages. Neutrophils were the most common cell type (16 of 18 samples). A stepwise analysis of possible relationships between transcriptional patterns allowed us to select 713 miRNA-mRNA pairs. After filtering by validated interactions, 24 such pairs were found. On this basis, a miRNA-mRNA interaction network was constructed, which could be involved into the regulation of multiple immune signaling mechanisms and cell cycle control. Most of the revealed signaling pathways contained *CDK1*, for which therapeutic inhibitors are known, being at different stages of clinical trials. The possibilities of influencing *CDK1* described in the present work may be used for further clinical studies and development of therapeutic strategies employing selective molecular suppression of immune-mediated carcinogenesis in colorectal cancer.

*Keywords:* transcriptome, microRNA, immune microenvironment, colorectal cancer, NGS, *CDK1*, targeted therapy

### Введение

На сегодняшний день колоректальный рак (КРР) удерживает лидирующие позиции среди злокачественных нозологий по распространен-

ности (2-е место) и числу летальных исходов (3-е место) в мире [32]. Тенденция роста заболеваемости КРР актуальна и для России. По данным за 2020 г., темп прироста рака ободочной кишки составил 2,62%, рака прямой кишки, ректосиг-

моидного соединения, ануса – 1,62% [2]. Основные схемы лечения КРР включают хирургическое вмешательство в сочетании с химио- и/или радиотерапией. В последнее время получили развитие иммунотерапевтические подходы, которые позволили добиться длительной и стойкой ремиссии у больных КРР с определенной молекулярно-генетической классификацией [1, 44]. В первую очередь, успех иммунотерапии зависит от микроокружения опухоли и иммунных процессов, модифицированных в ходе онкогенеза КРР. Современные методы секвенирования следующего поколения открывают широкие перспективы для изучения экспрессионных профилей микроРНК и соответствующих генов-мишеней не только опухолевых клеток, но и иммунных клеток, стромальных клеток и других внеклеточных компонентов. Изучение данных экспрессионных изменений представляется ключом к пониманию иммунных сигнальных механизмов КРР и необходимым этапом для дальнейшего совершенствования иммунотерапевтических подходов.

**Целью нашей работы** являлось исследование экспрессионных профилей иммунно-ассоциированных генов и микроРНК для определения иммунных сигнальных механизмов рака толстой кишки и поиска потенциальных терапевтических мишеней.

## Материалы и методы

В исследование вошло 18 человек (медиана возраста – 66 лет) с диагнозом КРР, проходивших лечение на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии» в 2018-2019 (табл. 1). Материалом послужили 24 образца тотальной РНК: 18 образцов экстрагированы из первичной опухоли, 6 – из нормальной ткани. Выделение тотальной РНК проводили по протоколу изготовителя Trizol (Thermo Fisher Scientific, США). Исследуемые образцы были подвергнуты секвенированию следующего поколения с использованием наборов AmpliSeq for Illumina Immune Response Panel (Illumina, США) и TruSeq Small RNA Library Preparation Kits (Illumina, США) в соответствии с протоколом производителя.

Для анализа дифференциальной экспрессии генов и микроРНК в опухолевой ткани использовали пакет DESeq2 программной вычислительной среды R 4.3.2 [23]. Для последующих аналитических этапов отбирали дифференциально экспрессирующиеся гены и микроРНК, удовлетворяющие условиям:  $|\log_2FC| > 1$  и  $p < 0,05$ . Определение типов иммунных клеток осуществляли с использованием пакета quantiseq. В ос-

нове данного пакета лежит модель-классификатор, которая на основании экспрессионных изменений генов, специфичных для каждого из 10 иммунных типов клеток (сигнатура TIL10), определяет, к какому типу относятся иммунные клетки, входящие в состав исследуемого образца [24]. Определяли наличие возможных связей микроРНК-мРНК с помощью пакета miRLAB и таких статистических методов и методов машинного обучения, как тест ранговой корреляции Спирмена, причинно-следственный анализ (causal inference), регрессионный анализ lasso и elastic-net [21]. В финальную сеть взаимодействий отбирали пары микроРНК-мРНК с помощью пакета multiMiR и баз данных miRecords, miRTarBase и TarBase [30]. Для конструирования сети взаимодействий микроРНК-мРНК применяли Cytoscape [34]. Анализ обогащения по функциональной принадлежности проводили с использованием пакета pathfindR и баз данных KEGG, Reactome и BioCarta [40]. Поиск мишеней для таргетной терапии основывался на веб-ресурсе canSAR и данных о доступности белковых молекул для потенциальных терапевтических лигандов [7]. Сеть взаимодействий белка-мишени с другими белками и терапевтическими лигандами конструировали при помощи STITCH [20].

## Результаты

Все опухоли имели статус микросателлитной нестабильности высокой (MSI-H) или низкой (MSI-L) степени, 2 опухоли имели мутации V600E в гене *BRAF*, 4 опухоли мутации во втором экзоне гена *KRAS*, в гене *NRAS* мутаций не обнаружено (табл. 1).

В ходе исследования обнаружено 28 дифференциально экспрессирующихся микроРНК ( $|\log_2FC| > 1$ ;  $p < 0,05$ ): 15 микроРНК с повышенной экспрессией и 13 микроРНК с пониженной экспрессией (рис. 1А). Количество дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) составило 156 ( $|\log_2FC| > 1$ ;  $p < 0,05$ ), среди которых 62 гена обладали повышенной экспрессией и 94 гена – пониженной (рис. 1Б).

Идентификация клеточных популяций, вносящих вклад в изменения экспрессии микроРНК и генов, выявила преимущественно 4 типа иммунных клеток (рис. 2): В-лимфоциты, нейтрофилы, CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты и макрофаги M1. Нейтрофилы оказались наиболее распространенным типом клеток и единственной иммунной клеточной популяцией для 10 из 18 опухолевых образцов. Примечательно, что В-лимфоциты превалировали в паре образцов 4С

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS

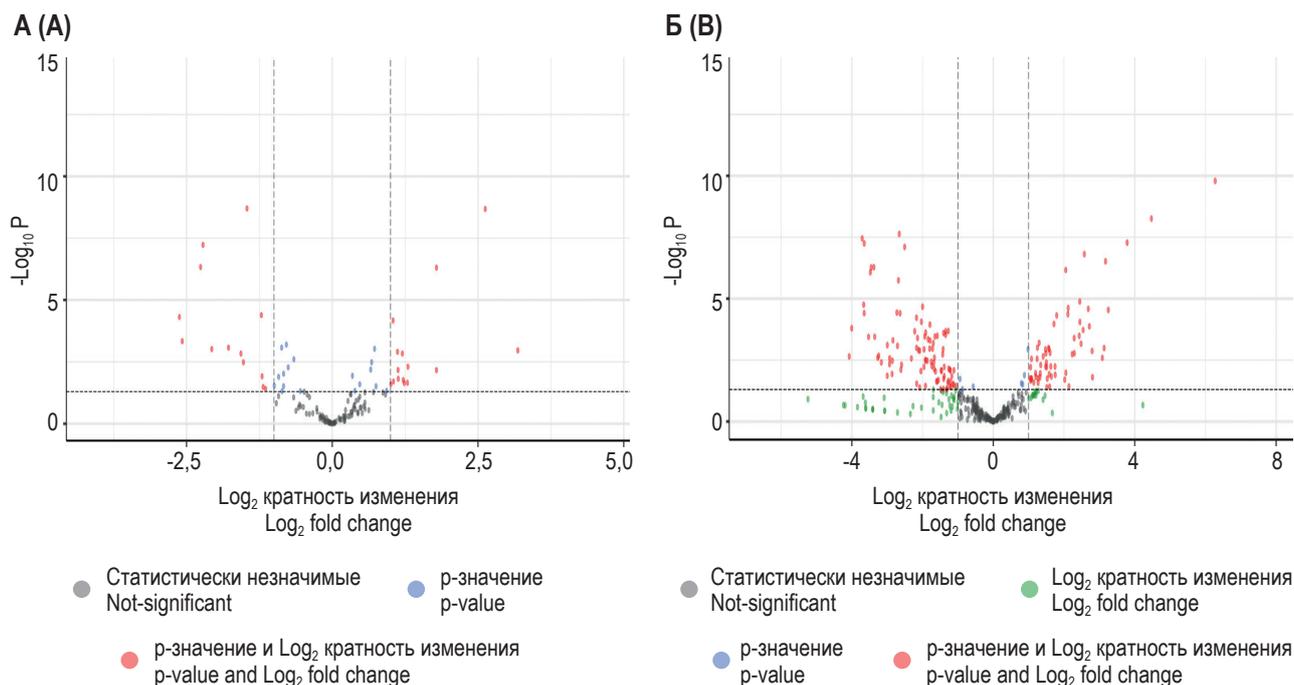
Параметры Parameters	Частота, абс. (%) Frequency, abs. (%)
<b>Возраст</b> Age	
< 40	1 (5,6%)
40-60	4 (22,2%)
> 60	13 (72,2%)
<b>Медиана, лет</b> Median, years	66
<b>Пол</b> Gender	
<b>Мужчины</b> Men	5 (27,8%)
<b>Женщины</b> Women	13 (72,2%)
<b>Стадия заболевания</b> Stage of the disease	
II	5 (27,8%)
III	12 (66,7%)
IV	1 (5,6%)
<b>Локализация КРР</b> Localization of CRC	
<b>Левосторонняя (C18.0, C18.2, C18.3)</b> Left-handed (C18.0, C18.2, C18.3)	8 (44,4%)
<b>Правосторонняя (C18.5, C18.6, C18.7, C19)</b> Right-hand (C18.5, C18.6, C18.7, C19)	10 (55,6%)
<b>Молекулярно-генетические исследования</b> Molecular genetic research	
<b>mutKRAS</b>	4 (22,2%)
<b>mutNRAS</b>	0
<b>mutBRAF</b>	2 (11,1%)
<b>MSI</b>	18 (100%)
<b>MSI-H</b>	12 (66,7%)
<b>MSI-L</b>	6 (33,3%)

и 84С, а образцы 35С и 52С имели сходные распределение CD8<sup>+</sup>T-лимфоциты и нейтрофилов.

Поэтапный анализ наличия возможных микроРНК-мРНК связей позволил отобрать 713 пар, в том числе 114 пар микроРНК-мРНК было идентифицировано с помощью корреляционного анализа, 482 пары – с помощью causal inference, 19 пар – по результатам регрессионного анализа elastic-net, 98 пар – по результатам регрессионного анализа lasso. При фильтрации по валидированным взаимодействиям количество пар сократилось до 24. На их основании была скон-

струирована сеть взаимодействий микроРНК-мРНК (рис. 3).

Обнаруженные пары микроРНК-мРНК были использованы для установления их связи с сигнальными механизмами, описанными в базах данных KEGG (рис. 4А), BioCarta (рис. 4Б), Reactome (рис. 4В). Особенно стоит отметить дифференциально экспрессирующиеся гены *CXCL1*, *CXCL10*, *MAD2L1*, *MYC*, *PSMB9* и *CDK1*, которые оказались задействованы практически во всех выше упоминавшихся сигнальных механизмах.



**Рисунок 1. График рассеивания дифференциально экспрессирующихся (А) микроРНК и (Б) генов**

**Примечание.** Серым цветом выделены микроРНК и гены со статистически не значимыми изменениями экспрессии ( $|\text{Log}_2\text{FC}| \leq 1$  и  $p \geq 0,05$ ); зеленым цветом выделены микроРНК и гены, изменения экспрессии которых удовлетворяет условию  $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1$ , синим цветом выделены микроРНК и гены, изменения экспрессии которых удовлетворяет условию  $p < 0,05$ ; красным цветом выделены микроРНК и гены, изменения экспрессии которых удовлетворяет обоим условиям  $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1$  и  $p < 0,05$ .

Figure 1. Scatter plot of differentially expressed (A) microRNAs and (B) genes

Note. MicroRNAs and genes with statistically insignificant expression changes ( $|\text{Log}_2\text{FC}| \leq 1$  and  $p \geq 0.05$ ) are highlighted in gray; microRNAs and genes whose expression changes satisfy the condition  $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1$  are highlighted in green; microRNAs and genes whose expression changes satisfy the condition  $p < 0.05$  are highlighted in blue; microRNAs and genes whose expression changes satisfy both conditions  $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1$  and  $p < 0.05$  are highlighted in red.

## Обсуждение

Стремительно накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что иммунное микроокружение играет ключевую роль в развитии и опухолевом росте, метастазировании, прогрессировании колоректального рака и формировании химиорезистентности [12]. Микроокружение опухоли обладает сложной гетерогенной структурой, представленной, помимо опухолевых клеток, различными типами иммунных клеток, стромальными клетками, адипоцитами, фибробластами и внеклеточным матриксом [27]. Клеточный состав иммунного окружения тесно связан с молекулярным подтипом КРР. Так, подтип КРР с MSI-статусом характеризуется высоким уровнем цитотоксических лимфоцитов ( $\text{CD8}^+$ Т-клетки) и макрофагов [38]. На молекулярно-генетическом уровне изменения, характерные для иммунного профиля опухоли, могут существенно варьировать внутри одного молекулярного подтипа. Ранее Kim J.H. и соавт. сообщали о мутационных и экспрессионных различиях, наблюдаемых в

образцах опухолей, принадлежащих к разным подтипам КРР [17]. Авторы классифицировали исследуемые опухоли с MSI-статусом на основании уровня опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и активности третичных лимфоидных структур на три подгруппы: подгруппа с низким уровнем иммунитета, подгруппа с промежуточным уровнем иммунитета и подгруппа с высоким уровнем иммунитета. Для подгруппы с высоким уровнем иммунитета оказались характерны слияния генов тирозинкиназ, повышение экспрессии *CTSC*, *CCL5*, *CCL18*, *CXCL9* и дисрегуляция сигнальных путей *IL-2-STAT5*, *IL-6-JAK-STAT3*,  $\alpha/\gamma$ -интерферонов. Тогда как для подгруппы с низким уровнем иммунитета были свойственны мутации *KRAS*, сверхэкспрессия *POSTN*, *ZEB1*, *SFRP2* и дисрегуляция сигнальных путей *WNT/\beta*-катенин и *NOTCH* [17]. Gherman A. и соавт. считают, что различия в экспрессионных профилях генов опухолей, принадлежащих подтипу CMS1, обусловлены активностью различных паттернов микроРНК. Проведя комплексный метаанализ

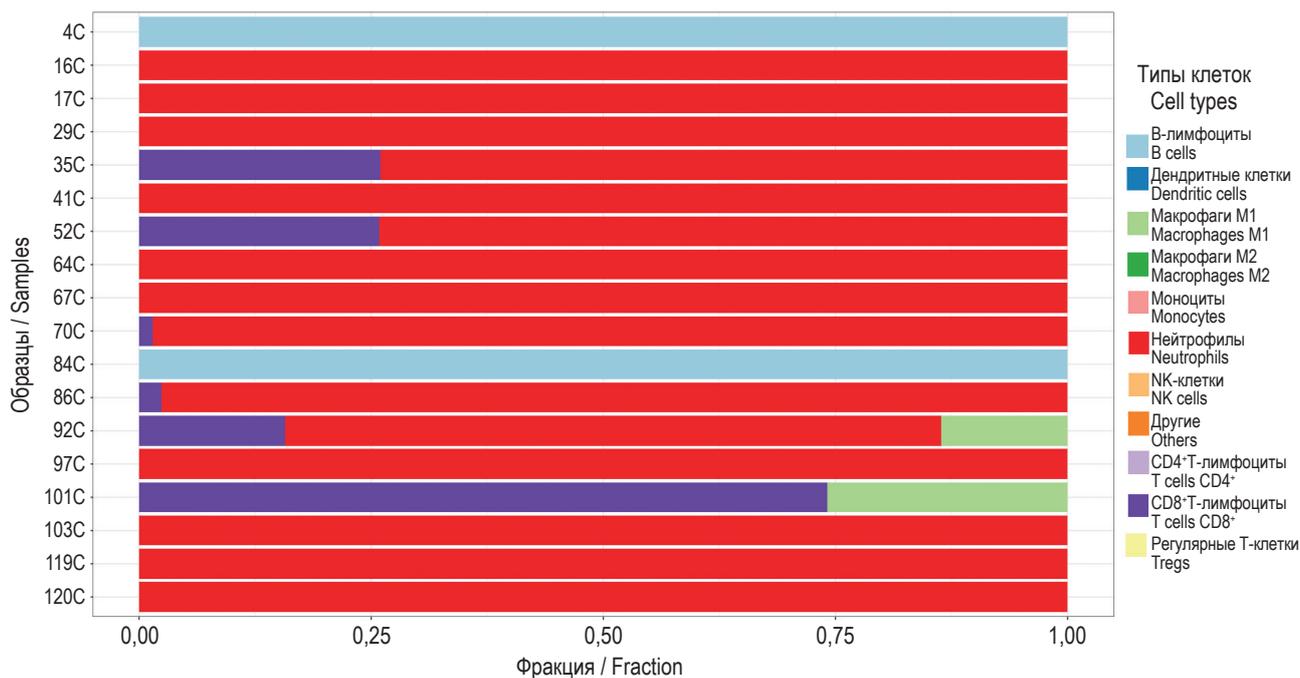


Рисунок 2. Распределение иммунных клеточных популяций среди исследуемых опухолевых образцов пациентов с КРП

Figure 2. Distribution of immune cell populations among the studied tumor samples of patients with CRC

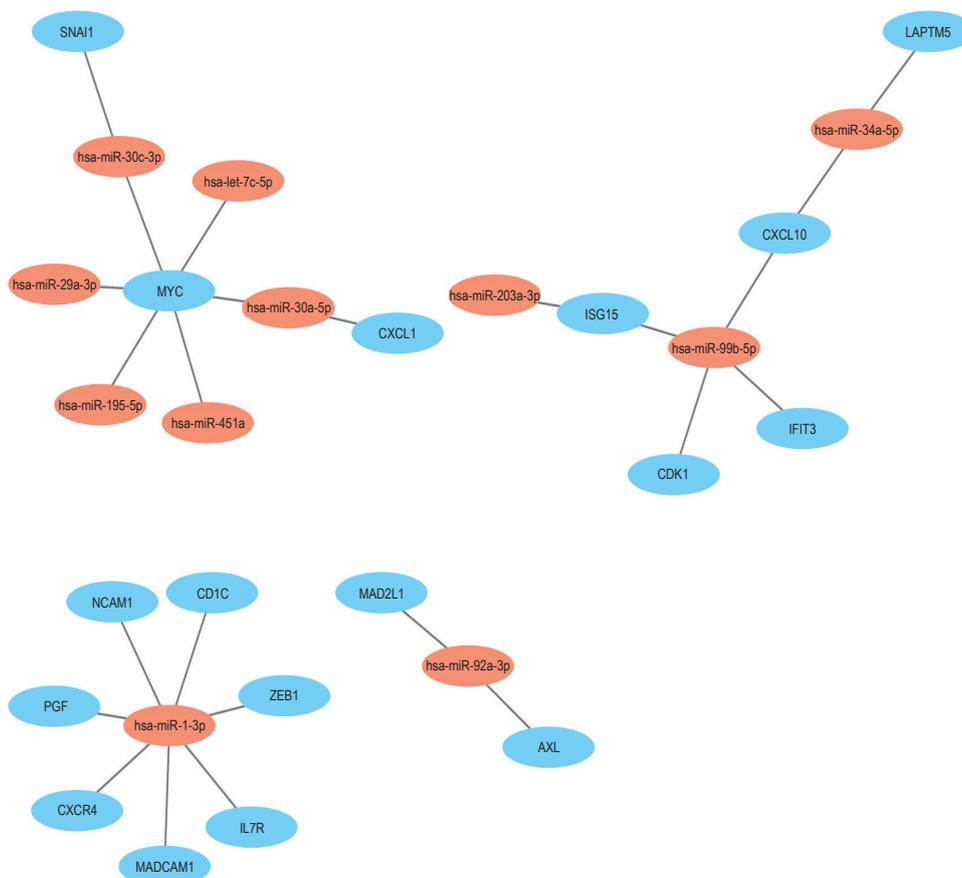


Рисунок 3. Сеть взаимодействий микроРНК-мРНК

Figure 3. Network of microRNA-mRNA interactions

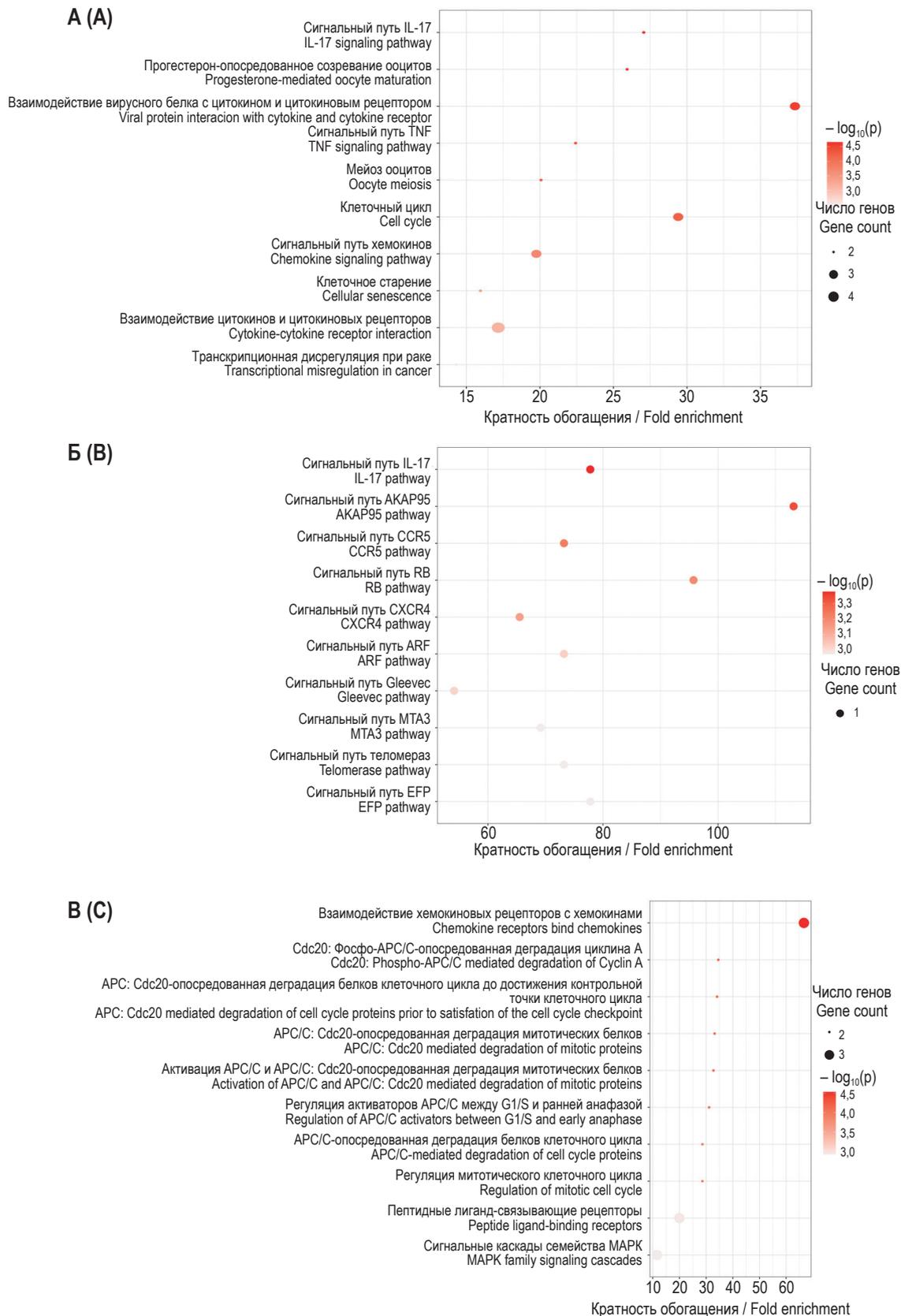


Рисунок 4. Анализ обогащения по функциональной принадлежности: А – сигнальные пути из KEGG, Б – сигнальные пути из BioCarta и В – сигнальные пути из Reactome

Figure 4. Functional enrichment analysis: A, pathways from KEGG; B, pathways from BioCarta, and C, pathways from Reactome

работ, опубликованных по 2023 г. включительно, авторы установили, что микроРНК способны модулировать экспрессию иммуно-ассоциированных онкобелков, таких как PD-L1, и тем самым выступать в качестве промежуточного звена в механизмах иммунного уклонения [10].

Нами был исследован спектр иммуно-ассоциированных микроРНК и их генов, дифференциально экспрессирующихся у больных КРР подтипа CMS1. По результатам исследования были определены экспрессионные профили опухолевой ткани, в которые вошли 28 микроРНК и 156 генов. Экспрессионные изменения микроРНК и генов свидетельствовали о превалировании в клеточном составе иммунного микроокружения В-лимфоцитов, нейтрофилов, CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и макрофагов M1.

Согласно классической парадигме, макрофаги M1 участвуют в подавлении опухолевого роста и в иммуностимуляции [19]. В норме M1-макрофаги индуцируют апоптоз за счет секреции TNF $\alpha$  и оксида азота NO [46]. Тем не менее с каждым годом появляются новые подтверждения проонкогенной роли макрофагов M1 при КРР. Как было показано Koelzer V.H. и соавт., преобладание в иммунном микроокружении iNOS<sup>+</sup> макрофагов M1 ассоциируется с наличием метастазов в лимфоузлах и неблагоприятным прогнозом [18]. Данный тип клеток способен выделять VEGF, который участвует в ангиогенных процессах. Индукция ангиогенеза обеспечивает опухоль достаточным количеством питательных веществ и кислорода для последующего роста [33]. Еще одним ключевым компонентом в структуре иммунного микроокружения являются нейтрофилы. В процессе онкогенеза нейтрофилы трансформируются в опухоль-ассоциированные нейтрофилы (TAN). TGF- $\beta$  в опухолевом микроокружении индуцирует их переход в N1 или N2-типы [39]. Развитие и прогрессирование КРР связано с тесным взаимодействием интерлейкинов и TAN. Так, хемокины CXCL8, выделяемые опухолевыми клетками, способны рекрутировать TAN, миелоидные супрессорные клетки и моноциты. TAN, в свою очередь, высвобождают MMP2, MMP9, ARG1 и IDO, обладающие ангиогенной и иммуносупрессивной активностями, и тем самым способствуют прогрессированию опухоли [25]. TAN также активно секретируют цитокины IL-17, IL-23 и TNF $\alpha$ , которые могут активировать сигнальный путь Akt/p38. Активация данного сигнального механизма запускает превращение мезенхимальных стволовых клеток в опухолевые фибробласты и индуцирует пролиферацию опухолевых клеток [47]. Однако уча-

стие TAN в прогрессировании опухолей КРР не ограничивается вышеописанными механизмами. TAN способны поляризоваться в проопухолевый тип N2. Один из известных механизмов, индуцирующий поляризацию TAN, реализуется через экзосомы. Экзосомы, выделяемые опухолевыми клетками, несут белковый медиатор HMGB1, который способен взаимодействовать с рецептором TLR4 и запускать сигнальный путь NF- $\kappa$ B, что в конечном счете приводит к поляризации TAN [48].

В последнее время TAN рассматриваются как основной барьер, препятствующий иммунотерапии, так как в активном состоянии они способны высвобождать аргиназу-1 с последующей выработкой NO, что приводит к подавлению иммунного ответа. TAN также могут ингибировать пролиферацию Т-клеток через сигнальный механизм PD-L1/PD-1 [51]. В связи с этим наличие MSI-статуса не может гарантировать эффективность иммунотерапии. Интересно, что по данным Sun Z. и соавт. размеры фракций макрофагов M1 и нейтрофилов иммунного микроокружения достоверно больше в группе больных КРР с MSI-статусом по сравнению с группой больных КРР с MSS-статусом [38].

CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты являются эффекторными клетками адаптивной иммунной системы, они распознают антигены, представленные молекулами МНС I на поверхности клеток-мишеней. CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты выполняют противоопухолевую роль, поскольку способны аккумулировать цитотоксические молекулы гранзима, перфорина или FasL и уничтожить злокачественные опухолевые клетки [50]. Хемокины CXCL9, CXCL10 и CXCL11 обеспечивают рекрутировку CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в опухоль. На их поверхности локализованы рецепторы CXCR3, которые связывают хемокины и позволяют CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитам проникнуть в опухоль [5].

Микросателлитная нестабильность опухоли приводит к синтезу неоантигенов опухолевыми клетками, а экспрессия неоантигенов, как правило, сопряжена с высокой инфильтрацией CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов [43]. Размер фракций макрофагов M1 и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов может выступать в качестве предиктора эффективности иммунотерапии. Как было показано в недавнем исследовании, включавшем 473 пациента с диагнозом КРР, фракция макрофагов M1 положительно коррелировала, а фракция CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов отрицательно коррелировала с прогрессированием опухоли [13].

В-лимфоциты выполняют двойную функцию в иммунном микроокружении опухоли. С одной

стороны, как антигенпрезентирующие клетки, продуценты цитокинов или участники прямого уничтожения опухолевых клеток, В-лимфоциты могут проявлять противоопухолевую активность. С другой стороны, среди В-лимфоцитов выделяют субпопуляцию регуляторных В-клеток, которые через секрецию IL-10, TGF- $\beta$  и IL-35 реализуют проонкогенный эффект [26]. Ранее сообщалось, что размер фракции В-лимфоцитов иммунного микроокружения КРР положительно коррелировал со снижением общей выживаемости больных [36]. У больных на более продвинутых стадиях преобладает инфильтрация опухолей регуляторными В-клетками [35]. Показано, что регуляторные В-клетки участвуют в развитии M2-подобных макрофагов, которые индуцируют создание толерогенной среды, что приводит к прогрессированию опухоли и снижению общей выживаемости больных с КРР [16].

В целом, учитывая вышеперечисленные факты, распределение иммунных клеточных популяций не дает однозначного ответа, какие свойства иммунного микроокружения опухолей толстой кишки преобладают – противоопухолевые или онкогенные. Более точные представления о вкладе в онкогенез иммуно-ассоциированных генов и таргетирующих их микроРНК были получены в ходе анализа сигнальных путей.

Результаты свидетельствовали о том, что среди сигнальных механизмов, подверженных изменениям, значительная доля приходилась на сигнальные пути, включавшие цитокины. Прежде всего стоит отметить сигнальный путь IL-17, IL-7 и взаимодействие хемокиновых рецепторов с хемокинами. Не менее значимой представляется активация классических онкогенных механизмов, к которым можно отнести сигнальную регуляцию клеточного цикла.

Сигнальный путь IL-17 тесно связан с активностью и размерами фракций следующих популяций иммунных клеток опухолевого микроокружения: Т-хелперы-17, НК-клетки, CD8<sup>+</sup> $\gamma\delta$ Т-клетки, нейтрофилы, эозинофилы, макрофаги и дендритные клетки [28]. IL-17 способен активировать экспрессию множества генов, в том числе интерлейкинов (IL-6, IL-19, IL-20, IL-24 и TNF $\alpha$ ), гранулоцитарно-колониестимулирующего фактора (G-CSF), хемокинов (IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CCL2, CCL7 и CCL20), матриксной металлопротеиназы-13 (MMP13), лиганда активатора рецептора ядерного фактора  $\kappa$ B (RANKL) и антимикробных пептидов (липокалин 2,  $\beta$ -дефенсин-2, S100A7 и S100A8/9) [11]. Подтверждением служит гиперэкспрессия CXCL1 и CXCL10 в настоящем исследовании. Активация

сигнального пути IL-17 сопряжена с онкогенными процессами, такими как рекрутировка и активация нейтрофилов, привлечение миелоидных супрессорных клеток, сокращение популяции CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, подавление апоптоза, что в совокупности способствует пролиферации, росту и выживанию опухолевых клеток [4, 15, 29, 37].

В отличие от сигнального пути IL-17, сигнальным механизмам, ассоциированным с IL-7, приписывают исключительно противоопухолевую роль. Источником IL-7 являются преимущественно стромальные и эпителиальные клетки, в меньшей степени – дендритные клетки, тогда как его рецептор, IL-7R может экспрессироваться в естественных киллерах, дендритных предшественниках, в зрелых Т-лимфоцитах и макрофагах, в развивающихся Т-лимфоцитах и В-лимфоцитах [6]. IL-7, взаимодействуя с соответствующим рецептором, способен привлекать Т-лимфоциты и обеспечивать их проникновение в опухоль. Он усиливает цитотоксические свойства Т-лимфоцитов и индуцирует лимфокин-активированные киллеры. Кроме того, IL-7 может выступать как цитотоксический агент, стимулирует нейтрофилы, которые высвобождают IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  и IL-1 $\alpha$  [9]. Результаты нашего исследования свидетельствовали о снижении экспрессии IL-7R, что позволяет предположить возможное ингибирование сигнального пути IL-7 и существенное ограничение его противоопухолевого потенциала у больных с ЗНО толстой кишки, имеющих MSI-статус.

Взаимодействие хемокинов с соответствующими рецепторами представляет собой обширную сигнальную сеть, которая, будучи неотъемлемой частью иммунного микроокружения опухоли, участвует в прогрессировании КРР. В нашем исследовании определенный вклад в данную сигнальную сеть вносят гиперэкспрессия CXCL1, CXCL10 и снижение экспрессии CXCR4. Хемокин CXCL1 секретируется опухолевыми клетками и взаимодействует с рецепторами CXCR2, локализованными на TAN, что приводит к рекрутировке TAN в опухоль, аккумуляции VEGF и ангиогенезу [42]. Кроме того, сообщалось, что сверхэкспрессия CXCL1 в опухолевых клетках толстой кишки приводит к увеличению числа кровеносных сосудов в опухоли и значительно ускоряет рост рака толстой кишки. Такой эффект достигается благодаря активации сигнального пути NF- $\kappa$ B/P300 [52]. Уровень экспрессии hsa-miR-30a-5p, микроРНК, нацеленной на CXCL1, снижается, что может свидетельствовать об ослаблении ограничений, сдерживающих онкогенный потенциал хемокина у больных с ЗНО

в нашем исследовании. Источником CXCL10 также может служить опухолевая ткань кишки. Данный хемокин взаимодействует с рецептором CXCR3, локализованном на поверхности мембраны Т-лимфоцитов, активирует сигнальный путь PI3K/Akt, что способствует эпителиально-мезенхимальному переходу и метастазированию опухоли [41]. Нами определены микроРНК, мишенью которых является CXCL10 – hsa-miR-99b-5p и hsa-miR-34a-5p. Интересно, что экспрессионные профили данных микроРНК различались: уровень hsa-miR-99b-5p снижался, тогда как для hsa-miR-34a-5p был характерен повышенный уровень экспрессии. То есть ожидаемой отрицательной корреляцией были связаны динамика экспрессии hsa-miR-99b-5p и CXCL10, тогда как уровень транскриптов hsa-miR-34a-5p в опухолях оставался высоким.

Трансформация сигнальных путей клеточного цикла необходима для стимулирования пролиферации опухолевых клеток. В ходе онкогенеза часто происходят молекулярные нарушения в контрольных точках G1 и G2. Ослабление функции контрольной точки G2 приводит к хромосомной нестабильности, дисрегуляции генов, связанных с клеточным циклом, что может стать причиной неконтролируемого роста и пролиферации опухолевых клеток [14]. Одним из механизмов дисрегуляции клеточного цикла может выступать перестройка микроРНК-связанного контроля транскрипционной активности иммунно-ассоциированных генов. В нашей работе изменения в микроРНК-профиле отразились на уровне hsa-miR-30c-5, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-92a-3p и hsa-miR-99b-5p. Мишенями данных микроРНК являются гены MYC, MAD2L1 и CDK1.

MYC кодируется одноименным геном и представляет собой транскрипционный фактор, регулирующий транскрипцию 15% экспрессируемых в клетке генов. Помимо регуляции клеточного цикла, он участвует в реализации и других биологических функций, в том числе пролиферации, дифференцировке клеток, апоптозе и метаболизме [3]. Однако MYC известен как протоонкоген, который интенсивно экспрессируется при многих злокачественных патологиях, индуцируя повышение экспрессии генов циклин-зависимых киназ. Кроме того, MYC способен подавлять активность негативных регуляторов клеточного цикла, как, например, p15 [3]. Известно, что высокий уровень экспрессии MYC способствует адаптации опухолевых клеток к стрессу, метаболическому перепрограммированию, иммунному уклонению

и терапевтической резистентности [31]. В нашем исследовании было зафиксировано повышение экспрессии MYC и снижении экспрессии соответствующих таргетирующих микроРНК, за исключением hsa-miR-29a-3p.

Белок митотической контрольной точки сборки веретена деления, MAD2L1, проявляет онкогенные функции. Ранее было показано, что в опухолевых образцах больных с КРР, наблюдается сверхэкспрессия MAD2L1 [8]. В нашей работе также установлено повышение экспрессии MAD2L1, несмотря на высокий уровень экспрессии таргетирующей этот онкоген hsa-miR-92a-3p. В связи с этим можно предположить, что существуют иные эпигенетические факторы, которые обеспечивают сверхэкспрессию MAD2L1.

Циклинзависимая киназа-1, CDK1, является важнейшим драйвером перехода клетки в стадию митоза. Известно, что повышенная транскрипционная активность CDK1 обуславливают быстрый рост опухоли и спонтанную пролиферацию опухолевых клеток. Согласно биоинформационному исследованию Li J. и соавт., сверхэкспрессия CDK1 в опухолевых тканях больных с КРР была сопряжена с неблагоприятным прогнозом и прогрессированием опухоли. Авторы отметили перспективность терапии, нацеленной на CDK1 [22].

В ходе поиска потенциальных мишеней для таргетной терапии нами был выбран именно CDK1 (рис. 5). Ген CDK1 является мишенью hsa-miR-99b-5p. Согласно полученным данным, экспрессия этой пары микроРНК-мРНК была связана отрицательной корреляцией: уровень hsa-miR-99b-5p в опухоли снижался, тогда как уровень экспрессии самого CDK1 вырос. Гиперэкспрессия CDK1 может быть связана с нарушением сигнального пути AKAP95 и RB. В работе Zhang P. и соавт. сообщалось об эффективности применения ингибитора CDK1 dinaciclib, индуцировавшего апоптоз в клеточных линиях КРР. Авторы установили, что сверхэкспрессия CDK1 в сочетании с мутантным BRAF сопряжена с подавлением апоптоза в опухолевой ткани [46]. В отличие от dinaciclib, который способен ингибировать помимо CDK1 также другие циклин-зависимые киназы, существуют CDK1-высокоспецифичные таргетные препараты, такие как RO-3306. В недавнем исследовании было показано, что RO-3306 способен восстанавливать чувствительность опухолевых клеток КРР к препаратам платины [45]. В связи с этим CDK1 представляется перспективной мишенью для терапии КРР.

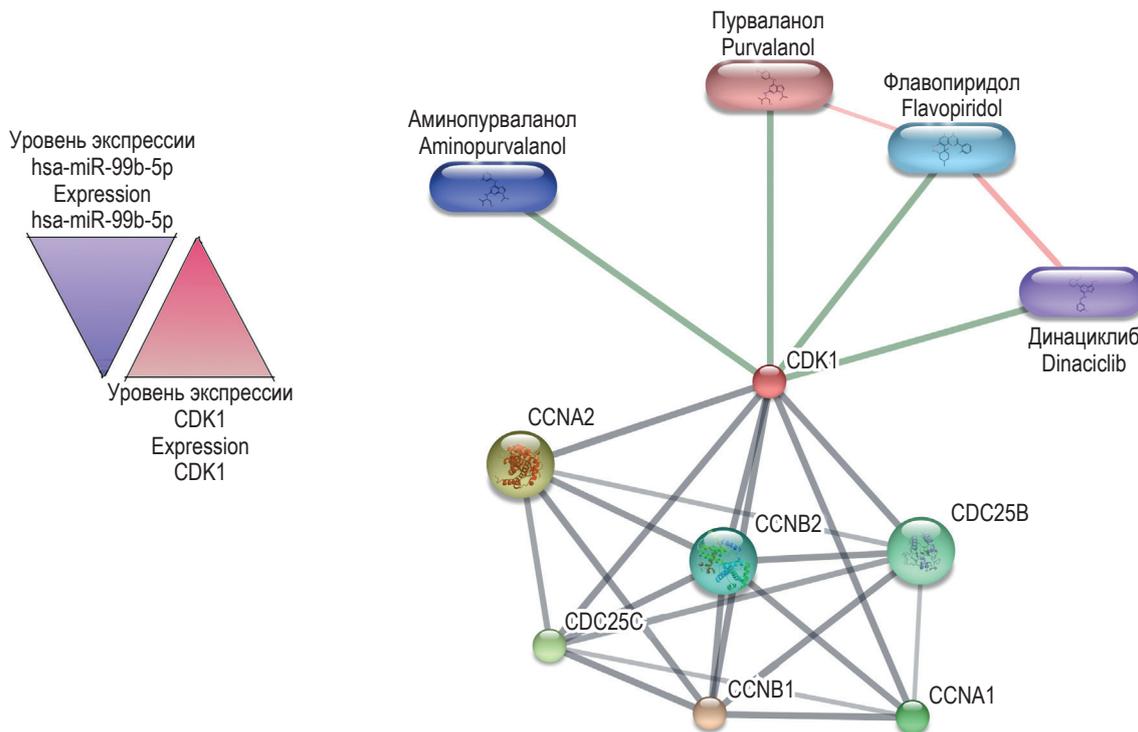


Рисунок 5. Сеть взаимодействий CDK1 с таргетными препаратами и другими белками

Figure 5. Network of CDK1 interactions with targeted drugs and other proteins

## Заключение

Методом высокопроизводительного секвенирования были идентифицированы иммунно-ассоциированные гены-мишени и их микроРНК, дифференциально экспрессирующиеся в опухоли, сконструирована сеть взаимодействий микроРНК-мРНК и определены дисрегулированные иммунные сигнальные механизмы в злокачественных опухолях толстой кишки с микросателлитной нестабильностью. Предполагается, что при КРР имеет место значительный вклад

микроокружения опухоли, обуславливающий дисрегуляцию многих сигнальных путей, в том числе сигнальный путь IL-17, сигнальный путь IL-7, сигнальный путь хемокинов. В сочетании с нарушением клеточного цикла дисрегуляция данных сигнальных путей представляется неотъемлемой частью онкогенеза. Ключевым звеном, участвующим в регуляции вышеперечисленных механизмов, является *CDK1*. Разработка терапевтических схем, нацеленных на ингибирование *CDK1*, может оказаться важным шагом на пути к персонализированной терапии.

## Список литературы / References

1. Кит О.И., Дженкова Е.А., Мирзоян Э.А., Геворкян Ю.А., Сагакянц А.Б., Тимошкина Н.Н., Каймакчи О.Ю., Каймакчи Д.О., Толмах Р.Е., Дашков А.В., Колесников В.Е., Милакин А.Г., Полуэктов С.И. Молекулярно-генетическая классификация подтипов колоректального рака: современное состояние проблемы // Южно-Российский онкологический журнал, 2021. Т. 2, № 2. С. 50-56. [Kit O.I., Dzhenkova E.A., Mirzoyan E.A., Gevorkyan Yu.A., Sagakyants A.B., Timoshkina N.N., Kaymakchi O.Yu., Kaymakchi D.O., Tolmakh R.E., Dashkov A.V., Kolesnikov V.E., Milakin A.G., Poluektov S.I. Molecular genetic classification of colorectal cancer subtypes: current state of the problem. *Yuzhno-Rossiyskiy onkologicheskiy zhurnal = South Russian Journal of Cancer* 2021, Vol. 2, no. 2, pp. 50-56. (In Russ.)]
2. Максимова П.Е., Голубинская Е.П., Сеферов Б.Д., Зяблицкая Е.Ю. Колоректальный рак: эпидемиология, канцерогенез, молекулярно-генетические и клеточные механизмы резистентности к терапии (аналитический обзор) // Колопроктология, 2023. Т. 22, № 2. С. 160-171. [Maksimova P.E., Golubinskaya E.P., Seferov B.D., Zyablitskaya E.Yu. Colorectal cancer: epidemiology, carcinogenesis, molecular subtypes and cellular

mechanisms of therapy resistance (analytical review). *Koloproktologiya = Koloproktologia*, 2023, Vol. 22, no. 2, pp. 160-171. (In Russ.)]

3. Ahmadi S.E., Rahimi S., Zarandi B., Chegeni R., Safa M. MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies. *J. Hematol Oncol.*, 2021, Vol. 14, no. 1, 121. doi: 10.1186/s13045-021-01111-4.

4. Amicarella F., Muraro M.G., Hirt C., Cremonesi E., Padovan E., Mele V., Governa V., Han J., Huber X., Droeser R.A., Zuber M., Adamina M., Bolli M., Rosso R., Lugli A., Zlobec I., Terracciano L., Tornillo L., Zajac P., Eppenberger-Castori S., Trapani F., Oertli D., Iezzi G. Dual role of tumour-infiltrating T helper 17 cells in human colorectal cancer. *Gut*, 2017, Vol. 66, no. 4, pp. 692-704.

5. Bai Z., Zhou Y., Ye Z., Xiong J., Lan H., Wang F. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer: the fundamental indication and application on immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 12, 808964. doi: 10.3389/fimmu.2021.808964.

6. Bednarz-Misa I., Bromke M.A., Krzystek-Korpaczka M. Interleukin (IL)-7 signaling in the tumor microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2021, Vol. 1290, pp. 9-49.

7. Coker E.A., Mitsopoulos C., Tym J.E., Komianou A., Kannas C., Di Micco P., Villasclaras Fernandez E., Ozer B., Antolin A.A., Workman P., Al-Lazikani B. canSAR: update to the cancer translational research and drug discovery knowledgebase. *Nucleic Acids Res.*, 2019, Vol. 47, pp. D917-D922.

8. Ding X., Duan H., Luo H. Identification of core gene expression signature and key pathways in colorectal cancer. *Front. Genet.*, 2020, Vol. 11, 45. doi: 10.3389/fgene.2020.00045.

9. Fu C., Zhang X., Zhang X., Wang D., Han S., Ma Z. Advances in IL-7 research on tumour therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024, Vol. 17, no. 4, 415. doi: 10.3390/ph17040415.

10. Gherman A., Bolundut D., Ecea R., Balacescu L., Curcean S., Dina C., Balacescu O., Cainap C. Molecular subtypes, microRNAs and immunotherapy response in metastatic colorectal cancer. *Medicina (Kaunas)*, 2024, Vol. 60, no. 3, 397. doi: 10.3390/medicina60030397.

11. Guo N., Shen G., Zhang Y., Moustafa A.A., Ge D., You Z. Interleukin-17 promotes migration and invasion of human cancer cells through upregulation of MTA1 expression. *Front. Oncol.*, 2019, Vol. 9, 546. doi: 10.3389/fonc.2019.00546.

12. Han L., Chen S., Luan Z., Fan M., Wang Y., Sun G., Dai G. Immune function of colon cancer associated miRNA and target genes. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1203070. doi: 10.3389/fimmu.2023.1203070.

13. Hao M., Li H., Yi M., Zhu Y., Wang K., Liu Y., Liang X., Ding L. Development of an immune-related gene prognostic risk model and identification of an immune infiltration signature in the tumor microenvironment of colon cancer. *BMC Gastroenterol.*, 2023, Vol. 23, no. 1, 58. doi: 10.1186/s12876-023-02679-6.

14. Holubekova V., Loderer D., Grendar M., Mikolajcik P., Kolkova Z., Turyova E., Kudelova E., Kalman M., Marcinek J., Miklusica J., Laca L., Lasabova Z. Differential gene expression of immunity and inflammation genes in colorectal cancer using targeted RNA sequencing. *Front. Oncol.*, 2023, Vol. 13, 1206482. doi: 10.3389/fonc.2023.1206482.

15. Jiang J.K., Lin C.H., Chang T.A., Lo L.C., Lin C.P., Lu R.H., Yang C.Y. Decreased interleukin-17RA expression is associated with good prognosis in patients with colorectal cancer and inhibits tumor growth and vascularity in mice. *Cancer Med.*, 2024, Vol. 13, no. 5, e7059. doi: 10.1002/cam4.7059.

16. Jordakieva G., Bianchini R., Reichhold D., Piehslinger J., Groschopf A., Jensen S.A., Mearini E., Nocentini G., Crevenna R., Zlabinger G.J., Karagiannis S.N., Klaus A., Jensen-Jarolim E. IgG4 induces tolerogenic M2-like macrophages and correlates with disease progression in colon cancer. *Oncoimmunology*, 2021, Vol. 10, no. 1, 1880687. doi: 10.1080/2162402X.2021.1880687.

17. Kim J.H., Seo M.K., Lee J.A., Yoo S.Y., Oh H.J., Kang H., Cho N.Y., Bae J.M., Kang G.H., Kim S. Genomic and transcriptomic characterization of heterogeneous immune subgroups of microsatellite instability-high colorectal cancers. *J. Immunother. Cancer*, 2021, Vol. 9, no. 12, e003414. doi: 10.1136/jitc-2021-003414.

18. Koelzer V.H., Canonica K., Dawson H., Sokol L., Karamitopoulou-Diamantis E., Lugli A., Zlobec I. Phenotyping of tumor-associated macrophages in colorectal cancer: Impact on single cell invasion (tumor budding) and clinicopathological outcome. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 5, no. 4, e1106677. doi: 10.1080/2162402X.2015.1106677.

19. Konstantinov A.S., Kovaleva O.V., Samoilova D.V., Shelekhova K.V. Role of macrophages in progression of colorectal cancer: a contrast with the traditional paradigm. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2022, Vol. 15, no. 10, pp. 403-411.

20. Kuhn M., von Mering C., Campillos M., Jensen L.J., Bork P. STITCH: interaction networks of chemicals and proteins. *Nucleic Acids Res.*, 2008, Vol. 36, pp. D684-D688.

21. Le T.D., Zhang J., Liu L., Liu H., Li J. miRLAB: An R based dry lab for exploring miRNA-mRNA regulatory relationships. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 12, e0145386. doi: 10.1371/journal.pone.0145386.

22. Li J., Wang Y., Wang X., Yang Q. CDK1 and CDC20 overexpression in patients with colorectal cancer are associated with poor prognosis: evidence from integrated bioinformatics analysis. *World J. Surg. Oncol.*, 2020, Vol. 18, no. 1, 50. doi: 10.1186/s12957-020-01817-8.

23. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, 2014, Vol. 15, no. 12, 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

24. Marini F, Finotello F. quantiseqr: Quantification of the Tumor Immune contexture from RNA-seq data. 2023. Available at: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/quantiseqr.html>.
25. Ogawa R., Yamamoto T., Hirai H., Hanada K., Kiyasu Y., Nishikawa G., Mizuno R., Inamoto S., Itatani Y., Sakai Y., Kawada K. Loss of SMAD4 promotes colorectal cancer progression by recruiting tumor-associated neutrophils via the CXCL1/8-CXCR2 Axis. *Clin. Cancer Res.*, 2019, Vol. 25, no. 9, pp. 2887-2899. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3684.
26. Pieniadz P., Piet M., Paduch R. Characteristics of the colorectal cancer microenvironment – role in cancer progression and therapeutic possibilities. *Appl. Sci.*, 2024, Vol. 14, no. 7, 2930. doi: 10.3390/app14072930.
27. Rajtmajerová M., Trailin A., Liška V., Hemminki K., Ambrozkiwicz F. Long Non-Coding RNA and microRNA interplay in colorectal cancer and their effect on the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)*, 2022, Vol. 14, no. 21, 5450. doi: 10.3390/cancers14215450.
28. Razi S., Baradaran Noveiry B., Keshavarz-Fathi M., Rezaei N. IL-17 and colorectal cancer: From carcinogenesis to treatment. *Cytokine*, 2019, Vol. 116, pp. 7-12.
29. Rodriguez C., Araujo Furlan C.L., Tosello Boari J., Bossio S.N., Boccardo S., Fozzatti L., Canale F.P., Beccaria C.G., Nuñez N.G., Ceschin D.G., Piaggio E., Gruppi A., Montes C.L., Acosta Rodríguez E.V. Interleukin-17 signaling influences CD8<sup>+</sup> T cell immunity and tumor progression according to the IL-17 receptor subunit expression pattern in cancer cells. *Oncoimmunology*, 2023, Vol. 12, no. 1, 2261326. doi: 10.1080/2162402X.2023.2261326.
30. Ru Y., Kechris K.J., Tabakoff B., Hoffman P., Radcliffe R.A., Bowler R., Mahaffey S, Rossi S, Calin G.A., Bemis L., Theodorescu D. The multiMiR R package and database: integration of microRNA-target interactions along with their disease and drug associations. *Nucleic Acids Res.*, 2014, Vol. 42, no. 17, e133. doi: 10.1093/nar/gku631
31. Saeed H., Leibowitz B.J., Zhang L., Yu J. Targeting Myc-driven stress addiction in colorectal cancer. *Drug Resist. Updat.*, 2023, Vol. 69, 100963. doi: 10.1016/j.drup.2023.100963.
32. Sawicki T., Ruszkowska M., Danielewicz A., Niedźwiedzka E., Arlu-kowicz T., Przybyłowicz K.E. A review of colorectal cancer in terms of epidemi-ology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, no. 9, 2025. doi: 10.3390/cancers13092025.
33. Shah A.A., Kamal M.A., Akhtar S. Tumor Angiogenesis and VEGFR-2: Mechanism, pathways and current biological therapeutic interventions. *Curr. Drug Metab.*, 2021, Vol. 22, no. 1, pp. 50-59.
34. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 2003, Vol. 13, no. 11, pp. 2498-2504.
35. Shimabukuro-Vornhagen A., Schlöber H.A., Gryschok L., Malcher J., Wennhold K., Garcia-Marquez M., Herbold T., Neuhaus L.S., Becker H.J., Fiedler A., Scherwitz P., Koslowsky T., Hake R., Stippel D.L., Hölscher A.H., Eidt S., Hallek M., Theurich S., von Bergwelt-Baildon M.S. Characterization of tumor-associated B-cell subsets in patients with colorectal cancer. *Oncotarget*, 2014, Vol. 5, no. 13, pp. 4651-4664.
36. Sorrentino C., D'Antonio L., Fieni C., Ciummo S.L., Di Carlo E. Colorectal cancer-associated immune exhaustion involves T and B lymphocytes and conventional NK cells and correlates with a shorter overall survival. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 778329. doi: 10.3389/fimmu.2021.778329.
37. Sui G., Qiu Y., Yu H., Kong Q., Zhen B. Interleukin-17 promotes the development of cisplatin resistance in colorectal cancer. *Oncol. Lett.*, 2019, Vol. 17, no. 1, pp. 944-950.
38. Sun Z., Li G., Shang D., Zhang J., Ai L., Liu M. Identification of microsatellite instability and immune-related prognostic biomarkers in colon adenocarcinoma. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 988303. doi: 10.3389/fimmu.2022.988303
39. Talaat I.M., Elemam N.M., Zaher S., Saber-Ayad M. Checkpoint molecules on infiltrating immune cells in colorectal tumor microenvironment. *Front. Med. (Lausanne)*, 2022, Vol. 9, 955599. doi: 10.3389/fmed.2022.955599.
40. Ulgen E., Ozisik O., Sezerman O.U. pathfindR: An R package for comprehensive identification of enriched pathways in omics data through active subnetworks. *Front. Genet.*, 2019, Vol. 10, 858. doi: 10.3389/fgene.2019.00858.
41. Wang Z., Ao X., Shen Z., Ao L., Wu X., Pu C., Guo W., Xing W., He M., Yuan H., Yu J., Li L., Xu X. TNF- $\alpha$  augments CXCL10/CXCR3 axis activity to induce Epithelial-Mesenchymal Transition in colon cancer cell. *Int. J. Biol. Sci.*, 2021, Vol. 17, no. 11, pp. 2683-2702.
42. Wu T., Yang W., Sun A., Wei Z., Lin Q. The Role of CXC chemokines in cancer progression. *Cancers (Basel)*, 2022, Vol. 15, no. 1, 167. doi: 10.3390/cancers15010167
43. Xiao Y, Freeman GJ. The microsatellite instable subset of colorectal cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Discov.*, 2015, Vol. 5, no. 1, pp. 16-18. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-1397.
44. Xie S., Cai Y., Chen D., Xiang Y., Cai W., Mao J., Ye J. Single-cell tran-scriptome analysis reveals heterogeneity and convergence of the tumor microenvi-ronment in colorectal cancer. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 13, 1003419. doi: 10.3389/fimmu.2022.1003419.

45. Zeng K., Li W., Wang Y., Zhang Z., Zhang L., Zhang W., Xing Y., Zhou C. Inhibition of CDK1 overcomes oxaliplatin resistance by regulating ACSL4-mediated ferroptosis in colorectal cancer. *Adv. Sci. (Weinh.)*, 2023, Vol. 10, no. 25, e2301088. doi: 10.1002/advs.202301088.
46. Zhang P., Kawakami H., Liu W., Zeng X., Strebhardt K., Tao K., Huang S., Sinicrope F.A. Targeting CDK1 and MEK/ERK Overcomes Apoptotic Re-sistance in BRAF-mutant human colorectal cancer. *Mol. Cancer Res.*, 2018, Vol. 16, no. 3, pp. 378-389.
47. Zhang J., Ji C., Li W., Mao Z., Shi Y., Shi H., Ji R., Qian H., Xu W., Zhang X. Tumor-educated neutrophils activate mesenchymal stem cells to promote gastric cancer growth and metastasis. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020, Vol. 8, 788. doi: 10.3389/fcell.2020.00788.
48. Zhang X., Shi H., Yuan X., Jiang P., Qian H., Xu W. Tumor-derived exosomes induce N2 polarization of neutrophils to promote gastric cancer cell migration. *Mol. Cancer*, 2018, Vol. 17, no. 1, 146. doi: 10.1186/s12943-018-0898-6.
49. Zhang Y., Zhao Y., Li Q., Wang Y. Macrophages, as a promising strategy to targeted treatment for colorectal cancer metastasis in tumor immune microenvironment. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 685978. doi: 10.3389/fimmu.2021.685978.
50. Zheng Z., Wieder T., Mauerer B., Schäfer L., Kesselring R., Braumüller H. T cells in colorectal cancer: unravelling the function of different T cell subsets in the tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 14, 11673. doi: 10.3390/ijms241411673.
51. Zheng W., Wu J., Peng Y., Sun J., Cheng P., Huang Q. Tumor-associated neutrophils in colorectal cancer development, progression and immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 2022, Vol. 14, no. 19, 4755. doi: 10.3390/cancers14194755.
52. Zhuo C., Ruan Q., Zhao X., Shen Y., Lin R. CXCL1 promotes colon cancer progression through activation of NF- $\kappa$ B/P300 signaling pathway. *Biol. Direct*, 2022, Vol. 17, no.1, pp. 34. doi: 10.1186/s13062-022-00348-4.

**Авторы:**

**Кит О.И.** — д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Гвалдин Д.Ю.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Петрусенко Н.А.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Тимошкина Н.Н.** — к.б.н., заведующая лабораторией молекулярной онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Савченко Д.А.** — врач-онколог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Новикова И.А.** — д.м.н., заместитель генерального директора по науке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Authors:**

**Kit O.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, General Director, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Gvaldin D. Yu.**, PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Petrusenko N.A.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Timoshkina N.N.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Oncology, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Savchenko D.A.**, Clinical Oncologist, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Novikova I.A.**, PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Research, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 22.11.2024

Отправлена на доработку 02.12.2024

Принята к печати 23.03.2025

Received 22.11.2024

Revision received 02.12.2024

Accepted 23.03.2025

## **ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ CD16 И NKG2D НК-КЛЕТКАМИ, НКТ-КЛЕТКАМИ И Т-ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С БЕСПЛОДИЕМ У ЖЕНЩИН**

**Михайлова В.А., Давыдова А.А., Загайнова В.А., Марко О.Б.,  
Мкртчян Э.Р., Жгулева А.С., Бакулина О.А., Сельков С.А.,  
Беспалова О.Н., Соколов Д.И.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия*

**Резюме.** Рост частоты встречаемости бесплодия определяет актуальность исследования вклада различных клеточных факторов, в том числе клеток иммунной системы, в патогенез этой патологии. В литературе описаны изменения активации НК-клеток в децидуальной оболочке и периферической крови при бесплодии, а также представительства НКТ-клеток и Т-лимфоцитов в матке при невынашивании беременности (НБ). Для НК-клеток и НКТ-клеток характерна экспрессия активационного рецептора NKG2D и рецептора к Fc-фрагменту иммуноглобулинов G – CD16. Отдельные популяции Т-лимфоцитов экспрессируют NKG2D. Целью работы явился анализ экспрессии рецепторов CD16 и NKG2D НК-клетками, НКТ-клетками и рецептора NKG2D Т-лимфоцитами периферической крови у женщин с бесплодием. Обследовано 60 женщин с бесплодием. Группу контроля составили здоровые небеременные фертильные женщины (n = 17). Из периферической крови обследованных женщин получали мононуклеарные клетки, которые обрабатывали моноклональными антителами к CD45, CD14, CD3, CD56, CD16, NKG2D. Установлено, что у пациенток с первичным бесплодием интенсивность экспрессии рецептора NKG2D популяцией НКТ-клеток периферической крови была ниже, чем у здоровых небеременных фертильных женщин. Установленное различие может быть обусловлено отсутствием в анамнезе имплантаций эмбриона у пациенток с первичным бесплодием и, соответственно, отсутствием влияния цитокинового и клеточного микроокружения, характерного для первого триместра беременности. У пациенток с вторичным бесплодием и НБ снижено относительное количество CD16<sup>+</sup>НК-клеток и CD16<sup>+</sup>NKG2D-НК-

### **Адрес для переписки:**

Михайлова Валентина Анатольевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
акушерства, гинекологии и репродуктологии имени  
Д.О. Отта»  
199034, Россия, Санкт-Петербург,  
Менделеевская линия, 3.  
Тел.: 8 (812) 328-98-50.  
E-mail: mva\_spb@mail.ru

### **Address for correspondence:**

Valentina A. Mikhailova  
D. Ott Research Institute for Obstetrics,  
Gynecology and Reproductology  
3 Mendeleevskaya Line  
St. Petersburg  
199034 Russian Federation  
Phone: +7 (812) 328-98-50.  
E-mail: mva\_spb@mail.ru

### **Образец цитирования:**

В.А. Михайлова, А.А. Давыдова, В.А. Загайнова,  
О.Б. Марко, Э.Р. Мкртчян, А.С. Жгулева,  
О.А. Бакулина, С.А. Сельков, О.Н. Беспалова,  
Д.И. Соколов «Особенности экспрессии рецепторов  
CD16 и NKG2D НК-клетками, НКТ-клетками  
и Т-лимфоцитами периферической крови,  
ассоциированные с бесплодием у женщин»  
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 4.  
С. 789-802. doi: 10.15789/1563-0625-EFO-2944

© Михайлова В.А. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

V.A. Mikhailova, A.A. Davydova, V.A. Zagaynova,  
O.B. Marko, E.R. Mkrтчyan, A.S. Zhguleva, O.A. Bakulina,  
S.A. Selkov, O.N. Bespalova, D.I. Sokolov "Expression  
features of CD16 and NKG2D receptors by NK cells, NKT cells  
and T lymphocytes of peripheral blood associated with female  
infertility", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 4, pp. 789-802.  
doi: 10.15789/1563-0625-EFO-2944

© Mikhailova V.A. et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EFO-2944

клеток периферической крови по сравнению с этим параметром у женщин с вторичным бесплодием без НБ в анамнезе. Относительное количество CD16<sup>+</sup>NK-клеток и CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup>NK-клеток периферической крови также было снижено у пациенток с вторичным бесплодием и НБ по сравнению с группой пациенток с первичным бесплодием и группой здоровых небеременных фертильных женщин. Установлено, что интенсивность экспрессии CD16 NK-клетками была снижена в подгруппе женщин с вторичным бесплодием и НБ в анамнезе по сравнению с группой контроля и подгруппой женщин с вторичным бесплодием без НБ в анамнезе. Различий к экспрессии NKG2D T-лимфоцитами при бесплодии не установлено. Сниженная экспрессия CD16 NK-клетками женщин с вторичным бесплодием и НБ может являться отражением нарушения функциональной дифференцировки NK-клеток при этой патологии.

*Ключевые слова:* NK-клетки, NKT-клетки, T-лимфоциты, CD16, NKG2D, периферическая кровь, бесплодие

## EXPRESSION FEATURES OF CD16 AND NKG2D RECEPTORS BY NK CELLS, NKT CELLS AND T LYMPHOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD ASSOCIATED WITH FEMALE INFERTILITY

Mikhailova V.A., Davydova A.A., Zagaynova V.A., Marko O.B., Mkrtchyan E.R., Zhguleva A.S., Bakulina O.A., Selkov S.A., Beshpalova O.N., Sokolov D.I.

*D. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** The increasing incidence of infertility determines relevance of studying various cellular factors, including immune cells, in pathogenesis of this disorder. In cases of infertility, some changes are described in NK cell activation in decidual and peripheral blood cells, as well as in representation of NKT cells and T lymphocytes in uterus at miscarriage (MC). NK cells and NKT cells are characterized by expression of activating receptor NKG2D and a receptor for immunoglobulin G Fc-region CD16. Distinct populations of T lymphocytes express NKG2D. The aim of the present study was to analyze the expression of CD16 and NKG2D by NK cells, NKT cells and NKG2D receptor by peripheral blood T lymphocytes. We examined 60 women with infertility. The control group consisted of healthy non-pregnant fertile women (n = 17). Mononuclear cells were obtained from peripheral blood and treated with monoclonal antibodies to CD45, CD14, CD3, CD56, CD16, NKG2D. The intensity of NKG2D receptor expression on peripheral blood NKT cells in patients with primary infertility proved to be lower than in healthy non-pregnant fertile women. This difference may be caused by the absence of an embryo implantation in previous history of primary infertility and, accordingly, lacking influence of cytokines and cellular microenvironment specific for first trimester of pregnancy. In patients with secondary infertility and miscarriage (MC), the relative numbers of CD16<sup>+</sup>NK cells and CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup>NK cells in peripheral blood were reduced when compared to the women with secondary infertility without history of MC. Relative numbers of CD16<sup>+</sup>NK cells and CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup>NK cells in peripheral blood were also reduced in patients with secondary infertility and MC compared to patients with primary infertility and to healthy non-pregnant fertile women. CD16 expression intensity of NK cells was shown to be reduced in subgroup of women with secondary infertility and a history of MC compared to control group and to women with secondary infertility without a history of MC. No differences in NKG2D expression by T lymphocytes associated with infertility were found. Reduced CD16 expression by NK cells of women with secondary infertility and MC may reflect the impaired functional differentiation of NK cells associated with this condition.

*Keywords:* NK cells, NKT cells, T lymphocytes, CD16, NKG2D, peripheral blood, infertility

Работа выполнена в рамках фундаментального научного исследования № 122041500061-8 «Разработка диагностических критериев прогнозирования и преодоления репродуктивных потерь», реализуемой в ФГБНУ «НИИАГиР им. Д.О. Отта».

## Введение

Бесплодие представляет важную медицинскую проблему, актуальность которой определяется ростом частоты его встречаемости и значимым социально-демографическим влиянием [1, 3, 4]. Бесплодие является мультифакторным заболеванием, риск развития которого связывают с аномалиями развития половых органов, нарушениями эндокринной регуляции, воспалительными заболеваниями органов малого таза, нарушениями пролиферации и рецептивности эндометрия и другими факторами, в том числе влиянием образа жизни и внешней среды [1, 4, 25, 33]. Описан вклад иммунных факторов в патогенез бесплодия. Например, в периферической крови при бесплодии у женщин повышено содержание НК-клеток, а также выявлены изменения их функциональных характеристик [30, 32]. Лечение пациенток с бесплодием предполагает использование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [34]. Выявление и снижение влияния факторов, способствовавших развитию бесплодия, может повысить вероятность наступления беременности в цикле ВРТ. В связи с этим уделяется внимание изучению вклада различных клеточных факторов, в том числе клеток иммунной системы в патогенез бесплодия [14].

В норме после овуляции эндометрий претерпевает секреторную трансформацию и децидуализируется, в этот период в нем повышено количество лейкоцитов, преимущественно представленных НК-клетками [41]. Эти клетки являются источником многих цитокинов (в том числе IL-8, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), регулирующих инвазию клеток трофобласта в эндометрий и ремоделирование спиральных артерий матки [23, 41]. Одним из активационных рецепторов НК-клеток является рецептор NKG2D [24]. Продемонстрирована экспрессия НК-клетками периферической крови рецептора NKG2D при неосложненной беременности [10]. Выявлены изменения экспрессии NKG2D НК-клетками децидуальной оболочки первого триместра в зависимости от концентрации кислорода [39], что позволяет рассматривать экспрессию NKG2D децидуальными НК-клетками как физиологическую. Вместе с тем повышение экспрессии лиганда NKG2D – ULBP1 клетками плаценты в третьем триместре установлено при патологии беременности – преэклампсии [18]. Другим рецептором НК-клеток

является CD16 – рецептор к Fc-фрагменту иммуноглобулинов G. За счет его экспрессии НК-клетки могут реализовывать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность [6]. Традиционно рассматривают повышение экспрессии CD16 НК-клетками эндометрия в качестве маркера их цитотоксической трансформации, в том числе при невынашивании беременности (НБ) [5].

В литературе описаны изменения активности НК-клеток при бесплодии. Например, на основании анализа баз данных экспрессии генов установлено, что бесплодие ассоциировано со сниженным количеством активированных НК-клеток в эндометрии [40]. Продемонстрировано, что содержание НК-клеток с фенотипом CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> и CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> снижено, а содержание CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>dim</sup>НК-клеток повышено у пациенток с бесплодием и НБ в анамнезе по сравнению с пациентками с бесплодием в отсутствии НБ [2]. Описана ассоциация первичного бесплодия и повышения количества NKG2D<sup>+</sup>НК-клеток периферической крови в популяциях CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>dim</sup> и CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> [2], а также повышение количества NKG2D<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup>НК-клеток менструальной крови у пациенток с идиопатическим бесплодием [38].

Помимо НК-клеток, в децидуальной оболочке выявлены НКТ-клетки, являющиеся лимфоцитами, одновременно экспрессирующими рецепторы НК-клеток и Т-лимфоцитов [35]. В настоящее время выделяют три субпопуляции НКТ-клеток: инвариантные (i)НКТ-клетки (1-й тип), НКТ-клетки 2-го типа и НКТ-подобные клетки, различающиеся по экспрессии инвариантных Т-клеточных рецепторов, способности связывать неклассическую MHC1-подобную молекулу – CD1d, по продукции цитокинов и экспрессии CD161 [9]. Описана экспрессия CD1d клетками ворсинчатого и вневорсинчатого трофобласта [46]. Количество общей популяции НКТ-клеток в эндометрии возрастает после овуляции [35] и значительно превышает содержание НКТ-клеток в периферической крови [21]. При анализе экспрессии CD8<sup>+</sup>НКТ-клетками периферической крови рецептора NKG2D не выявлено различий в их содержании на разных сроках беременности и у небеременных женщин [22]. Предполагают участие НКТ-клеток в поддержании цитокинового микроокружения, способствующего инвазии трофобласта в эндометрий [32].

Данных о характеристиках НКТ-клеток при бесплодии недостаточно. В литературе описано снижение содержания НКТ-клеток в периферической крови пациенток с бесплодием под влиянием терапии препаратами внутривенных иммуноглобулинов, что коррелировало с веро-

ятностью наступления беременности [37]. В то же время снижение содержания iNKT-клеток в децидуальной оболочке связывают с развитием привычного НБ [44]. При исследовании привычного НБ продемонстрировано наличие популяции NKT-клеток периферической крови, экспрессирующих CD16, однако применяемая терапия НБ (преднизолон или лейкоцитотерапия) не вызывала изменений содержания этой популяции NKT-клеток.

T-лимфоциты присутствуют в эндометрии в минорном количестве в составе субпопуляций CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>. В секреторную фазу менструального цикла цитотоксическая активность CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов эндометрия снижается [17]. В популяции CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов выделяют T-регуляторные клетки, с секреторной активностью которых связывают формирование иммунологической толерантности в маточно-плацентарном комплексе [27]. Сниженное содержание T-регуляторных клеток в децидуальной оболочке связано с риском НБ [27], при этом показано, что общее содержание CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов не различалось у пациенток с привычным НБ и с повторными неудачами имплантации [5]. Показано, что при НБ в периферической крови снижено содержание особой популяции T-лимфоцитов –  $\gamma\delta$ T-клеток по сравнению со здоровыми небеременными женщинами [43]. Повышенное количество NKG2D<sup>+</sup> $\gamma\delta$ T-клеток в периферической крови при бесплодии ассоциировано с повторными неудачами имплантации [13].

Таким образом, отдельные изменения в представителе NK-клеток, NKT-клеток и некоторых популяций T-лимфоцитов в децидуальной оболочке и в периферической крови выявлены при таких формах репродуктивной дисфункции, как бесплодие и НБ. Данные об экспрессии этих клетками рецепторов CD16 и NKG2D носят разрозненный характер. В связи с вышеизложенным целью работы стал анализ экспрессии рецепторов CD16 и NKG2D NK-клетками, NKT-клетками и рецептора NKG2D T-лимфоцитами периферической крови у женщин с бесплодием.

## Материалы и методы

### Пациенты

В исследование были включены женщины с бесплодием (n = 60), проходившие лечение в отделении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) НИИАГиР им. Д.О. Отта. Критериями включения пациенток для участия в исследовании был репродуктивный возраст в диапазоне от 20 до 40 лет, нормальный кариотип супругов, отсутствие наступления беременности в результате проведения двух и более протоколов

ВРТ с использованием эмбрионов хорошего качества в анамнезе.

Пациентки были разделены на две группы. Первую группу составили женщины с первичным бесплодием (n = 26), у которых отсутствовали в анамнезе беременности при регулярной половой жизни в течение года без применения средств контрацепции. Вторую группу составили женщины с вторичным бесплодием (n = 34), у которых в анамнезе была беременность, в том числе зарегистрированная только по повышению содержания  $\beta$ ХГЧ в сыворотке крови или моче, при этом в течение года регулярной половой жизни без применения средств контрацепции новая беременность не наступала. Пациентки с вторичным бесплодием были разделены на две подгруппы: женщины с НБ в анамнезе (НБ<sup>+</sup>) (n = 19) и без него (НБ<sup>-</sup>) (n = 15).

В группу контроля (n = 17) вошли здоровые небеременные женщины с регулярным менструальным циклом, у которых в анамнезе было не менее одних родов и отсутствовали зарегистрированные репродуктивные потери.

Критериями исключения для всех групп являлись возраст менее 20 и более 40 лет, индекс массы тела более 30 кг/м<sup>2</sup>, аномалии развития половых органов, наружный генитальный эндометриоз 2-4-й степени, полипы эндометрия, миома матки, толщина эндометрия по результатам ультразвукового исследования менее 7 мм. К критериям исключения также относилось наличие сахарного диабета, острых и обострения хронических инфекционных заболеваний, применение антибактериальной или противовирусной терапии на момент исследования или менее, чем за 3 месяца до исследования, применение гормональной контрацепции менее чем за 3 месяца до исследования.

Материалом для исследования была периферическая кровь, которую получали во вторую фазу менструального цикла (19-22-й день).

Исследование рассмотрено и одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «НИИА-ГиР им. Д.О. Отта» (протокол № 107 от 15.03.2021). У женщин, чьи данные вошли в работу, было получено информированное согласие на участие в исследовании, с последующей обезличенной обработкой и анализом результатов исследования и их публикацией в открытом доступе.

### Оценка экспрессии рецепторов CD16 и NKG2D NK-клетками, NKT-клетками и T-лимфоцитами периферической крови

Из периферической крови получали мононуклеарные клетки путем ее центрифугирования в градиенте плотности фикола ( $\rho = 1,077$  г/мл, ООО «БиолоТ», Россия) по стандартной методике. Затем мононуклеарные клетки обрабаты-

ли моноклональными антителами к CD45 (клон 2D1, изотип IgG1, κ), CD14 (клон M5E2, изотип IgG2a, κ), CD3 (клон SK7, изотип IgG1, κ), CD56 (клон NCAM16.2, изотип IgG2b, κ), CD16 (клон 3G8, изотип IgG1, κ), NKG2D (клон 1D11, изотип IgG1, κ) (BD, США). Часть клеток обрабатывали соответствующими изотипическими антителами (BD, США) для контроля неспецифического связывания антител. Затем клетки анализировали на проточном цитофлюориметре FACS Canto II (BD, США), используя стратегию гейтирования, представленную на рисунке 1.

Выделяли популяции клеток CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (Т-лимфоциты), CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (NK-клетки), CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (NKT-клетки) (рис. 1). Оценивали относительное количество популяций Т-лимфоцитов, NK- и NKT-клеток и интенсивность экспрессии этими клетками рецептора NKG2D. В популяции Т-лимфоцитов также оценивали относительное количество NKG2D<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. В популяциях NK-клеток и NKT-клеток оценивали также интенсивность экспрессии CD16. Среди NK-клеток и NKT-клеток определяли относительное количество клеток с фенотипами CD16<sup>+</sup>, NKG2D<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup>NKG2D<sup>+</sup>.

Статистический анализ данных выполняли в программах Statistica 10 (StatSoft, Inc., США) и GraphPad Prism (GraphPad Software, США). Оценку характера распределения данных проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. Парные сравнения проводили с использованием непараметрического рангового критерия Манна–Уитни, для множественных сравнений применяли критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. Различия признавались статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ . Оценку корреляционных связей между оцениваемыми параметрами проводили, используя расчет коэффициента корреляции Спирмена.

Полученные данные представлены в виде боксовых диаграмм, отражающих медиану, 25% и 75% квартили, усы бокса соответствуют минимальному и максимальному значению распределения показателя.

## Результаты

Анализ содержания NK-клеток, NKT-клеток и Т-лимфоцитов, а также экспрессии NK- и NKT-клетками рецепторов CD16 и NKG2D, и экспрессии NKG2D Т-лимфоцитами не выявил различий между здоровыми небеременными женщинами и женщинами с бесплодием.

После разделения пациенток с бесплодием на группы «первичное бесплодие» и «вторичное бесплодие» было установлено, что у здоровых не-

беременных женщин интенсивность экспрессии рецептора NKG2D популяцией NKT-клеток периферической крови была выше, чем у пациенток с первичным бесплодием (рис. 2А).

Экспрессия CD16 NKT-клетками у здоровых женщин с пациенток с бесплодием не различалась (рис. 2Б). Экспрессия NKG2D и CD16 NK-клетками и NKG2D Т-лимфоцитами у женщин с первичным и вторичным бесплодием не различалась между группами и по сравнению с группой контроля.

Затем было проанализировано содержание и экспрессия рецепторов CD16 и NKG2D NK-клетками и NKT-клетками, а также содержание и экспрессия NKG2D Т-лимфоцитами в подгруппах женщин с вторичным бесплодием с НБ в анамнезе и без него. Установлено, что у пациенток с вторичным бесплодием и НБ снижено относительное количество CD16<sup>+</sup>NK-клеток периферической крови по сравнению с этим параметром у женщин с вторичным бесплодием без НБ в анамнезе (рис. 3).

Относительное количество CD16<sup>+</sup>NK-клеток периферической крови также было снижено у пациенток с вторичным бесплодием и НБ по сравнению с группой пациенток с первичным бесплодием и группой здоровых небеременных фертильных женщин (рис. 3).

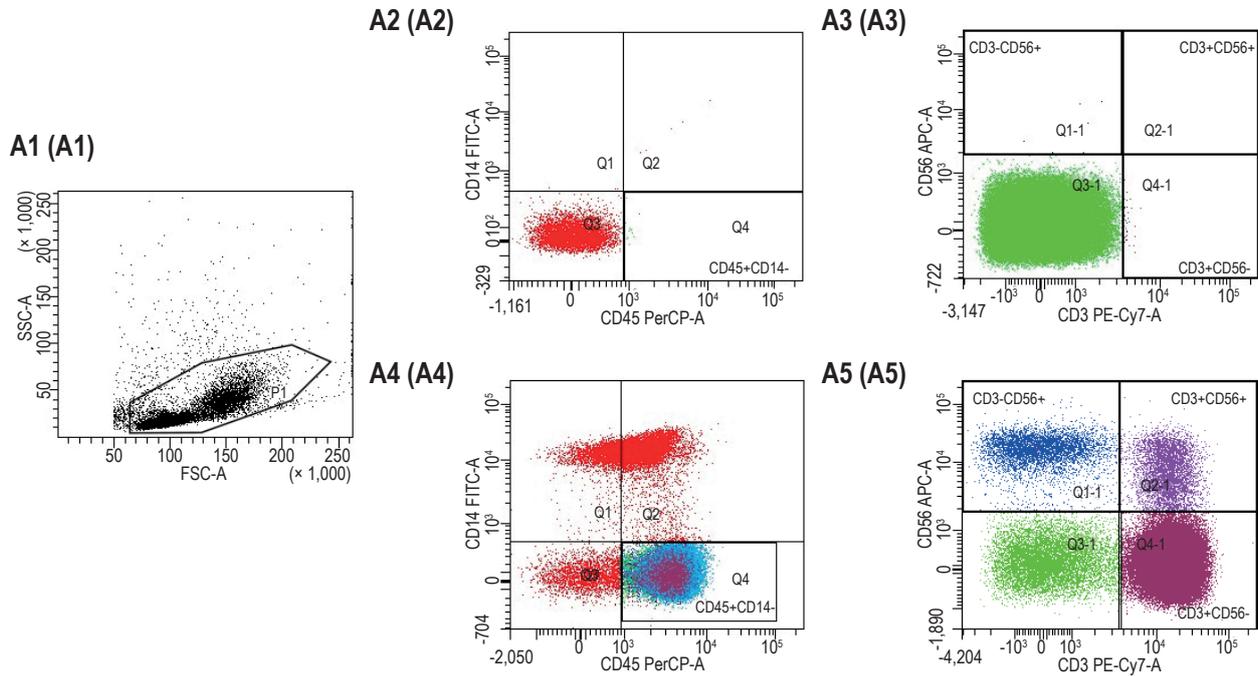
Установлено, что у пациенток с вторичным бесплодием и НБ в анамнезе снижено относительное количество NK-клеток периферической крови с фенотипом CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup> по сравнению с подгруппой женщин с вторичным бесплодием без НБ и группой женщин с первичным бесплодием (рис. 4).

Относительное количество CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup> NK-клеток периферической крови у пациенток с бесплодием и НБ было также снижено по сравнению с количеством этих клеток у здоровых небеременных фертильных женщин (рис. 4). Коэффициент корреляции между параметрами количества CD16<sup>+</sup>NK-клеток и CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup> NK-клеток для всех групп составил 0,9 ( $p < 0,001$ ).

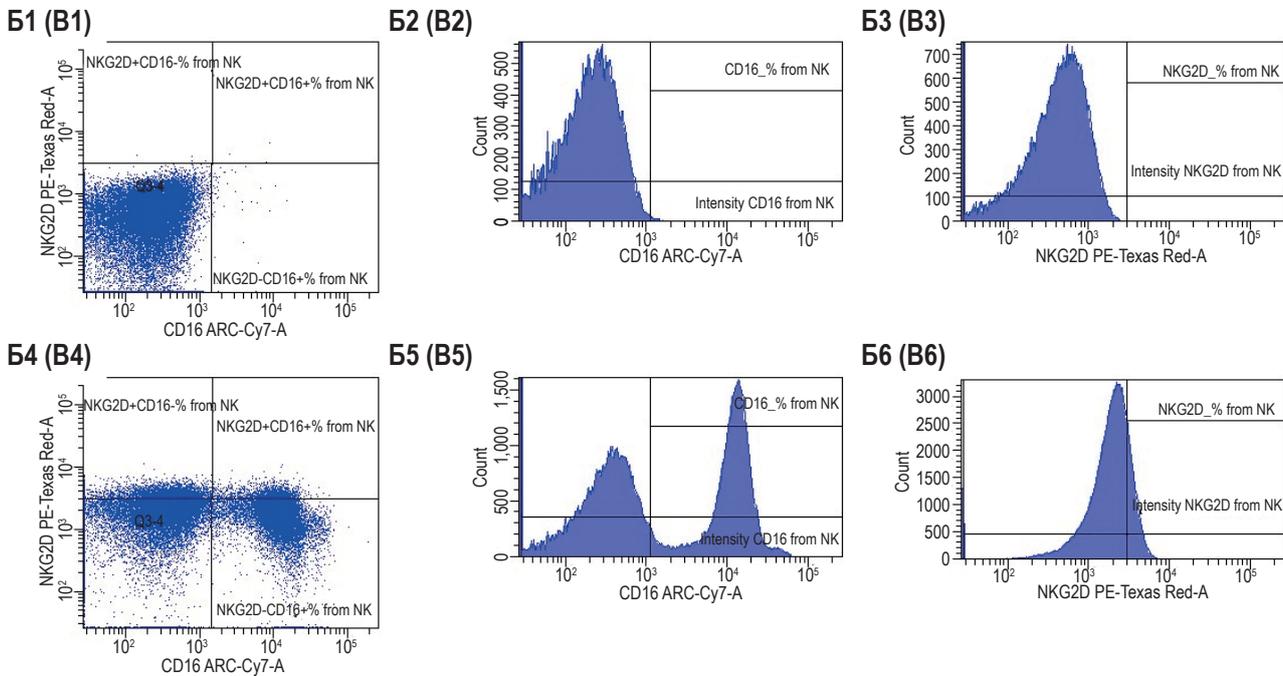
Интенсивность экспрессии NK-клетками рецептора NKG2D не различалась между подгруппами (рис. 5А).

Установлено, что интенсивность экспрессии CD16 NK-клетками была снижена в подгруппе женщин с вторичным бесплодием и НБ в анамнезе по сравнению с соответствующим параметром группы контроля и подгруппы женщин с вторичным бесплодием без НБ в анамнезе (рис. 5Б). Другие параметры NK-клеток, а также NKT-клеток и Т-лимфоцитов не различались между группами женщин с первичным бесплодием, подгруппами женщин с вторичным бесплодием и НБ в анамнезе и без НБ.

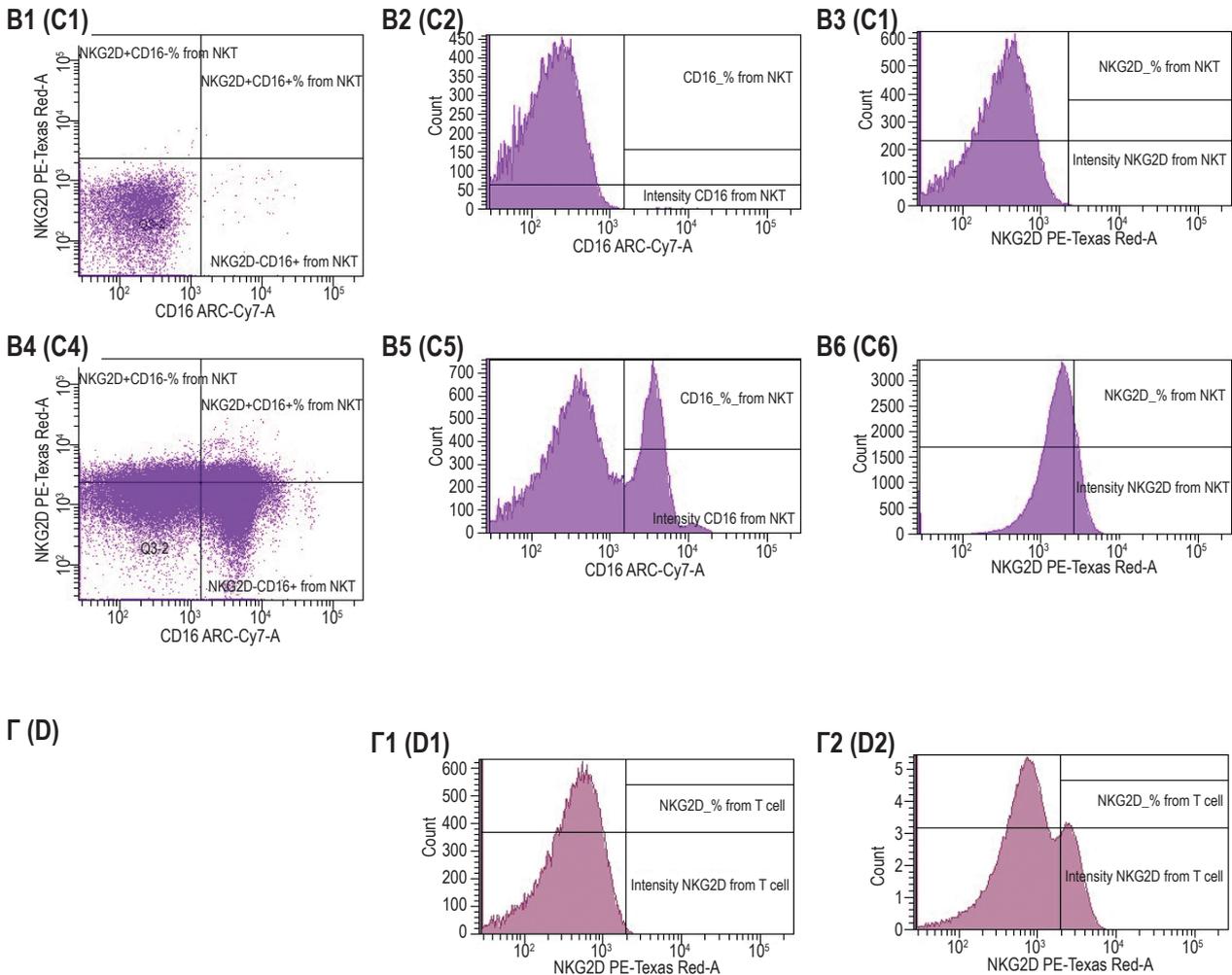
**A (A)**



**Б (B)**



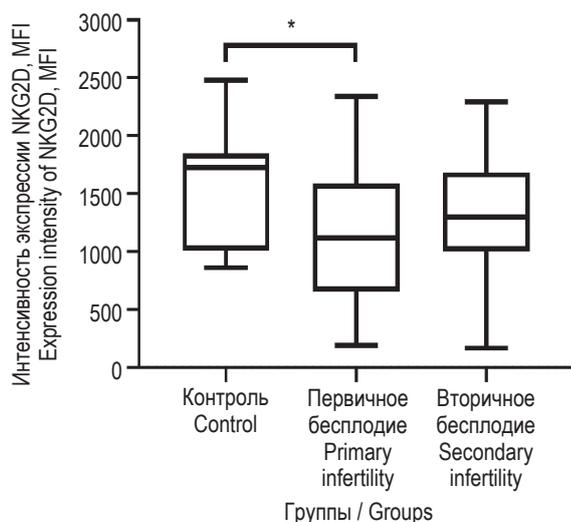
**B (C)**



**Рисунок 1. Стратегия гейтирования мононуклеаров периферической крови, использованная в исследовании**  
Примечание. А – выделение среди мононуклеаров популяций НК-клеток, NKT-клеток, Т-лимфоцитов: распределение клеток в координатах FSC-SSC (A1), гейт содержит мононуклеары; в координатах CD45-CD14; в координатах CD3-CD56. Графики A2 и A3 представляют изотип-контроли, графики A4 и A5 отражают распределение клеток, обработанных антителами. На графике A5 левый верхний квадрант содержит НК-клетки, правый верхний квадрант – NKT-клетки, правый нижний квадрант – Т-лимфоциты. Б – экспрессия НК-клетками рецепторов CD16 и NKG2D: распределение клеток в координатах CD16-NGK2D; на гистограмме CD16; на гистограмме NKG2D. Графики B1, B2, B3 представляют изотип-контроли, графики B4, B5, B6 отражают распределение клеток, обработанных антителами. В – экспрессия NKT-клетками рецепторов CD16 и NKG2D: распределение клеток в координатах CD16-NGK2D; на гистограмме CD16; на гистограмме NKG2D. Графики B1, B2, B3 представляют изотип-контроли, графики B4, B5, B6 отражают распределение клеток, обработанных антителами. Г – экспрессия Т-клетками рецепторов NKG2D: распределение клеток на гистограмме NKG2D. График Г1 представляет изотип-контроль, графики Г2 отражает распределение клеток, обработанных антителами.

**Figure 1. Peripheral blood mononuclear cell gating strategy used in the study**  
Note. A, isolation of populations of NK cells, NKT cells, T lymphocytes among mononuclear cells: distribution of cells in FSC-SSC coordinates (A1), the gate contains mononuclear cells; in coordinates CD45-CD14; in coordinates CD3-CD56. Graphs A2 and A3 represent isotype controls, graphs A4 and A5 reflect the distribution of cells treated with antibodies. In graph A5, the upper left quadrant contains NK cells, the upper right quadrant contains NKT cells, and the lower right quadrant contains T lymphocytes. B, expression of CD16 and NKG2D receptors by NK cells: distribution of cells in CD16-NGK2D coordinates; on the CD16 histogram; on the NKG2D histogram. Graphs B1, B2, B3 represent isotype controls, graphs B4, B5, B6 reflect the distribution of cells treated with antibodies. C, expression of CD16 and NKG2D receptors by NKT cells: distribution of cells in CD16-NGK2D coordinates; on the CD16 histogram; on the NKG2D histogram. Graphs C1, C2, C3 represent isotype controls, graphs C4, C5, C6 reflect the distribution of cells treated with antibodies. D, expression of NKG2D receptors by T cells: distribution of cells on the NKG2D histogram. Graph D1 represents the isotype control, graphs D2 reflect the distribution of cells treated with antibodies.

А (A)



Б (B)

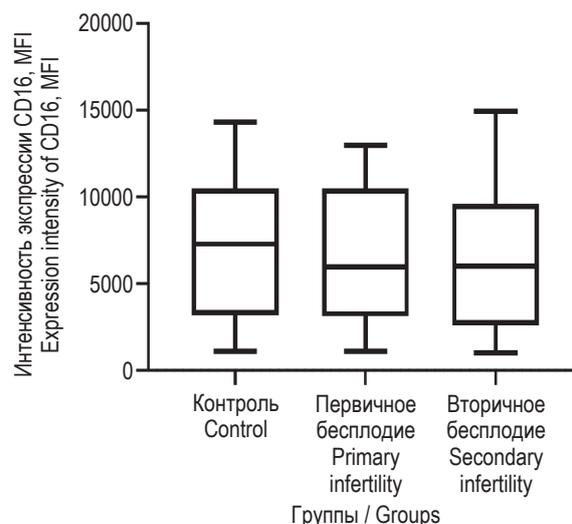


Рисунок 2. Интенсивность экспрессии NKT-клетками периферической крови рецепторов NKG2D (A) и CD16 (Б)

Примечание. Статистическая значимость различий: \* –  $p < 0,05$ .

Figure 2. Intensity of expression of NKG2D (A) and CD16 (B) receptors by peripheral blood NKT cells

Note. Statistical significance of differences: \*,  $p < 0.05$ .

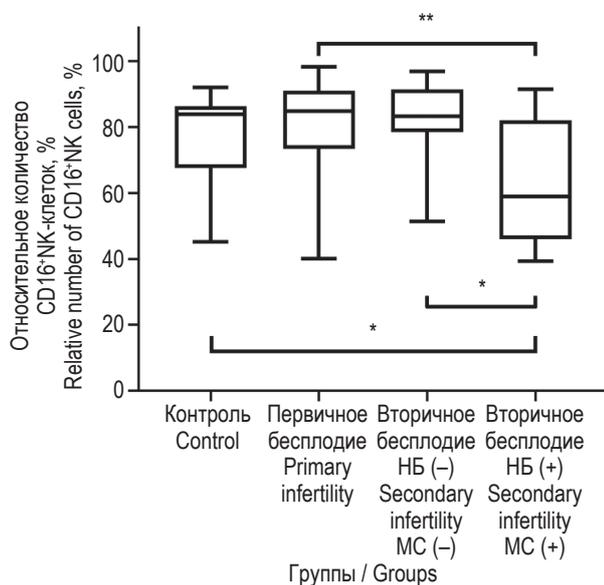


Рисунок 3. Относительное количество CD16<sup>+</sup>NK-клеток периферической крови

Примечание. Статистическая значимость различий:

\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Figure 3. Relative numbers of peripheral blood CD16<sup>+</sup>NK cells

Note. Statistical significance of differences: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

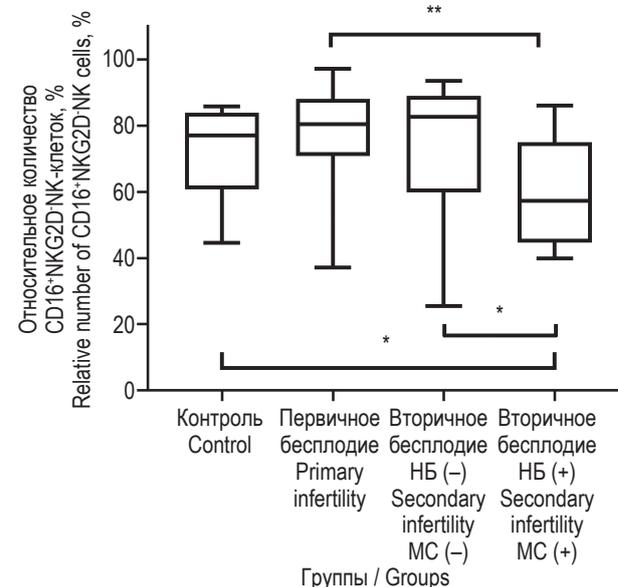


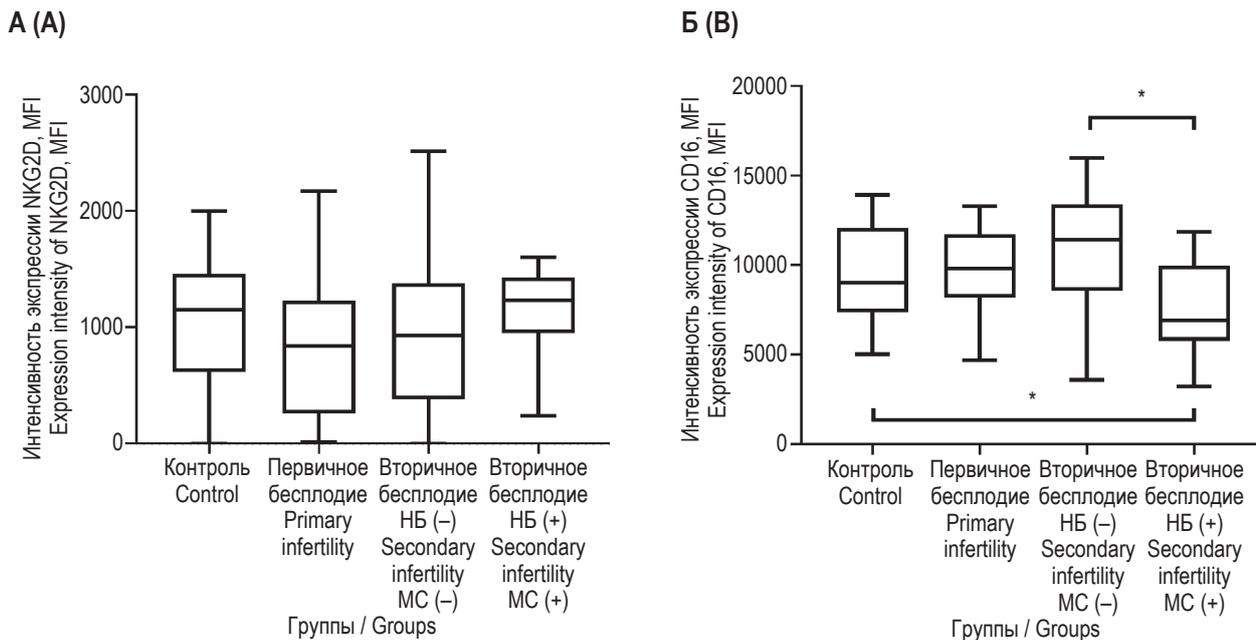
Рисунок 4. Относительное количество CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>NK-клеток периферической крови

Примечание. Статистическая значимость различий:

\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Figure 4. Relative number of CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>NK cells in peripheral blood

Note. Statistical significance of differences: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .



**Рисунок 5. Интенсивность экспрессии NK-клетками периферической крови рецепторов NKG2D (А) и CD16 (Б)**

**Примечание. Статистическая значимость различий: \* –  $p < 0,05$ .**

Figure 5. Intensity of expression of NKG2D (A) and CD16 (B) receptors by peripheral blood NK cells

Note. Statistical significance of differences: \*,  $p < 0.05$ .

## Обсуждение

Учитывая возможный вклад иммунной системы в развитие репродуктивных патологий, предпринимаются попытки выявления взаимосвязи содержания иммунных клеток в периферической крови и эндометрии с патогенезом бесплодия и неудачами программ ВРТ. Например, Sacks G. и соавт. установили повышенное содержание NK-клеток в периферической крови у пациенток с многократными неудачами ВРТ [28]. Santillan I. и соавт. показали, что количество NK-клеток в периферической крови и образцах эндометрия повышено у пациенток с повторными неудачами имплантации неясного генеза [29]. По данным Hosseini S. и соавт., у женщин с бесплодием количество NKT-клеток периферической крови было снижено по сравнению с группой здоровых небеременных женщин [11]. При этом количество NKT-клеток в менструальной крови было снижено при бесплодии как по сравнению с группой контроля, так и по сравнению с группой привычного НБ [11]. Продemonстрировано также, что содержание  $CD56^{dim}CD16^{bright}$  NK-клеток и  $CD3^+T$ -лимфоцитов снижено в менструальной крови при бесплодии по сравнению со здоровыми фертильными женщинами [38].

В настоящей работе нами проведен анализ экспрессии рецепторов, связанных с реализацией цитотоксических свойств (CD16 и NKG2D),

клетками иммунной системы периферической крови. Нами установлено, что у женщин с бесплодием содержание в периферической крови NK-клеток, NKT-клеток и T-лимфоцитов не отличалось от соответствующих показателей группы контроля. Не было выявлено изменений количества  $NKG2D^+T$ -лимфоцитов и интенсивности экспрессии ими NKG2D. В работе нами была выявлена сниженная интенсивность экспрессии NKG2D NKT-клетками у пациенток с первичным бесплодием по сравнению со здоровыми небеременными женщинами.

Экспрессия рецептора NKG2D была ранее продемонстрирована для NKT-клеток периферической крови [12]. Кроме того, инкубация мононуклеарных клеток в присутствии IL-2 индуцировала экспрессию NKG2D NKT-клетками, в результате связывания этого рецептора NKT-клетки синтезировали  $IFN\gamma$  и дегранулировали, вызывая гибель клеток-мишеней [42]. Продemonстрировано, что IL-15 также вызывает повышение экспрессии NKG2D NKT-клетками [12], секреция этого цитокина показана в децидуальной оболочке [31]. В первом триместре беременности децидуальные  $CD14^+$  и  $CD3^+$  клетки экспрессируют лиганд NKG2D – ULPB-1 [20]. Как упоминалось ранее, иммуногистохимическое исследование плаценок третьего триместра показало экспрессию ULPB-1, при этом повышение экспрессии ULBP1 клетками пла-

центры в третьем триместре было ассоциировано с преэклампсией [18]. Соответственно, в эндометрии и децидуальной оболочке присутствуют клетки (Т-лимфоциты, моноциты/макрофаги, трофобласт), которые могут связывать рецептор NKG2D.

Среди растворимых факторов, секретируемых клетками плаценты при беременности, присутствует IL-15 [16]. Показано, что этот цитокин усиливает экспрессию NKT-клетками периферической крови рецептора NKG2D [12]. При исследовании функциональной активности NK-клеток установлено, что клетки трофобласта линий JEG-3 и JAR влияют на продукцию NK-клетками цитокинов [36]. В настоящей работе сниженная интенсивность экспрессии NKG2D NKT-клетками была установлена в группе пациенток с первичным бесплодием, у которых в анамнезе отсутствовали беременности и, соответственно, не было предшествовавших контактов с клетками трофобласта. Можно предположить, что цитокины микроокружения, например, IL-15, а также контакт с клетками трофобласта, регулируют не только активность NK-клеток, но и экспрессию рецептора NKG2D NKT-клетками.

Ранее нами продемонстрировано, что у женщин при первичном и при вторичном бесплодии по сравнению со здоровыми небеременными женщинами в периферической крови снижено содержание CD16<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>NK-клеток [2]. Рецептор CD16 маркирует дифференцированную популяцию NK-клеток, обладающую цитотоксическими свойствами [26]. Для дифференцированных NK-клеток характерна экспрессия цитотоксических рецепторов, в том числе NKG2D [26]. Однако в ходе эксперимента по дифференцировке NK-клеток из плюрипотентных стволовых клеток *in vitro* были получены популяции NK-клеток, как с наличием, так и с отсутствием экспрессии CD16 (CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) [7]. Обе популяции NK-клеток экспрессировали цитотоксические рецепторы KIR и NCR, содержали гранзимы и реализовывали цитотоксичность в отношении клеток-мишеней [7]. Кроме того, ранее нами установлено параллельное снижение количества NK-клеток, представляющих так называемые «регуляторную» (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup>) и «цитотоксическую» (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup>) популяции при бесплодии и НБ по сравнению с бесплодием без НБ в анамнезе [2]. В связи с этим в настоящей работе была проанализирована интенсивность экспрессии рецепторов CD16 и NKG2D всей популяцией NK-клеток.

Нами установлено снижение интенсивности экспрессии CD16 NK-клетками периферической крови у пациенток с бесплодием и НБ в анамнезе. Для этой группы также выявлено снижение

относительного количества CD16<sup>+</sup>NK-клеток и CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup>NK-клеток, в то время как интенсивность экспрессии рецептора NKG2D не различалась между группами. При анализе корреляций установлена сильная положительная связь между изменением количества NK-клеток с фенотипами CD16<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup>, что позволяет говорить о снижении количества CD16<sup>+</sup>NK-клеток преимущественно за счет клеток, не экспрессирующих цитотоксический рецептор NKG2D. В литературе описано, что секреторные факторы децидуальных стромальных клеток стимулируют снижение экспрессии CD16 NK-клетками децидуальной оболочки [45]. Показано, что TGFβ, секретируемый клетками трофобласта, стимулирует снижение CD16 NK-клетками периферической крови [15]. Gamliel M. и соавт. установили, что NK-клетки в результате многократных контактов с клетками трофобласта в ходе предшествовавших беременностей формируют особую популяцию NK-клеток, способную с быстрой индукции секреции VEGF и IFNγ [8]. Однако при оценке фенотипа этой популяции NK-клеток были использованы только три специфичности CD3, CD56 и NKG2C [8]. В другом исследовании для популяции NK-клеток с характеристиками, присущими клеткам-памяти, была установлена высокая экспрессия CD16 и NKG2D [19]. В связи с этим полученные нами результаты о сниженной экспрессии NK-клетками CD16 у пациенток с бесплодием и НБ в анамнезе можно рассматривать, как нарушение функциональной дифференцировки NK-клеток, связанное с неадекватным взаимодействием с клетками трофобласта в результате предшествовавших беременностей.

## Заключение

Таким образом, нами выявлены изменения экспрессии рецепторов CD16 и NKG2D NK-клетками и NKT-клетками периферической крови у пациенток с бесплодием. Первичное бесплодие было ассоциировано со сниженной интенсивностью экспрессии NKG2D NKT-клетками, что может быть обусловлено отсутствием в анамнезе имплантаций эмбриона и, соответственно, отсутствием влияния цитокинового и клеточного микроокружения, характерного для первого триместра беременности. Для женщин с вторичным бесплодием и НБ в анамнезе показано снижение экспрессии NK-клетками рецептора CD16, которое может являться отражением нарушения функциональной дифференцировки NK-клеток. Перспективно дальнейшее исследование способов регуляции процесса дифференцировки NK-клеток и модулирования их функциональных свойств.

## Список литературы / References

1. Баринаева Э.К., Арутин Д.Г. Предикторы бесплодия // Акушерство и гинекология, 2023. Т. 4. С. 178-183. [Barinova E.K., Arutin D.G. Infertility predictors. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2023, Vol. 4, pp. 178-183. (In Russ.)]
2. Загайнова В.А., Коган И.Ю., Сельков С.А., Беспалова О.Н., Крихели И.О., Михайлова В.А., Давыдова А.А., Милюткина Ю.П., Соколов Д.И. NK-клетки периферической крови у пациенток с неэффективными протоколами вспомогательных репродуктивных технологий: количество, субпопуляционный состав и маркеры активации // Акушерство и гинекология, 2022. Т. 9. С. 102-113. [Zagaynova V.A., Kogan I.Yu., Selkov S.A., Bespalova O.N., Krikheli I.O., Mikhailova V.A., Davydova A.A., Milyutina Yu. P., Sokolov D.I. Peripheral blood NK cells in women with unsuccessful attempts of assisted reproduction: quantity, subpopulation composition and activation markers. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2022, Vol. 9, pp. 102-113. (In Russ.)]
3. Османов Э.М., Прокопов А.Ю. Медико-биологическое и социальное значение женского бесплодия // Медицина и физическая культура: наука и практика, 2020. Т.2, № 1 (5). С. 29-38. [Osmanov E.M., Prokopov A.Yu. Medical-biological and social significance of female infertility. *Meditsina i fizicheskaya kultura: nauka i praktika = Medicine and Physical Education: Science and Practice*, 2020, Vol. 2, no. 1 (5), pp. 29-38. (In Russ.)]
4. Стрижова Т.В. Ключевые моменты при обследовании пациентов с бесплодием // Клинический разбор в акушерстве, гинекологии и репродуктологии, 2022. Т. 1, № 2. С. 32-38. [Strizhova T.V. Key issues of assessing infertile patients. *Klinicheskiy razbor v akusherstve, ginekologii i reproduktologii = Clinical Analysis in Obstetrics, Gynecology and Reproductology*, 2022, Vol. 1, no. 2, pp. 32-38. (In Russ.)]
5. Braun A.S., Vomstein K., Reiser E., Tollinger S., Kyvelidou C., Feil K., Toth B. NK and T cell subtypes in the endometrium of patients with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: implications for pregnancy success. *J. Clin. Med.*, 2023, Vol. 12, no. 17, 5585. doi: 10.3390/jcm12175585.
6. Chin D.S., Lim C.S.Y., Nordin F., Arifin N., Jun T.G. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity through Natural Killer (NK) cells: Unlocking NK cells for future immunotherapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2022, Vol. 23, no. 4, pp. 552-578.
7. Euchner J., Sprissler J., Cathomen T., Furst D., Schrezenmeier H., Debatin K.M., Schwarz K., Felgentreff K. Natural killer cells generated from human induced pluripotent stem cells mature to CD56(bright)CD16(+) NKp80(+/-)In-Vitro and Express KIR2DL2/DL3 and KIR3DL1. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 640672. doi: 10.3389/fimmu.2021.640672.
8. Gamliel M., Goldman-Wohl D., Isaacson B., Gur C., Stein N., Yamin R., Berger M., Grunewald M., Keshet E., Rais Y., Bornstein C., David E., Jelinski A., Eisenberg I., Greenfield C., Ben-David A., Imbar T., Gilad R., Haimov-Kochman R., Mankuta D., Elami-Suzin M., Amit I., Hanna J.H., Yagel S., Mandelboim O. Trained memory of human uterine NK cells enhances their function in subsequent pregnancies. *Immunity*, 2018, Vol. 48, no. 5, pp. 951-962.e5.
9. Godfrey D.I., MacDonald H.R., Kronenberg M., Smyth M.J., van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, no. 3, pp. 231-237.
10. Habets D.H.J., Schlutter A., van Kuijk S.M.J., Spaanderman M.E.A., Al-Nasiry S., Wieten L. Natural killer cell profiles in recurrent pregnancy loss: Increased expression and positive associations with TACTILE and LILRB1. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2022, Vol. 88, no. 5, e13612.
11. Hosseini S., Shokri F., Pour S.A., Khoshnoodi J., Jeddi-Tehrani M., Zarnani A.H. Diminished frequency of menstrual and peripheral blood NKT-like cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion and infertile women. *Reprod. Sci.*, 2019, Vol. 26, no. 1, pp. 97-108.
12. Hromadnikova I., Li S., Kotlabova K., Dickinson A.M. Influence of in vitro IL-2 or IL-15 alone or in combination with Hsp 70 derived 14-mer peptide (TKD) on the expression of NK cell activatory and inhibitory receptors on peripheral blood T Cells, B Cells and NKT Cells. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 3, e0151535. doi: 10.1371/journal.pone.0151535.
13. Huang C., Xiang Z., Zhang Y., Li Y., Xu J., Zhang H., Zeng Y., Tu W. NKG2D as a cell surface marker on gammadelta-T cells for predicting pregnancy outcomes in patients with unexplained repeated implantation failure. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 631077. doi: 10.3389/fimmu.2021.631077.
14. Jafarpour R., Pashangzadeh S., Mehdizadeh S., Bayatipoor H., Shojaei Z., Motallebnezhad M. Functional significance of lymphocytes in pregnancy and lymphocyte immunotherapy in infertility: A comprehensive review and update. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 87, 106776. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106776.
15. Keskin D.B., Allan D.S., Rybalov B., Andzelm M.M., Stern J.N., Kopcow H.D., Koopman L.A., Strominger J.L. TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 9, pp. 3378-3383.
16. Laskarin G., Strbo N., Crncic T.B., Juretic K., Bataille N.L., Chaouat G., Rukavina D. Physiological role of IL-15 and IL-18 at the maternal-fetal interface. *Chem. Immunol. Allergy*, 2005, Vol. 89, pp. 10-25.
17. Lee S.K., Kim C.J., Kim D.J., Kang J.H. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Netw.*, 2015, Vol. 15, no. 1, pp. 16-26.

18. Liu J., Song G., Lin X., Pang X., Meng T. Upregulated unique long 16 binding protein 1 detected in preeclamptic placenta affects human extravillous trophoblast cell line (HTR-8/SVneo) invasion by modulating the function of uterine natural killer cells. *Exp. Ther. Med.*, 2017, Vol. 13, no. 4, pp. 1447-1455.
19. Liu M., Meng Y., Zhang L., Han Z., Feng X. High-efficient generation of natural killer cells from peripheral blood with preferable cell vitality and enhanced cytotoxicity by combination of IL-2, IL-15 and IL-18. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2021, Vol. 534, pp. 149-156.
20. Marlin R., Duriez M., Berkane N., de Truchis C., Madec Y., Rey-Cuille M.A., Cummings J.S., Cannou C., Quillay H., Barre-Sinoussi F., Nugeyre M.T., Menu E. Dynamic shift from CD85j/ILT-2 to NKG2D NK receptor expression pattern on human decidual NK during the first trimester of pregnancy. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 1, e30017. doi: 10.1371/journal.pone.0030017.
21. Meggyes M., Miko E., Szigeti B., Farkas N., Szereday L. The importance of the PD-1/PD-L1 pathway at the maternal-fetal interface. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2019, Vol. 19, no. 1, 74. doi: 10.1186/s12884-019-2218-6.
22. Meggyes M., Nagy D.U., Saad Al Deen I., Parkanyi B., Szereday L. CD8+ and CD8- NKT Cells Exhibit Phenotypic Changes During Pregnancy. *Immunol. Invest.*, 2023, Vol. 52, no. 1, pp. 35-51.
23. Moffett A., Shreeve N. First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Hum. Reprod.*, 2015, Vol. 30, no. 7, pp. 1519-1525.
24. Molfetta R., Quatrini L., Santoni A., Paolini R. Regulation of NKG2D-Dependent NK cell functions: the yin and the yang of receptor endocytosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 8, 1677. doi: 10.3390/ijms18081677.
25. Pathare A.D.S., Loid M., Saare M., Gidlof S.B., Zamani Esteki M., Acharya G., Peters M., Salumets A. Endometrial receptivity in women of advanced age: an underrated factor in infertility. *Hum. Reprod. Update*, 2023, Vol. 29, no. 6, pp. 773-793.
26. Quatrini L., Della Chiesa M., Sivori S., Mingari M.C., Pende D., Moretta L. Human NK cells, their receptors and function. *Eur. J. Immunol.*, 2021, Vol. 51, no. 7, pp. 1566-1579.
27. Rao V.A., Kurian N.K., Rao K.A. Cytokines, NK cells and regulatory T cell functions in normal pregnancy and reproductive failures. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2023, Vol. 89, no. 2, e13667. doi: 10.1111/aji.13667.
28. Sacks G., Yang Y., Gowen E., Smith S., Fay L., Chapman M. Detailed analysis of peripheral blood natural killer cells in women with repeated IVF failure. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2012, Vol. 67, no. 5, pp. 434-442.
29. Santillan I., Lozano I., Illan J., Verdu V., Coca S., Bajo-Arenas J.M., Martinez F. Where and when should natural killer cells be tested in women with repeated implantation failure? *J. Reprod. Immunol.*, 2015, Vol. 108, pp. 142-148.
30. Seshadri S., Sunkara S.K. Natural killer cells in female infertility and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*, 2014, Vol. 20, no. 3, pp. 429-438.
31. Sharma S., Godbole G., Modi D. Decidual control of trophoblast invasion. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 75, no. 3, pp. 341-350.
32. Shojaei Z., Jafarpour R., Mehdizadeh S., Bayatipoor H., Pashangzadeh S., Motalebnezhad M. Functional prominence of natural killer cells and natural killer T cells in pregnancy and infertility: A comprehensive review and update. *Pathol. Res. Pract.*, 2022, Vol. 238, 154062. doi: 10.1016/j.prp.2022.154062.
33. Somigliana E., Li Piani L., Paffoni A., Salmeri N., Orsi M., Benaglia L., Vercellini P., Vigano P. Endometriosis and IVF treatment outcomes: unpacking the process. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2023, Vol. 21, no. 1, pp. 107-118.
34. Sunkara S.K., Kamath M.S., Pandian Z., Gibreel A., Bhattacharya S. In vitro fertilisation for unexplained subfertility. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2023, Vol. 9, no. 9, CD003357. doi: 10.1002/14651858.CD003357.pub5.
35. Tsuda H., Sakai M., Michimata T., Tanebe K., Hayakawa S., Saito S. Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2001, Vol. 45, no. 5, pp. 295-302.
36. Vacca P., Cantoni C., Prato C., Fulcheri E., Moretta A., Moretta L., Mingari M.C. Regulatory role of NKp44, NKp46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells. *Int. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 11, pp. 1395-1405.
37. van den Heuvel M.J., Peralta C.G., Hatta K., Han V.K., Clark D.A. Decline in number of elevated blood CD3(+) CD56(+) NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2007, Vol. 58, no. 5, pp. 447-459.
38. Vomstein K., Egerup P., Kolte A.M., Behrendt-Moller I., Boje A.D., Bertelsen M.L., Eiken C.S., Reiersen M.R., Toth B., la Cour Freiesleben N., Nielsen H.S. Biopsy-free profiling of the uterine immune system in patients with recurrent pregnancy loss and unexplained infertility. *Reprod. Biomed. Online*, 2023, Vol. 47, no. 2, 103207. doi: 10.1016/j.rbmo.2023.03.018.
39. Wallace A.E., Goulwara S.S., Whitley G.S., Cartwright J.E. Oxygen modulates human decidual natural killer cell surface receptor expression and interactions with trophoblasts. *Biol. Reprod.*, 2014, Vol. 91, no. 6, pp. 134-140.
40. Wang C., Zhao X., Zhang H., Bing Z., Wu Y., Li R., Yang Y., Yang K. Comprehensive analysis of immune-related genes associated with the microenvironment of patients with unexplained infertility. *Ann. Transl. Med.*, 2023, Vol. 11, no. 2, pp. 84-105.

41. Whettlock E.M., Woon E.V., Cuff A.O., Browne B., Johnson M.R., Male V. Dynamic changes in uterine NK cell subset frequency and function over the menstrual cycle and pregnancy. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 880438. doi: 10.3389/fimmu.2022.880438.
42. Wu X., Sharma A., Oldenburg J., Weiher H., Essler M., Skowasch D., Schmidt-Wolf I.G.H. NKG2D engagement alone is sufficient to activate cytokine-induced killer cells while 2B4 only provides limited coactivation. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 731767. doi: 10.3389/fimmu.2021.731767.
43. Xiao H., Lin R., Chen C., Lian R., Wu Y., Diao L., Yin T., Huang C. gammadelta-T cell with high toxic potential was associated with recurrent miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2023, Vol. 90, no. 1, e13717. doi: 10.1111/aji.13717.
44. Yamamoto T., Takahashi Y., Kase N., Mori H. Proportion of CD56+3+ T cells in decidual and peripheral lymphocytes of normal pregnancy and spontaneous abortion with and without history of recurrent abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1999, Vol. 42, no. 6, pp. 355-360.
45. Yang H.L., Zhou W.J., Lu H., Lei S.T., Ha S.Y., Lai Z.Z., Zheng Z.M., Ruan L.Y., He Y.Y., Li D.J., Li M.Q., Shao J. Decidual stromal cells promote the differentiation of CD56(bright) CD16(-) NK cells by secreting IL-24 in early pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2019, Vol. 81, no. 6, e13110. doi: 10.1111/aji.13110.
46. Zhao J., Huang B., Li N., Wang X., Xu B., Li Y. Relationship between advanced maternal age and decline of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany NY)*, 2023, Vol. 15, no. 7, pp. 2460-2472.

---

**Авторы:**

**Михайлова В.А.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Давыдова А.А.** — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Загайнова В.А.** — врач — акушер-гинеколог отделения вспомогательных репродуктивных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Марко О.Б.** — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

---

**Authors:**

**Mikhailova V.A.**, PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Davydova A.A.**, Junior Researcher, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Zagaynova V.A.**, Obstetrician-Gynecologist, Department of Assisted Reproductive Technologies, D. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Marko O.B.**, Junior Researcher, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Мкртчян Э.Р.** — лаборант лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Жгулева А.С.** — лаборант лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Бакулина О.А.** — лаборант лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Сельков С.А.** — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Беспалова О.Н.** — д.м.н., заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Соколов Д.И.** — д.б.н., заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Mkrtychyan E.R.**, Laboratory Assistant, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Zhguleva A.S.**, Laboratory Assistant, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Bakulina O.A.**, Laboratory Assistant, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Selkov S.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Chief Researcher, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Bespalova O.N.**, PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Research, D. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Sokolov D.I.**, PhD, MD (Biology), Head, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute for Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 28.12.2023

Отправлена на доработку 21.02.2024

Принята к печати 09.03.2024

Received 28.12.2023

Revision received 21.02.2024

Accepted 09.03.2024

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ И РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

Чепанов С.В.<sup>1</sup>, Сиротская А.А.<sup>2</sup>, Соколов Д.И.<sup>1</sup>, Беспалова О.Н.<sup>1</sup>,  
Бабаков В.Н.<sup>3</sup>, Роговская Н.Ю.<sup>3</sup>, Орлова Е.С.<sup>1</sup>, Сельков С.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства России, г. п. Кузьмоловский, г. п. Кузьмоловское, мкр-н Всеволожский, Ленинградская обл., Россия

**Резюме.** Цель работы – оценить уровень цитокинов и ростовых факторов в периферической крови у женщин с невынашиванием беременности, в том числе на фоне носительства антифосфолипидных антител (АФА). Обследованы 88 женщин в возрасте от 22 до 45 лет. Пациентки были разделены на группы: группа контроля – женщины с физиологически протекавшей беременностью и основная группа – женщины с одним и более случаями невынашивания беременности в анамнезе. Основная группа была подразделена на подгруппы в зависимости от наличия либо отсутствия в сыворотке крови АФА. В свою очередь, подгруппа с наличием АФА и невынашиванием беременности в анамнезе была подразделена на подгруппы с высоким и низким уровнем АФА. В сыворотках и плазме периферической крови определяли уровни антител к кардиолипину и бета-2-гликопротеину-I и концентрацию цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, bFGF, G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IP-10, MCP-1(MCAF), MIP-1 $\alpha$ , PDGF-BB, MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF $\alpha$ , VEGF). Установлено, что женщины с невынашиванием в анамнезе как без АФА, так и с аутоантителами находятся в группе риска в связи с повышением содержания провоспалительных цитокинов в периферической крови; женщины с АФА и привычным выкидышем (ПВ) в анамнезе являются, кроме того, группой, угрожаемой по развитию преэклампсии в связи с повышением VEGF,

### Адрес для переписки:

Орлова Екатерина Сергеевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»  
199034, Россия, Санкт-Петербург,  
Менделеевская линия, 3.  
Тел.: 8 (812) 328-98-40.  
E-mail: kate-obstetrician@yandex.ru

### Address for correspondence:

Ekaterina S. Orlova  
D. Ott Research Institute of Obstetrics,  
Gynecology and Reproductology  
3 Mendeleev Line  
St. Petersburg  
199034 Russian Federation  
Phone: +7 (812) 328-98-40.  
E-mail: kate-obstetrician@yandex.ru

### Образец цитирования:

С.В. Чепанов, А.А. Сиротская, Д.И. Соколов, О.Н. Беспалова, В.Н. Бабаков, Н.Ю. Роговская, Е.С. Орлова, С.А. Сельков «Определение уровня цитокинов и ростовых факторов для оценки эндотелиальной дисфункции при репродуктивных патологиях» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 4. С. 803-822.  
doi: 10.15789/1563-0625-DOC-2939

© Чепанов С.В. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

S.V. Chepanov, A.A. Sirotskaya, D.I. Sokolov, O.N. Bespalova, V.N. Babakov, N.Yu. Rogovskaya, E.S. Orlova, S.A. Selkov  
“Determination of cytokine and growth factor levels to assess endothelial dysfunction in reproductive pathologies”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 4, pp. 803-822.  
doi: 10.15789/1563-0625-DOC-2939

© Chepanov S.V. et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-DOC-2939

IL-6 и IL-8 в периферической крови. АФА независимо от уровня могут вносить свой вклад в развитие патологического процесса; у женщин с АФА выявлено нарушение баланса про- и противовоспалительных цитокинов за счет снижения компенсаторного противовоспалительного ответа. Установлено, что женщины с АФА и ПВ в анамнезе более подвержены развитию плацентарных нарушений. Определение комплекса иммунологических маркеров позволяет уточнить различные патофизиологические пути реализации акушерской патологии, в том числе невынашивания беременности. Особенно перспективным в этом плане является поиск наиболее значимых сочетаний про- и противовоспалительных цитокинов, ростовых, в том числе ангиогенных факторов как с позитивной, так и с негативной регуляцией.

*Ключевые слова: антифосфолипидные антитела, носительство антифосфолипидных антител, эндотелиальная дисфункция, цитокины, привычное невынашивание беременности*

## DETERMINATION OF CYTOKINE AND GROWTH FACTOR LEVELS TO ASSESS ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN REPRODUCTIVE PATHOLOGIES

Chepanov S.V.<sup>a</sup>, Sirotskaya A.A.<sup>b</sup>, Sokolov D.I.<sup>a</sup>, Beshpalova O.N.<sup>a</sup>, Babakov V.N.<sup>c</sup>, Rogovskaya N.Yu.<sup>c</sup>, Orlova E.S.<sup>a</sup>, Selkov S.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Kuzmolovskoye settlement, Kuzmolovskoye settlement, Vsevolozhsky microdistrict, Leningrad Region, Russian Federation

**Abstract.** Our objective was to evaluate the level of cytokines and growth factors in peripheral blood in women with pregnancy failure, including women with detectable antiphospholipid antibodies (APhA). Eighty-eight women aged 22 to 45 years were examined. The patients were divided into groups: control group included women with physiologically normal pregnancy; the main group consisted of women with a history of one or more cases of miscarriage. The main group was subdivided into subgroups depending on the presence or absence of APhA in blood serum. The APhA-positive subgroup and a history of miscarriage was then subdivided into subgroups with high and low levels as measured by ELISA test. We evaluated the levels of antibodies to cardiolipin and beta2-glycoprotein-I, and the concentrations of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, bFGF, G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 $\alpha$ , PDGF-BB, MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF $\alpha$ , VEGF) in their blood serum and plasma samples. Women with a history of miscarriage, either negative or positive for APhA, are at risk, having an increased contents of proinflammatory cytokines in peripheral blood. Moreover, the women with APhA and a history of miscarriage comprise a group at risk for developing preeclampsia, having increased VEGF, IL-6 and IL-8 levels in peripheral blood. AFAs, regardless of their level, may contribute to development of the pathological process, since an imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines has been shown in women with APhA, due to a decrease in compensatory anti-inflammatory response. Women with a history of miscarriage and AFAs are more susceptible to placental disorders. Determination of a complex of immunological markers enabled us to clarify various pathophysiological pathways of obstetric pathology, including miscarriage of pregnancy. In this regard, the promising approach would be a search for the most significant combinations of pro- and anti-inflammatory cytokines, growth-promoting and angiogenic factors with both positive and negative regulation.

*Keywords: antiphospholipid antibodies, circulating, endothelial dysfunction, cytokines, recurrent miscarriage*

## Введение

Привычным выкидышем (ПВ) в отечественной практике называют две и более потери беременности от момента зачатия до 22 недель, по данным ESHRE до 24 недель [12]. Распространенность ПВ в популяции составляет 1-5%. Около 80% эпизодов ПВ происходит до 12 недель беременности. Среди большого спектра причин ПВ генетические составляют – 3-6%, анатомические – 10-16%, инфекционно-воспалительные – 10-15%, эндокринные – 12-15%, аутоиммунные – до 15%, тромбофилические – 10%. Этиология ПВ в половине случаев остается неясной. Именно эти женщины с неясными причинами ПВ формируют группу идиопатического невынашивания беременности. При этом среди патофизиологических факторов невынашивания в 2/3 случаев ведущую роль играют различные иммунные механизмы. В то же время оценка иммунологического профиля пациенток проходит, как правило, на конечном этапе всего исследования, после исключения других возможных механизмов реализации потерь плода [4].

Успешная реализация репродуктивной функции определяется развитием полноценных гамет, оптимальными условиями оплодотворения, адекватной имплантацией и инвазией трофобласта, конструктивным взаимодействием клеток материнского организма и полуаллогенного плода. Для благоприятного течения данных процессов должен быть адекватный иммунологический контроль, который определяется развитием иммунологической толерантности. Предложенная Wegmann T.G. и соавт. Th1/Th2-парадигма иллюстрирует баланс между «активирующими» и «супрессирующими» компонентами иммунной системы [46]. Нарушение этого баланса приводит к репродуктивным потерям. При этом определяющую роль в активации «супрессирующих» или «активирующих» компонентов иммунной системы материнского организма играют цитокины.

Следует, однако, признать, что эта концепция носит общий характер, зачастую не объясняя развитие репродуктивных патологий. В настоящее время исследование соотношения Th1/Th2-лимфоцитов, оценка НК-клеток и их функциональной активности, T-регуляторных клеток, уровень цитокинов не используется в рутинной практике с целью уточнения причин репродуктивных потерь [12]. Единственным иммунологическим биомаркером, рекомендуемым для обследования женщин при ПВ, являются антифосфолипидные антитела (АФА). АФА – это гетерогенная группа органонеспецифических аутоантител, которые выявляются в популяции в 5%

случаев [28]. В то же время у женщин, в анамнезе которых имелись случаи привычного невынашивания беременности и/или мертворождение, АФА выявляются в 40% случаев. Патологические состояния в акушерской практике, обусловленные наличием АФА, вызывает развитие преэклампсии, задержки внутриутробного развития плода, преждевременных родов, неудачи ЭКО [8, 36, 42]. Появление АФА связывают с такими триггерами, как инфекции, новообразования, прием лекарственных препаратов [36]. АФА, взаимодействуя с эндотелиальными клетками, приводят к повышению экспрессии молекул адгезии и синтезу провоспалительных цитокинов, индуцируя таким образом провоспалительный и прокоагулянтный фенотип эндотелия [28]. Описано прямое повреждающее воздействие АФА на клетки трофобласта [18, 19], что приводит к снижению ими продукции хорионического гонадотропина [28, 48].

Открытым остается вопрос о роли показателей уровня цитокинов в периферической крови в качестве предиктора осложнений, несмотря на относительную простоту и доступность данного метода исследования. Таким образом, **цель нашего исследования** – оценить уровень цитокинов и ростовых факторов в периферической крови у женщин с невынашиванием беременности, в том числе на фоне носительства АФА.

## Материалы и методы

### Дизайн исследования

В ретроспективное, одноцентровое, «случай – контроль» исследование, проведенное на базе ФГБНУ НИИ АГиР им. Д.О. Отта в рамках инициативного исследования, было включено 88 женщин в возрасте от 22 до 45 лет.

Пациентки были разделены на группы:

- Группа А: женщины с одним и более случаями невынашивания беременности в анамнезе (n = 78). Группа А была разделена на две подгруппы: подгруппа 1 женщины с одним и более случаями невынашивания беременности в анамнезе и отсутствием АФА (n = 30) и подгруппа 2 женщины с одним и более случаями невынашивания беременности в анамнезе с наличием АФА (n = 48). Подгруппа 2, в свою очередь, разделена на две подгруппы: 2а – пациентки с низким уровнем АФА (10-20 МЕ/мл) (n = 18) и 2б – пациентки с высоким уровнем АФА (более 20 МЕ/мл) (n = 30).
- Группа Б: женщины с физиологически протекавшей беременностью, группа контроля (n = 10).

Критерии исключения: генетические, инфекционные, эндокринные, анатомические факторы

невынашивания, многоплодная беременность, тяжелая сопутствующая соматическая патология, острые воспалительные заболевания или обострение хронических на момент взятия биологического материала.

#### Методы исследования

Определение уровня антител к кардиолипину и бета-2-гликопротеину-I проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем Orgentec Diagnostika GmbH (Германия). Концентрацию цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, bFGF, G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IP-10, MCP-1(MCAF), MIP-1 $\alpha$ , PDGF-BB, MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF $\alpha$ , VEGF) в периферической крови определяли с помощью системы Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex (США).

#### Методы статистической обработки

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, LLC, США). Количественные показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>). Для анализа значений между группами использовали методы Краскела–Уоллиса (для нескольких групп) и критерий Манна–Уитни (для двух групп). Статистическая обработка качественных признаков проводилась с применением критерия  $\chi^2$  Пирсона. Критерием значимости статистических различий принимали 95%-ный уровень значимости ( $p < 0,05$ ).

## Результаты

Пациентки в группах были сопоставимы по возрасту и сроку гестации. Количество эпизодов невынашивания беременности у исследуемых женщин в среднем составляло 2 эпизода. Антенатальная гибель плода в анамнезе наблюдалась как в группе с невынашиванием без АФА, так и в группе с невынашиванием и выявленными АФА (табл. 1).

У пациенток в исследуемых группах были измерены уровни цитокинов, хемокинов и ростовых факторов.

В группе А с невынашиванием беременности в целом по сравнению с группой с физиологически протекающей беременностью, статистически значимых различий по уровню провоспалительных цитокинов мы не получили, хотя и имелась тенденция к их более высоким значениям. Однако при выделении групп с выявленными АФА и без АФА отдельно, были получены статистически значимые различия. Так, уровни IL-6, IL-8, IL-5, IL-15, отражающие сдвиг иммунологиче-

ских реакций в сторону провоспалительных, был значимо повышен в группах с невынашиванием беременности и выявленными АФА по сравнению с группой с физиологически протекающей беременностью, что указывает на участие АФА в индукции патологических процессов. Отмечалась также тенденция к более высокому уровню провоспалительных цитокинов в группе с невынашиванием беременности и выявленными АФА по сравнению с группой без АФА, хотя значимых различий мы и не получили. Статистически значимых различий по уровню провоспалительных цитокинов между группами с высоким и низким уровнем АФА мы не выявили. Уровень противовоспалительного цитокина IL-10 был значимо повышен в общей группе с невынашиванием беременности в целом по сравнению с группой контроля, что, вероятно, отражает развитие компенсаторных механизмов в ответ на формирование провоспалительного фенотипа (табл. 2).

Оценка содержания ростовых факторов в периферической крови показала значимое увеличение фактора роста фибробластов (FGF), гранулоцитарно-макрофагального фактора роста (GM-CSF) в группе с невынашиванием беременности без АФА по сравнению с контрольной группой. Уровень сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) был значимо повышен в группе с невынашиванием беременности и выявленными АФА по сравнению с группой контроля и невынашиванием без АФА. Наибольшие концентрации VEGF отмечались в группе с высоким уровнем АФА.

Иммунный гомеостаз в организме обеспечивается постоянным балансом между активирующими и супрессирующими факторами. Для формализованной оценки данного баланса нами были рассчитаны коэффициенты, характеризующие соотношение про- и противовоспалительных, ангиогенных и антиангиогенных факторов (табл. 3 и 4).

При таком подходе было показано смещение равновесия в сторону противовоспалительных реакций в группе женщин с невынашиванием беременности без АФА по сравнению с группой женщин с выявленными АФА IL-10/IL-2 ( $p < 0,05$ ), IL-10/IL-6 ( $p < 0,05$ ), IL-10/IL-8 ( $p < 0,05$ ), IL-4/IL-8 ( $p < 0,05$ ); IL-13/IL-8 ( $p < 0,05$ ) (табл. 3). Это противоречие, вероятно, отражает преобладание и иных механизмов реализации невынашивания беременности при наличии АФА, связанных не только с воспалительными реакциями, а активацией тромбоцитов и цитопатическими эффектами антител на эндотелий, что в конечном итоге приводит к микроциркуляторным нарушениям. Кроме того, избыточная выработка супрессивных

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF THE STUDY GROUPS

	Невынашивание без АФА Miscarriage without APA (n = 30)	Невынашивание + АФА низкий уровень Miscarriage + APA low level (n = 18)	Невынашивание + АФА высокий уровень Miscarriage + APA high level (n = 30)	Физиологическая беременность Physiological pregnancy (n = 10)	p-значение p-level
	Группа 1 Group 1	Группа 2a Group 2a	Группа 2б Group 2b	Группа Б Group B	
Возраст, лет Age, years	34 (30-36)	35,5 (33,5-38,5)	33 (31,5-37,0)	31,5 (27,7-33,7)	p > 0,05
Срок гестации Gestational age	10 (7-12)	10 (8-11)	9,5 (7,5-13,0)	9,5 (7-13)	p > 0,05
Количество эпизодов невынашивания в анамнезе Number of episodes of miscarriage in the anamnesis	2 (1-3)	2 (2-2)	2 (1,7-3,0)	0	<b>p<sub>Б-1, 2a, 2б</sub> &lt; 0,0001</b> p <sub>Б-1, 2a, 2б</sub> < 0.0001
Аntenатальная гибель плода Antenatal fetal death	13,3% (n = 4)	0	13,3% (n = 4)	0	p > 0,05
Самопроизвольная беременность Spontaneous pregnancy	73,3% (n = 22)	60% (n = 11)	93,3% (n = 28)	80% (n = 8)	p > 0,05
Беременность в результате ВРТ ЭКО/ИКСИ Pregnancy as a result of ART IVF/ICSI	26,7% (n = 8)	40% (n = 7)	6,7% (n = 2)	20% (n = 2)	p > 0,05
Уровень КЛ CL level	3,7 (3,1-4,3)	13,6 (12,9-16,4)	23,7 (13,6-40,2)	2,4 (2,1-3,2)	<b>p<sub>2a-1, Б</sub> &lt; 0,001</b> p <sub>2a-1, Б</sub> < 0.001 <b>p<sub>2б-1, Б</sub> &lt; 0,001</b> p <sub>2б-1, Б</sub> < 0.001 <b>p<sub>2a-2б</sub> &lt; 0,01</b> p <sub>2a-2б</sub> < 0.01
Уровень β2ГП-I β2gp-1 level	3,4 (3,2-3,7)	15,6 (13,6-18,5)	26,9 (15,3-38,7)	3,2 (2,5-3,9)	<b>p<sub>2a-1, Б</sub> &lt; 0,001</b> p <sub>2a-1, Б</sub> < 0.001 <b>p<sub>2a-1, Б</sub> &lt; 0,001</b> p <sub>2a-1, Б</sub> < 0.001 <b>p<sub>2a-2б</sub> &lt; 0,01</b> p <sub>2a-2б</sub> < 0.01

факторов также может приводить к нарушению развития плаценты, что соответствует данным о прямом повреждающем действии АФА на трофобласт [7, 8]. При использовании аналогичного подхода в отношении про- и антиангиогенных

факторов, установлено смещение баланса ангиогенных факторов в сторону стимуляции ангиогенеза в группе с невынашиванием беременности и выявленными АФА по сравнению с группой женщин без АФА Eotaxin/IP-10 (p < 0,01) (табл. 4).

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ, ХЕМОКИНОВ И РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ  
TABLE 2. LEVELS OF CYTOKINES, CHEMOKINES AND GROWTH FACTORS IN PERIPHERAL BLOOD

Цитокины Cytokines	Невынашивание Miscarriage (n = 78)	Невынашивание без АФА Miscarriage without APA (n = 30)	Невынашивание и наличие АФА Miscarriage + APA (n = 48)	Невынашивание + АФА низкий уровень Miscarriage + APA low level (n = 18)	Невынашивание + АФА высокий уровень Miscarriage + APA high level (n = 30)	Физиологическая беременность Physiological pregnancy (n = 10)	p-значение p-level
	Группа А Group A	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 2а Group 2a	Группа 2б Group 2b	Группа Б Group B	
IL-1β	19,24 (17,7-20,6)	18,2 (16-19)	17 (16-19)	17 (16,0-18,5)	17 (16,0-19,2)	16,2 (14,7-17,0)	p > 0,05
IL-2	6,1 (4,4-6,9)	6,1 (4,7-6,9)	6,1 (4,37-7,60)	6,75 (5,9-8,7)	5,24 (3,8-6,9)	4,15 (2,60-5,12)	p > 0,05
IL-6	5,23 (4,5-6,6)	5,05 (4,0-6,1)	5,23** (4,52-6,64)	5,23* (4,79-6,11)	5,23* (4,10-6,64)	3,81 (3,0-3,9)	$P_{2-B} < 0,001$ $P_{2-B} < 0,001$ $P_{2a-B} < 0,05$ $P_{2a-B} < 0,05$ $P_{3b-B} < 0,05$ $P_{3b-B} < 0,05$
IL-8 (CXCL8)	10,9 (8,3-16,3)	10,07 (7,0-13,8)	11,22* (8,8-19,2)	13,36 * (8,6-23,2)	10,84 (8,7-17,5)	8,52 (4,4-13,0)	$P_{2-B} < 0,05$ $P_{2-B} < 0,05$ $P_{2a-B} < 0,05$ $P_{2a-B} < 0,05$
IL-12	19,3 (17,8-22)	19 (18-22)	18,25 (17,1-21,3)	18 (17,0-18,5)	19 (18-21)	18 (16-19)	p > 0,05
IL-17A	297 (250-417)	356 (250-441)	291 (250-392)	279 (239-420)	291 (273-392)	244 (170-321)	p > 0,05
IL-5	13,5 (12-15)	13,25* (12-16)	13,75* (13-15)	13,25 (12,3-14,2)	14** (13-15)	12 (11,0-12,5)	$P_{1-B} < 0,05$ $P_{1-B} < 0,05$ $P_{2-B} < 0,05$ $P_{2-B} < 0,05$ $P_{2b-B} < 0,01$ $P_{2b-B} < 0,01$

Таблица 2 (продолжение)  
Table 2 (continued)

Цитокины Cytokines	Невынашивание Miscarriage (n = 78)	Невынашивание без АФА Miscarriage without APA (n = 30)	Невынашивание и наличие АФА Miscarriage + APA (n = 48)	Невынашивание + АФА низкий уровень Miscarriage + APA low level (n = 18)	Невынашивание + АФА высокий уровень Miscarriage + APA high level (n = 30)	Физиологическая беременность Physiological pregnancy (n = 10)	p-значение p-level
	Группа А Group A	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 2а Group 2a	Группа 2б Group 2b	Группа Б Group B	
IL-7	19 (18-20)	19 (18-20)	18 (18,00-19,88)	19 (17,75-20,00)	18 (17,0-19,2)	17,5 (16-19)	p > 0,05
IL-9	57,7 (43,1-74,7)	52,62 (39,1-77,3)	59,3 (43,9-72,3)	55,9 (44,2-68,0)	60,11 (43,5-75,7)	44,16 (38,6-54,5)	p > 0,05
IL-15	26,5 (24,5-29,0)	26,75* (24-29)	26,5* (24,5-28,3)	26,75* (24,5-29,2)	26 (24,00-28,13)	22,75 (22,3-26,1)	$P_{1-Б} < 0,05$ $P_{1-Б} < 0,05$ $P_{2-Б} < 0,05$ $P_{2-Б} < 0,05$ $P_{2a-Б} < 0,05$ $P_{2a-Б} < 0,05$
IL-4	0,58 (0,3-0,9)	0,67 (0,3-0,8)	0,54 (0,35-0,88)	0,54 (0,3-0,9)	0,54 (0,30-0,76)	0,4 (0,19-0,50)	p > 0,05
IL-10	21,7** (20-24)	23* (20,7-24,0)	21,25 (19,6-23,0)	21 (19,8-24,0)	21,5 (19-23)	19 (17-21)	$P_{1-Б} < 0,05$ $P_{1-Б} < 0,05$ $P_{A-Б} < 0,01$ $P_{A-Б} < 0,01$
IL-13	16,2 (15-18)	17 (15-18)	16 (15,0-17,8)	16 (14,5-17,5)	16 (15-18)	16 (14,0-18,2)	p > 0,05
IL-1ra	224 (152-295)	224 (170-322)	224 (138-273)	251 (184-308)	188 (115-264)	188 (170-242)	p > 0,05
TNFα	149,3 (114-218)	166 (114-218)	149,3 (114-218)	149 (114-260)	175 (114-192)	123,3 (79-183)	p > 0,05
IFNγ	10,1 (8,3-11,0)	10,1 (8,3-11,0)	10,1 (8,6-11,8)	10,56 (9,0-11,8)	10,12 (8,3-11,2)	8,82 (6,7-10,5)	p > 0,05

Таблица 2 (продолжение)  
Table 2 (continued)

Цитокины Cytokines	Невынашивание Miscarriage (n = 78)	Невынашивание без АФА Miscarriage without APA (n = 30)	Невынашивание и наличие АФА Miscarriage + APA (n = 48)	Невынашивание + АФА низкий уровень Miscarriage + APA low level (n = 18)	Невынашивание + АФА высокий уровень Miscarriage + APA high level (n = 30)	Физиологическая беременность Physiological pregnancy (n = 10)	p-значение p-level
	Группа А Group A	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 2а Group 2a	Группа 2б Group 2b	Группа Б Group B	
<b>MCP-1 (CCL2)</b>	14,1 (10,0-23,5)	15,48* (12-27)	12,91 (9,5-20,3)	12,02 (9,0-30,3)	12,91 (9,9-18,0)	10,4 (3,4-13,6)	$p_{1-B} < 0,05$ $p_{1-B} < 0,05$
<b>MIP-1<math>\alpha</math> (CCL3)</b>	5,1 (4,3-6,2)	5,05 (4,1-6,5)	5,32 (4,55-6,12)	5,93 (4,83-7,68)	4,89 (4,4-5,6)	4,94 (4,0-5,8)	$p > 0,05$
<b>MIP-1<math>\beta</math> (CCL4)</b>	109 (71-148)	111 (65-148)	109 (76-148)	113,4 (84-150)	92,0 (72-140)	84 (33-109)	$p > 0,05$
<b>RANTES (CCL5)</b>	15979 (13306-20669)	15397 (13672-20519)	16076 (13230-20748)	19773 (14702-21497)	14904 (12629-20682)	14804 (13116-19099)	$p > 0,05$
<b>Eotaxin (CCL11)</b>	93*** (67-120)	69 (51-94)	109,4*** (82-129)	101** (84-159)	113** (74-129)	60 (41-78)	$p_{A-B} < 0,001$ $p_{A-B} < 0,001$ $p_{2-B} < 0,001$ $p_{2-B} < 0,001$ $p_{2-1} < 0,001$ $p_{2a-B} < 0,05$ $p_{2a-1} < 0,001$ $p_{26-B} < 0,001$ $p_{2b-B} < 0,001$ $p_{26-1} < 0,001$ $p_{2b-1} < 0,001$

Таблица 2 (окончание)  
Table 2 (continued)

Цитокины Cytokines	Невынашивание Miscarriage (n = 78)	Невынашивание без АФА Miscarriage without APA (n = 30)	Невынашивание и наличие АФА Miscarriage + APA (n = 48)	Невынашивание + АФА низкий уровень Miscarriage + APA low level (n = 18)	Невынашивание + АФА высокий уровень Miscarriage + APA high level (n = 30)	Физиологическая беременность Physiological pregnancy (n = 10)	p-значение p-level
	Группа А Group A	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 2а Group 2a	Группа 2б Group 2b	Группа Б Group B	
<b>IP-10 (CXCL10)</b>	665 (529-892)	682 (519-916)	660 (529-964)	610 (509-1185)	668 (530-826)	599 (380-737)	p > 0,05
<b>bFGF</b>	48,8 (33-44)	40,16* (35-44)	37,5 (30,7-43,6)	36,8 (27,2-41,7)	38,8 (32-44)	31,08 (26-36)	<b>p<sub>1-Б</sub> &lt; 0,05</b> p <sub>1-Б</sub> < 0,05
<b>G-CSF</b>	15 (14-16)	15 (14-16)	14,5 (13,5-15,0)	14,5 (13,8-15,0)	14,5 (13-16)	14,5 (13,0-16,2)	p > 0,05
<b>GM-CSF</b>	36** (33-45)	42,25** (34-48)	34,5 (32,00-40,13)	33,5 (31,7-39,3)	35 (32-44)	31,25 (27-35)	<b>p<sub>А-Б</sub> &lt; 0,01</b> p <sub>А-Б</sub> < 0,01 <b>p<sub>1-Б</sub> &lt; 0,01</b> p <sub>1-Б</sub> < 0,01
<b>PDGF-BB</b>	2903 (1953-3865)	3169 (2060-3851)	2756 (1811-4086)	2687 (1576-4182)	2853 (1980-3952)	2731 (1731-3754)	p > 0,05
<b>VEGF</b>	29*** (24,0-31,5)	25 (23-28)	29,25 *** (27,1-32,8)	29** (28,6-34,1)	30,5** (26-32)	24,2 (22-25)	<b>p<sub>А-Б</sub> &lt; 0,001</b> p <sub>А-Б</sub> < 0,001 <b>p<sub>2-Б</sub> &lt; 0,001</b> p <sub>2-Б</sub> < 0,001 p <sub>2-1</sub> < 0,01 <b>p<sub>2a-Б</sub> &lt; 0,01</b> p <sub>2a-Б</sub> < 0,01 <b>p<sub>26-Б</sub> &lt; 0,01</b> p <sub>26-Б</sub> < 0,01 p <sub>26-1</sub> < 0,01 <b>p<sub>26-1</sub> &lt; 0,05</b> p <sub>26-1</sub> < 0,05

ТАБЛИЦА 3. БАЛАНС ПРОТИВО- И ПРОВΟΣПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ

TABLE 3. BALANCE OF ANTI- AND PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES

Соотношение цитокинов Cytokine ratio	Невынашивание (Miscarriage) (n = 78)	Невынашивание без АФА Miscarriage without APA (n = 30)	Невынашивание АФА положительные Miscarriage + APA (n = 48)	Физиологическая беременность Physiological pregnancy (n = 10)	p-рнчение p-level
	Группа А Group A	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа Б Group B	
IL-10/IL-2	0,99 (0,90-1,06)	1,02** (0,95-1,13)	0,95 (0,88-1,04)	0,99 (0,94-1,07)	p <sub>1-2</sub> < 0,01
IL-10/IL-6	1,16 (1,04-1,25)	1,21** (1,14-1,28)	1,07 (0,98-1,20)	1,21 (1,06-1,25)	p <sub>1-2</sub> < 0,01
IL-10/IL-8	0,59 (0,5-0,7)	0,67* (0,56-0,76)	0,57 (0,39-0,67)	0,66 (0,54-0,84)	p <sub>1-2</sub> < 0,05
IL-4/IL-8	0,52 (0,42-0,62)	0,58* (0,47-0,69)	0,48 (0,35-0,61)	0,61 (0,46-0,77)	p <sub>1-2</sub> < 0,05
IL-13/IL-6	0,8 (0,70-0,97)	0,90 (0,8325-0,9700)	0,83 (0,7895-0,9100)	0,91 (0,84-1,10)	p > 0,05
IL-13/IL-8	0,45 (0,36-0,55)	0,51* (0,42-0,59)	0,43 (0,31-0,51)	0,53 (0,37-0,77)	p <sub>1-2</sub> < 0,05
IL-10/IL-1β	1,23 (1,11-1,35)	1,23 (1,15-1,36)	1,21 (1,07-1,33)	1,22 (1,11-1,37)	p > 0,05
IL-10/IL-12	1,13 (1,02-1,22)	1,16 (1,05-1,26)	1,13 (1,02-1,20)	1,12 (0,99-1,28)	p > 0,05
IL-10/IL-17	0,61 (0,56-0,67)	0,62 (0,58-0,66)	0,6 (0,54-0,67)	0,61 (0,56-0,69)	p > 0,05
IL-4/IL-1β	1,07 (1,00-1,19)	1,06 (1,00-1,31)	1,09 (0,96-1,21)	1,07 (0,99-1,27)	p > 0,05
IL-4/IL-2	0,85 (0,78-0,94)	0,86 (0,82-0,96)	0,84 (0,76-0,94)	0,93 (0,81-1,00)	p > 0,05
IL-4/IL-6	1,02 (0,90-1,08)	1,05 (0,92-1,11)	1 (0,89-1,00)	1,044 (0,99-1,10)	p > 0,05
IL-4/IL-12	1 (0,90-1,08)	1 (0,93-1,06)	1 (0,8991-1,0970)	1 (0,91-1,07)	p > 0,05
IL-4/IL-17	0,54 (0,48-0,59)	0,53 (0,47-0,60)	0,54 (0,49-0,59)	0,57 (0,49-0,63)	p > 0,05
IL-13/IL-1β	0,93 (0,83-1,00)	0,93 (0,81-1,01)	0,93 (0,85-1,00)	1,02 (0,90-1,08)	p > 0,05
IL-13/IL-2	0,76 (0,66-0,83)	0,79 (0,67-0,85)	0,74 (0,66-0,82)	0,82 (0,75-0,92)	p > 0,05

Таблица 3 (окончание)  
Table 3 (continued)

Соотношение цитокинов Cytokine ratio	Невынашивание (Miscarriage) (n = 78)	Невынашивание без АФА Miscarriage without APA (n = 30)	Невынашивание АФА положительных Miscarriage + APA (n = 48)	Физиологическая беременность Physiological pregnancy (n = 10)	p-р-начение p-level
	Группа А Group A	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа Б Group B	
IL-13/IL-12	0,85 (0,79-0,92)	0,85 (0,81-0,91)	0,84 (0,78-0,94)	0,94 (0,77-1,01)	p > 0,05
IL-13/IL-17	0,46 (0,42-0,51)	0,47 (0,42-0,52)	0,45 (0,42-0,50)	0,48 (0,45-0,58)	p > 0,05
IL-10/TNF $\alpha$	1,11 (1,00-1,23)	1,14 (1,03-1,27)	1,09 (1,00-1,22)	1,11 (0,93-1,17)	p > 0,05
IL-1ra/IL-1 $\beta$	0,92 (0,85-1,12)	0,93 (0,86-1,11)	1,02 (0,86-1,15)	0,93 (0,80-0,93)	p > 0,05
IL-4/IL-5	1,40 (1,20-1,61)	1,41 (1,24-1,63)	1,35 (1,23-1,61)	1,49 (1,37-1,72)	p > 0,05
IL-4/IL-7	1,0 (0,92-1,06)	1,01 (0,94-1,08)	1,02 (0,93-1,14)	1,06 (0,93-1,11)	p > 0,05
IL-4/IL-9	0,21 (0,17-0,24)	0,23 (0,18-0,26)	0,22 (0,18-0,24)	0,24 (0,22-0,27)	p > 0,05
IL-4/IL-15	0,72 (0,65-0,80)	0,72 (0,66-0,79)	0,71 (0,64-0,78)	0,72 (0,67-0,84)	p > 0,05
IL-10/IL-5	1,63 (1,39-1,86)	1,64 (1,40-1,87)	1,53 (1,40-1,70)	1,65 (1,38-1,85)	p > 0,05
IL-10/IL-7	1,21 (1,10-1,22)	1,2 (1,11-1,26)	1,132 (1,03-1,26)	1,1 (1,05-1,23)	p > 0,05
IL-10/IL-9	0,25 (0,20-0,32)	0,26 (0,21-0,33)	0,25 (0,22-0,28)	0,26 (0,20-0,33)	p > 0,05
IL-10/IL-15	0,82 (0,73-0,90)	0,83 (0,74-0,91)	0,78 (0,73-0,86)	0,83 (0,74-0,89)	p > 0,05
IL-13/IL-5	1,21 (1,11-1,45)	1,20 (1,10-1,44)	1,20 (1,07-1,36)	1,40 (1,13-1,54)	p > 0,05
IL-13/IL-7	0,88 (0,78-0,99)	0,87 (0,79-0,96)	0,87 (0,79-0,94)	0,91 (0,86-1,01)	p > 0,05
IL-13/IL-9	0,20 (0,16-0,24)	0,21 (0,17-0,25)	0,19 (0,16-0,21)	0,22 (0,18-0,24)	p > 0,05
IL-13/IL-15	0,6 (0,55-0,70)	0,61 (0,57-0,69)	0,61 (0,55-0,65)	0,65 (0,59-0,74)	p > 0,05

ТАБЛИЦА 4. СООТНОШЕНИЕ ПРОАНГИОГЕННЫХ И АНТИАНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

TABLE 4. RATIO OF PROANGIOGENIC AND ANTIANGIOGENIC FACTORS

Факторы роста Growth factors	Невынашивание Miscarriage (n = 78)	Невынашивание без АФА Miscarriage without APA (n = 30)	Невынашивание АФА положительные Miscarriage + APA (n = 48)	Физиологическая беременность Physiological pregnancy (n = 10)	p-значение p-level
	Группа А Group A	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа Б Group B	
<b>bFGF/IP-10</b>	0,073 (0,051-0,110)	0,07 (0,05-0,10)	0,075 (0,055-0,100)	0,084 (0,064-0,130)	p > 0,05
<b>GM-CSF/IP-10</b>	0,1 (0,07-0,13)	0,10 (0,077-0,140)	0,096 (0,070-0,120)	0,10 (0,083-0,150)	p > 0,05
<b>MCP-1/IP-10</b>	0,19 (0,13-0,26)	0,20 (0,13-0,35)	0,18 (0,12-0,24)	0,14 (0,11-0,19)	p > 0,05
<b>MIP-1<math>\alpha</math>/IP-10</b>	0,08 (0,05-0,11)	0,07 (0,05-0,10)	0,08 (0,059-0,110)	0,089 (0,08-0,11)	p > 0,05
<b>PDGF-BB/IP-10</b>	3,43 (2,4-5,4)	3,67 (2,51-5,17)	3,27 (2,30-5,58)	3,99 (3,10-5,77)	p > 0,05
<b>MIP-1<math>\beta</math>/IP-10</b>	1,52 (0,98-2,48)	1,69 (0,93-2,51)	1,48 (1,00-2,48)	1,36 (0,93-1,68)	p > 0,05
<b>RANTES/IP-10</b>	43,5 (29,8-61,6)	43,5 (29,5-62,5)	43,9 (28,9-62,3)	50,7 (38,6-76,1)	p > 0,05
<b>TNF<math>\alpha</math>/IP-10</b>	0,05 (0,03-0,07)	0,05 (0,04-0,07)	0,05 (0,03-0,06)	0,05 (0,04-0,09)	p > 0,05
<b>IL-8/IP-10</b>	0,01 (0,008-0,020)	0,01 (0,009-0,020)	0,01 (0,01-0,02)	0,01 (0,008-0,010)	p > 0,05
<b>VEGF/IP-10</b>	0,08 (0,05-0,10)	0,07 (0,04-0,10)	0,08 (0,05-0,11)	0,07 (0,058-0,120)	p > 0,05
<b>Eotaxin/IP-10</b>	0,62 (0,38-0,96)	0,46 (0,34-0,62)	0,83** (0,43-1,12)	0,43 (0,32-0,62)	p <sub>2-ii</sub> < 0,01

## Обсуждение

На сегодняшний день в литературе хорошо описаны нарушения иммунных механизмов регуляции у женщин с привычным невынашиванием, такие как изменение количества и функции децидуальных NK-клеток, повышение их цитотоксической активности, дисбаланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, носящий локальный и системный характер, нарушение соотношения Th1 > Th2 и Th17 > Treg [22, 27, 44, 49]. Отторжение плода происходит за счет

активации воспалительных процессов и чрезмерной лейкоцитарной инфильтрации трофобласта, повреждения трофобласта NK-клетками, цитотоксическими антителами, которые приводят к нарушению микроциркуляторного русла маточно-плацентарного барьера [49]. Однако в зоне маточно-плацентарного взаимодействия оптимальная провоспалительная среда необходима для успешной имплантации и ангиогенеза [23, 41]. Нарушение одного или нескольких механизмов, поддерживающих толерантность при фи-

зиологической беременности, может привести к выкидышу [23, 27, 41, 49].

На сегодняшний день предложено определение провоспалительных цитокинов в амниотической жидкости и шеечно-влагалищном отделяемом в качестве предиктора наступления таких акушерских осложнений, как преждевременное излитие околоплодных вод, преждевременные роды и инфекционные осложнения послеродового периода [3]. Независимо от того, присутствует ли клинически определяемая инфекция, повышение концентрации цитокинов, включая IL-6, IL-1, IL-8 и TNF $\alpha$  в амниотической жидкости или в шеечно-влагалищном отделяемом у пациенток, является прогностическим признаком начала преждевременных родов [50].

В литературе отмечена тенденция к преобладанию цитокинов Th2 > Th1 и Treg > Th17 у женщин с физиологической беременностью в сравнении с группами с угрозой невынашивания и случившимися выкидышами на раннем сроке [23, 44, 49, 50]. При этом имеются данные, что женщины с невынашиванием в анамнезе сохраняют провоспалительный фон и после спонтанного аборта, что повышает у них риск развития сосудистой патологии [43]. Результаты проведенного нами исследования позволили выявить некоторые особенности в содержании про- и противовоспалительных цитокинов, ростовых факторов, индукторов ангиогенеза и его ингибиторов. Анализ полученных данных не указывает однозначно на преобладание цитокинов Th1 или Th2 в исследуемых или контрольной группах, что соотносится с данными литературы и других исследователей [3]. Однако уровень провоспалительных цитокинов, независимо от принадлежности к пулу Th1 или Th2 был выше практически во всех группах женщин с невынашиванием беременности. В нашем исследовании АФА мы рассматриваем как провоспалительные агенты, которые способствуют нарушению цитокинового баланса. У женщин с невынашиванием в анамнезе и наличием АФА нами выявлено повышение уровня провоспалительных цитокинов – IL-6, IL-8, IL-5, IL-15. При этом результаты данного исследования отличаются от результатов похожих работ по изучению цитокинов в периферической крови у беременных женщин [6, 21, 24, 31, 49]. Отчасти это может быть связано с тем, что индукция выработки АФА связана, вероятно, с пролиферацией соответствующих клонов В-лимфоцитов, что сопровождается и усилением выработки цитокинов Th2 (в том числе IL-4, IL-5, IL-6), что, однако, никак нельзя считать благоприятным в контексте Th1/Th2-парадигмы.

IL-5 играет ключевую роль в регуляции функциональной активности эозинофилов, что было подтверждено как *in vivo*, так и *in vitro* [9, 15]. Установлено, что IL-5 избирательно увеличивает не только дегрануляцию, но и пролиферацию, дифференцировку и выживаемость эозинофилов, контролирует рекрутирование эозинофилов [9, 15]. Также за рекрутирование эозинофилов отвечает Eotaxin [9, 15]. Содержание этих цитокинов в периферической крови у женщин с невынашиванием в анамнезе и наличием АФА повышено по данным нашего исследования. Th2 и тучные клетки являются основными продуцентами IL-5 [15], в частности его рассматривают как цитокин, который способствует поддержанию иммунологической толерантности между матерью и плодом [26]. По некоторым данным, за счет участия в ремоделировании сосудов IL-5 благоприятно влияет на имплантацию эмбриона [30]. В то же время в работе Kwiatek M. и соавт. [23], при оценке уровня цитокинов в периферической крови у женщин с уже случившимся выкидышем до 13-й недели, было выявлено повышение значений IL-4 и IL-5 по сравнению с контрольной группой физиологически протекающей беременности.

В нашем исследовании уровень IL-5 был повышен в группах с невынашиванием в анамнезе без АФА, с АФА и с высоким уровнем АФА в сравнении с группой контроля. По данным литературы, роль IL-5 при ПВ неоднозначна. Так, в одном исследовании было обнаружено статистически значимое повышение IL-5 у женщин с замершей беременностью и положительная корреляция этого цитокина с количеством выкидышей в анамнезе [23]. По другим данным, IL-5 достигает значительно более низких уровней в сыворотке крови у женщин с ПВ, чем у женщин с физиологической беременностью в конце первого триместра и до родов [33], другие исследователи не обнаружили IL-5, IL-4, IL-2 и TNF $\beta$  в сыворотке как здоровых беременных женщин, так и женщин с привычным невынашиванием беременности [24].

Действие IL-6 носит плейотропный характер. Так как с одной стороны он стимулирует воспалительные процессы, подавляет пролиферацию лимфоцитов Treg и способствует дифференцировке Th17-лимфоцитов [25, 49], при этом концентрация IL-6 и IL-8 позитивно коррелируют со степенью раскрытия маточного зева при срочных и преждевременных родах [2]. В отсутствие IL-6 TGF- $\beta$  подавляет дифференцировку наивных Т-клеток в клетки Th17, в то время как в присутствии IL-6 наивные Т-клетки дифференцируются в клетки Th17, а существующие Treg клетки могут

функционировать как индукторы клеток Th17 и сами дифференцироваться в клетки Th17 [25, 41, 49]. С другой стороны, IL-6 подавляет секрецию TNF $\alpha$ , стимулирует дифференцировку В-клеток в плазматические клетки, смещая цитокиновый баланс в сторону Th2. Эта универсальность приводит к различной интерпретации роли этого цитокина в исследованиях [20, 23, 49]. IL-6 безусловно необходим для имплантации эмбриона и плацентации, однако также имеются противоречивые сведения о содержании данного цитокина у женщин с неудачными исходами беременности [16, 23, 49]. В целом ряде работ было отмечено повышение его в материнской сыворотке при гестационной артериальной гипертензии и преэклампсии [45], а также в околоплодных водах и шеечных выделениях у женщин с преждевременными родами и начавшимися родами в срок [24, 25, 49] и периферической крови женщин со случившимся выкидышем в II триместре беременности [16]. В нашем исследовании мы получили статистически значимые результаты по IL-6 только в отношении группы с невынашиванием в анамнезе и наличием АФА, как низкого уровня, так и высокого. В этих группах IL-6 был значимо выше, чем в контрольной группе, что может объяснить связь циркулирующих антител с более высоким риском развития акушерских осложнений, в том числе угрозы прерывания беременности на раннем сроке, что также соотносится с данными литературы [47, 48].

IL-8 – это провоспалительный хемокин, локально продуцируемый в ответ на повреждение ткани, что приводит, главным образом, к рекрутированию и активации нейтрофилов. Повышение уровня сывороточного IL-8 ассоциировано с развитием преэклампсии [20]. Ранее показано [16], что уровень IL-8 был повышен у женщин в группе со случившимся выкидышем во II триместре беременности в сравнении с группой контроля. Данный хемокин в нашем исследовании был повышен в группах с невынашиванием и циркулирующими аутоантителами, причем в основном низкого уровня, в сравнении с группой контроля, что может указывать на повреждение эндотелия АФА и выраженный системный воспалительный ответ. Несколько меньшие значения IL-8 у пациенток с высокими титрами АФА, возможно, связаны с переключением на синтез других провоспалительных цитокинов при экспансии патогенных В-лимфоцитов под влиянием IL-4, тенденция к повышению которого также отмечалась, хотя и не имела достоверный характер. Учитывая этот факт, носительство АФА, даже низкого уровня, также можно рассматривать как фактор риска развития преэклампсии и поздних

репродуктивных неудач. Однако носительство АФА не всегда ассоциировано с акушерской патологией и тромбоэмболическими осложнениями [12]. Поэтому следует оценивать уровни провоспалительных цитокинов совместно с уровнем АФА для более точного расчета возникновения риска осложнений.

По данным нашего исследования, содержание в периферической крови IL-10 и GM-CSF было значимо выше в группе с невынашиванием беременности без АФА в сравнении с группой контроля. IL-10 оказывает иммуносупрессивное действие на Th1-контролируемый ответ, влияет на антигенпрезентирующие клетки, которые способствуют анергии Т-клеток и стимулируют регуляторные Т-клетки, секретирующие IL-10 и TGF- $\beta$  [23, 25]. IL-10 ингибирует активацию экспрессии главного комплекса гистосовместимости и костимулирующих молекул на дендритных клетках, снижая их антигенпрезентирующую способность, подавляя высвобождение провоспалительных цитокинов и повышая экспрессию ингибирующих молекул [41]. GM-CSF экспрессируется в эпителиальных клетках маточных труб и матки, способствует имплантации и нормальному развитию эмбриона. Дефицит GM-CSF при беременности негативно влияет на развитие плода и плаценты. Также было показано резкое увеличение на ранних сроках беременности GM-CSF в сыворотке крови при нормальной физиологической беременности, а снижение данного цитокина было связано с выкидышем [6].

В то же время GM-CSF – это Th1-цитокин и его увеличение отражает риски развития клеточноопосредованных цитотоксических эффектов.

Учитывая результаты нашего исследования, мы также можем сделать вывод о влиянии дисбаланса цитокинов на процессы гемостаза. Carp H. и др. установили, что TNF $\alpha$  индуцирует образование тромбина, IL-6 вызывает высвобождение тканевого фактора, который инициирует внешний путь коагуляционного каскада, кроме того, высвобождение IL-8 ассоциировано с образованием тромбина, и напротив цитокины IL-4 и IL-10 подавляют образование тромбина после высвобождения тканевого фактора [13]. То есть группы с АФА, где были повышены IL-6 и IL-8, но при этом не происходило компенсаторного увеличения IL-10, можно рассматривать как группы высокого риска по развитию тромбоэмболических осложнений. IL-15 является ключевым регулятором процесса имплантации плодного яйца. Повышенная экспрессия IL-15 клетками экстравиллезного трофобласта может запускать дифференцировку НК-клеток, нарушать имплантацию и ангиогенез, повреждать плаценту и, таким об-

разом, способствовать отторжению плода [39, 40, 49]. В нашем исследовании мы получили значимое повышение IL-15 в группах с невынашиванием в анамнезе по сравнению с группой контроля. По данным литературы, у женщин более высокая экспрессия в эндометрии IL-15 связана с ПВ. Также экспрессия мРНК IL-15 была значительно увеличена в плацентах пациенток после самопроизвольного аборта [49].

Это лишний раз подтверждает необходимость индивидуального анализа комплекса лабораторных показателей, в том числе включающих определение цитокинов.

Своеобразные изменения во время беременности претерпевают и секреторные продукты моноцитов/макрофагов. Polari L. и соавт. отмечают снижение уровня MCP-1 и IL-1 $\beta$ , и повышение уровня IL-10 в периферической крови женщин с нормальной массой тела и физиологическим течением беременности с 1-го по 3-й триместр [31]. Нами установлено повышение содержания MCP-1 и bFGF в группе с невынашиванием без аутоантител в сравнении с контрольной группой. MCP-1 представляет собой основной медиатор инфильтрации моноцитов/макрофагов в очагах воспаления [10]. Он является одним из ключевых хемокинов, который регулирует миграцию моноцитов/макрофагов и активацию лейкоцитов в эндометрии во время процесса подготовки к имплантации [27], во время срочных родов было показано повышение уровня MCP-1 в миометрии и плодных оболочках, а при преждевременных – в амниотической жидкости [10]. У пациенток после амниоцентеза и последующей потери беременности средний показатель концентрации MCP-1 в амниотической жидкости был выше, чем у пациенток с нормальным исходом беременности [14]. Было показано, что MCP-1 участвует в прогрессировании воспалительных и аутоиммунных заболеваний, и также был повышен у женщин с АФС и ПВ [27].

Факторы роста фибробластов (FGF) представляют собой семейство многофункциональных митогенных полипептидов, которые индуцируют миграцию эндотелиальных клеток и способствуют образованию кровеносных сосудов. Предполагают, что bFGF играет роль в развитии артериальной гипертензии, его повышенная экспрессия может являться следствием неадекватной маточно-плацентарной перфузии и стать причиной плацентарной недостаточности [11]. В исследовании Ozkan S. и соавт. [29] было установлено значительное повышение bFGF в группе женщин с преэклампсией в капиллярах цитотрофобластических клеток ворсин хориона и вневорсинчатых трофобластических и децидуальных

клетках амниохориальной мембраны по сравнению с контрольной группой [29].

Принимая во внимание полученные нами данные по повышению уровня bFGF и MCP-1 в группе с невынашиванием, нужно учитывать возможные риски развития нарушений в маточно-плацентарном кровотоке, артериальной гипертензии и преэклампсии у женщин с ПВ в анамнезе.

Нами также установлено повышение уровня VEGF и Eotaxin в группах с невынашиванием беременности и циркуляцией АФА по сравнению с группой контроля. При этом содержание Eotaxin в группах с АФА было выше и в сравнении с группой без АФА.

Уровень сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) был достоверно повышен в группе с невынашиванием беременности и выявленными АФА по сравнению с группой контроля и невынашиванием без АФА, что было довольно неожиданным. Наибольшие концентрации VEGF отмечались в группе с высоким уровнем АФА. VEGF – фактор роста эндотелия сосудов, представляет собой многофункциональный цитокин, индуцированный гипоксическим стрессом [7], который участвует в образовании и ремоделировании сосудов [34]. VEGF в основном экспрессируется на поверхности клеток синцитиотрофобласта и цитотрофобласта во время беременности [34]. Чрезмерная экспрессия VEGF у экспериментальных животных увеличивает проницаемость кровеносных сосудов и приводит к сильным отекам и смерти [7]. Потеря активности VEGF обычно происходит из-за увеличения продукции его естественного антагониста sFlt-1 (растворимый рецептор VEGF-1/sVEGFR-1) и приводит к нарушению ангиогенеза. Увеличение VEGF приводит к сопутствующему повышению уровня, циркулирующего sFlt-1, предположительно для компенсации повышенной биоактивности VEGF [7]. А sFlt-1, в свою очередь, является главным предиктором развития преэклампсии [51]. По данным литературы, АФА увеличивают секрецию эндотелиальными клетками эндометрия человека (HEEC) проангиогенных факторов VEGF и PlGF [32].

Вероятно, увеличение продукции VEGF при невынашивании следует рассматривать в контексте общей активации эндотелия, которая в экстремальных ситуациях в совокупности с другими факторами активации увеличивает прокоагулянтный фенотип эндотелия, что в конечном итоге приводит к нарушению микроциркуляции.

Eotaxin, экспрессируемый микрососудистыми эндотелиальными клетками человека, является мощным хемоаттрактантом для эозинофилов,

базофилов и Th2-лимфоцитов [37]. Он играет решающую роль в развитии аллергических и неаллергических воспалительных реакций, способствуя васкуляризации в очагах воспаления, а также участвует в ремоделировании стенок сосудов после воздействия таких неблагоприятных факторов как ишемия [35].

Таким образом, избыточная продукция Eotaxin и VEGF в группах с невынашиванием беременности и АФА в сравнении с группой без АФА и контрольной, может свидетельствовать о повышении проницаемости эндотелия, активации трансэндотелиальной миграции, приводящей к усилению воспалительных процессов.

Учитывая отсутствие различий между группами с наличием и отсутствием АФА, кроме Eotaxin и VEGF нами было проведена оценка баланса противо- и провоспалительных цитокинов с целью выявления компенсаторных механизмов на фоне системного провоспалительного ответа.

Нами выявлено изменение баланса про- и противовоспалительных цитокинов, отличающиеся в группах женщин с ПН без АФА и их наличием. У женщин с циркулирующими АФА происходит отчетливый сдвиг в сторону провоспалительных реакций, в то время как у женщин с ПН без АФА эти реакции компенсируются за счет противовоспалительных цитокинов. Об этом говорит анализ пар IL-10/IL-2; IL-10/IL-6; IL-10/IL-8; IL-4/IL-8; IL-13/IL-8.

Таким образом, важно определить не только изменения уровня конкретных цитокинов, а также и их соотношение у конкретных пациенток, что дает представление о процессах компенсации или декомпенсации различных патофизиологических механизмов, приводящих к невынашиванию беременности.

Нами также был получен статистически значимый результат и при оценке баланса Eotaxin/IP-10. Выявлен перевес в сторону Eotaxin в группе с АФА в сравнении с группой без АФА. Человеческий интерферон-индуцируемый белок-10 (IP-10 или CXCL10) представляет собой хемокин семейства СХС. Уникальной особенностью представителей этого семейства хемокинов является то, что они обладают провоспалительными свойствами и действуют как модуляторы ангиогенеза при таких состояниях, как заживление ран, ишемия и неоплазия [17]. В то же время важно отметить, что IP-10 обладает мощной антиангиогенной активностью *in vitro* и *in vivo*, ингибирует дозозависимым образом проангиогенные эффекты IL-8 и bFGF, включая хемотаксис эндотелиальных клеток и пролиферацию, а также неоваскуляризацию [17]. По данным Gotsch F. и соавторов у женщин с преэклампсией концентрация IP-10

была выше, чем в группе женщин с физиологической беременностью [17]. Увеличение уровня IP-10 было обнаружено на протяжении всего менструального цикла у здоровых небеременных женщин и в первом триместре беременности. По мере прогрессирования беременности активируются факторы, ограничивающие чрезмерную инвазию трофобласта и избыточную васкуляризацию, их активация приводит к подавлению хемокинов IP-10, MCP-1 и MIP-1 $\beta$  во время второго триместра. Сбой этого процесса может привести к аномалиям развития плаценты и потери беременности. Предполагают также, что развитие преэклампсии связано с неудачным подавлением продукции IP-10 [17, 38]. Таким образом, если рассматривать IP-10 как антиангиогенный фактор, а Eotaxin – как проангиогенный, можно сделать вывод о том, что в группе с АФА наиболее активно протекает неоангиогенез и ремоделирование сосудистой стенки, как компенсаторный механизм защиты на повреждение циркулирующими АФА, в том числе связанный с усилением миграционных процессов. При этом, однако, активация эндотелия в целом создает раннее формирование прокоагулянтного его фенотипа, что может привести к нарушению микроциркуляции, как одному из возможных патогенетических факторов невынашивания беременности.

## Заключение

Толерантность иммунной системы матери по отношению к полуаллогенному плоду и ингибирование цитотоксического иммунного ответа лежит в основе физиологического течения беременности [5]. На сегодняшний день не существует достоверных диагностических методов оценки иммунологических взаимоотношений между матерью и плодом, позволяющих с большой вероятностью прогнозировать развитие неблагоприятного течения беременности и еще меньше возможностей воздействовать на них терапевтически. Именно поэтому изучение иммунологических маркеров и патогенетических механизмов, связанных с прерыванием беременности и поздними акушерскими осложнениями, так важно и перспективно. В заключение следует отметить, что женщины с невынашиванием в анамнезе без АФА, так и с аутоантителами находятся в группе риска в связи с повышением провоспалительных цитокинов в периферической крови; женщины с АФА и с ПВ в анамнезе являются также угрожающей группой по развитию преэклампсии в связи с повышением VEGF, IL-6 и IL-8 в периферической крови; у женщин в группе с низким уровнем и высоким уровнем аутоантител содержание провоспалительных цитокинов в перифериче-

ской крови не различается. Это свидетельствует о том, что АФА независимо от уровня показателей вносят свой вклад в развитие патологического процесса; у женщин с АФА выявлено нарушение баланса про- и противовоспалительных цитокинов за счет снижения компенсаторного противовоспалительного ответа. Учитывая изменения профиля проангиогенных и антиангиогенных факторов, можно также предположить, что женщины с АФА и ПВ в анамнезе более подвержены развитию плацентарных нарушений, что также, возможно, требует более тщательного диагностического поиска и наблюдения за этой группой женщин для предотвращения неблагоприятных исходов как на ранних, так и на поздних сроках беременности. К сожалению, на сегодняшний день не зарегистрирован ни один препарат с доказанной эффективностью для компенсации патологических изменений в плаценте и лечения плацентарной недостаточности [1]. Задачей в будущем является выделение групп риска, пер-

сонификация терапии и определение наиболее подходящих профилактических мероприятий.

В заключение следует отметить, что определение иммунологических маркеров, характеризующих развитие воспалительных реакций, пролиферативных процессов и ангиогенез, позволяет уточнить различные патофизиологические пути реализации акушерской патологии, в частности невынашивания беременности. Вероятно, нет какого-то одного механизма и соответственно отвечающего за этот механизм параметра или даже группы факторов, связанной с невынашиванием. Наиболее перспективным в этом плане является поиск наиболее значимых сочетаний про- и противовоспалительных цитокинов, ростовых, в том числе ангиогенных факторов как с позитивной, так и с негативной регуляцией. Именно такой подход может иметь не только диагностическое и прогностическое значения, но и давать в руки врача инструменты для назначения патогенетической терапии.

## Список литературы / References

1. Недостаточный рост плода, требующий предоставления медицинской помощи матери (задержка роста плода): клинические рекомендации. М., 2022. 76 с. [Inadequate fetal growth that requires medical care for the mother (fetal growth restriction): Clinical recommendations]. Moscow, 2022. 76 p.
2. Павлов О.В., Сельков С.А. Плацентарные макрофаги. Морфофункциональные характеристики и роль в гестационном процессе. СПб.: Эко-Вектор, 2018. 223 с. [Pavlov O.V., Selkov S.A. Placental macrophages. Morphofunctional characteristics and role in the gestational process]. St. Petersburg: Eco-Vector, 2018. 223 p.
3. Преждевременные роды: клинические рекомендации. М., 2020. 66 с. [Premature birth: Clinical recommendations]. Moscow, 2020. 66 p.
4. Привычный выкидыш: клинические рекомендации. М., 2021. 56 с. [Miscarriage: Clinical recommendations]. Moscow, 2021. 56 p.
5. Соколов Д.И., Сельков С.А. Иммунологический контроль формирования сосудистой сети плаценты. СПб.: Н-Л, 2012. 206 с. [Sokolov D.I., Selkov S.A. Immunologic control of placental vascular network formation]. St. Petersburg: N-L, 2012. 206 p.
6. Adanacioglu F., Çetin Ç., Tokat G., Adanacioglu D., Gokmen Karasu A.F., Çetin M.T. Comparison of the effects of GM-CSF-containing and traditional culture media on embryo development and pregnancy success rates. *RBGO*, 2022, Vol. 44, no. 11, pp. 1047-1051.
7. Ahmad S., Hewett P.W., Al-Ani B., Sissaoui S., Fujisawa T., Cudmore M.J., Ahmed A. Autocrine activity of soluble Flt-1 controls endothelial cell function and angiogenesis. *Vasc. Cell*, 2011, Vol. 3, no. 1, 15. doi: 10.1186/2045-824X-3-15.
8. Alijotas-Reig J., Esteve-Valverde E., Anunciación-Llunell A., Marques-Soares J., Pardos-Gea J., Miró-Mur F. Pathogenesis, diagnosis and management of obstetric antiphospholipid syndrome: a comprehensive review. *J. Clin. Med.*, 2022, Vol. 11, no. 3, 675. doi: 10.3390/jcm11030675.
9. Bagnasco D., Ferrando M., Caminati M., Bragantini A., Puggioni F., Varricchi G., Passalacqua G., Canonica G.W. Targeting Interleukin-5 or Interleukin-5R $\alpha$ : Safety considerations. *Drug Saf.*, 2017, Vol. 40, no. 7, pp. 559-570.
10. Bardou M., Hadi T., Mace G., Pesant M., Debermont J., Barrichon M., Wendremaire M., Laurent N., Sagot P., Lirussi F. Systemic increase in human maternal circulating CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> MCP-1<sup>+</sup> monocytes as a marker of labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2014, Vol. 210, no. 1, pp. 70e1-70e9.
11. Barut F., Barut A., Gun B.D., Kandemir N.O., Harma M.I., Harma M., Aktunc E., Ozdamar S.O. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. *Diagn. Pathol.*, 2010, Vol. 5, 24. doi: 10.1186/1746-1596-5-24.
12. Bender Atik R., Christiansen O.B., Elson J., Kolte A.M., Lewis S., Middeldorp S., Mcheik S., Peramo B., Quenby S., Nielsen H.S., van der Hoorn M.-L., Vermeulen N., Goddijn M. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss: an update in 2022. *Hum. Reprod. Open*, 2023, Vol. 2023, no. 1, hoad002. doi: 10.1093/hropen/hoad002.
13. Carp H., Cytokines in recurrent miscarriage. *Lupus*, 2004, Vol. 13, no. 9, pp. 630-634.

14. Chaiworapongsa T., Romero R., Tolosa J.E., Yoshimatsu J., Espinoza J., Kim Y.M., Kim J.C., Bujold E., Kalache K., Edwin S. Elevated monocyte chemotactic protein-1 in amniotic fluid is a risk factor for pregnancy loss. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 2002, Vol. 12, no. 3, pp. 159-164.
15. Dougan M., Dranoff G., Dougan S.K. GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of cytokines: regulators of inflammation. *Immunity*, 2019, Vol. 50, no. 4, pp. 796-811.
16. Galazios G., Tsoulou S., Zografou C., Tripsianis G., Koutlaki N., Papazoglou D., Tsikouras P., Maltezos E., Liberis V. The role of cytokines IL-6 and IL-8 in the pathogenesis of spontaneous abortions. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 2011, Vol. 24, no. 10, pp. 1283-1285.
17. Gotsch F., Romero R., Friel L., Kusanovic J.P., Espinoza J., Erez O., Than N.G., Mittal P., Edwin S., Yoon B.H., Kim C.J., Mazaki-Tovi S., Chaiworapongsa T., Hassan S.S. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia? *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 2007, Vol. 20, no. 11, pp. 777-792.
18. Hamulyak E.N., Scheres L.J., Marijnen M.C., Goddijn M., Middeldorp S. Aspirin or heparin or both for improving pregnancy outcomes in women with persistent antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2020, Vol. 5, no. 5, CD012852. doi: 10.1002/14651858.CD012852.pub2.
19. Han C.S., Mulla M.J., Brosens J.J., Chamley L.W., Paidas M.J., Lockwood C.J., Abrahams V.M. Aspirin and heparin effect on basal and antiphospholipid antibody modulation of trophoblast function. *Obstet. Gynecol.* 2011, Vol. 118, no. 5, pp. 1021-1028.
20. Jonsson Y., Rubèr M., Matthiesen L., Berg G., Nieminen K., Sharma S., Ernerudh J., Ekerfelt C. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J. Reprod. Immunol.*, 2006, Vol. 70, no. 1-2, pp. 83-91.
21. Kraus T.A., Sperling R.S., Engel S.M., Lo Y., Kellerman L., Singh T., Loubeau M., Ge Y., Garrido J.L., Rodríguez-García M., Moran T.M. Peripheral blood cytokine profiling during pregnancy and post-partum periods. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 64, no. 6, pp. 411-426.
22. Ku C.W., Ong L.S., Goh J.P., Allen J., Low L.W., Zhou J., Tan T.C., Lee Y.H. Defects in protective cytokine profiles in spontaneous miscarriage in the first trimester. *Fertil. Steril. Sci.*, 2023, Vol. 4, no. 1, pp. 36-46.
23. Kwiatek M., Geca T., Kwasniewska A. Pro- and anti-inflammatory cytokines in the first trimester-comparison of missed miscarriage and normal pregnancy. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2021, Vol. 18, no. 16, 8538. doi: 10.3390/ijerph18168538.
24. Makhseed M., Raghupathy R., Azizieh F., Farhat R., Hassan N., Bandar A. Circulating cytokines and CD30 in normal human pregnancy and recurrent spontaneous abortions. *Hum. Reprod.*, 2000, Vol. 15, no. 9, pp. 2011-2017.
25. Mayoral Andrade G., Martínez G.V., Pérez-Campos Mayoral L., Hernández-Huerta M.T., Zenteno E., Pérez-Campos Mayoral E., Martínez Cruz M., Martínez Cruz R., Matias-Cervantes C.A., Meraz Cruz N., Díaz C.R., Cruz-Parada E., Pérez-Campos E. Molecules and prostaglandins related to embryo tolerance. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 555414. doi: 10.3389/fimmu.2020.555414.
26. Motedayyen H., Fathi F., Fasihi-Ramandi M., Sabzghabae A.M., Taheri R.A. Toll-like receptor 4 activation on human amniotic epithelial cells is a risk factor for pregnancy loss. *J. Res. Med. Sci.*, 2019, Vol. 24, 1. doi: 10.4103/jrms.JRMS\_463\_18.
27. Namli Kalem M., Akgun N., Kalem Z., Bakirarar B., Celik T. Chemokine (C-C motif) ligand-2 (CCL2) and oxidative stress markers in recurrent pregnancy loss and repeated implantation failure. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2017, Vol. 34, no. 11, pp. 1501-1506.
28. Negrini S., Pappalardo F., Murdaca G., Indiveri F., Puppo F. The antiphospholipid syndrome: from pathophysiology to treatment. *Clin. Exp. Med.*, 2017, Vol. 17, no. 3, pp. 257-267.
29. Ozkan S., Vural B., Filiz S., Coştur P., Dalçik H. Placental expression of insulin-like growth factor-I, fibroblast growth factor-basic, and neural cell adhesion molecule in preeclampsia. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 2008, Vol. 21, no. 11, pp. 831-838.
30. Pang X.L., Yin T.L., Yan W.J., Li J., He F., Yang J. Molecular detection of uterine innate lymphoid cells in the immunological mouse model of pregnancy loss. *Int. Immunopharmacol.*, 2019, Vol. 68, pp. 1-6.
31. Polari L., Kumar H., Rautava S., Salminen S., Isolauri E. Increase in serum Interleukin-10 does not alleviate pro-inflammatory MCP-1 production in obese pregnancies. *Cytokine*, 2018, Vol. 108, pp. 67-70.
32. Quao Z.C., Tong M., Bryce E., Guller S., Chamley L.W., Abrahams V.M. Low molecular weight heparin and aspirin exacerbate human endometrial endothelial cell responses to antiphospholipid antibodies. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2018, Vol. 79, no. 1, 10.1111/aji.12785. doi: 10.1111/aji.12785.
33. Raghupathy R., Makhseed M., Azizieh F., Omu A., Gupta M., Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum. Reprod.*, 2000, Vol. 15, no. 3, pp. 713-718.
34. Ren Y., Wang H., Qin H., Yang J., Wang Y., Jiang S., Pan Y. Vascular Endothelial Growth Factor expression in peripheral blood of patients with pregnancy induced hypertension syndrome and its clinical significance. *Pak. J. Med. Sci.*, 2014, Vol. 30, no. 3, pp. 634-637.

35. Salcedo R., Young H.A., Ponce M.L., Ward J.M., Kleinman H.K., Murphy W.J., Oppenheim J.J. Eotaxin (CCL11) induces in vivo angiogenic responses by human CCR3<sup>+</sup> endothelial cells. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 12, pp. 7571-7578.
36. Schreiber K., Radin M., Sciascia S. Current insights in obstetric antiphospholipid syndrome. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, Vol. 29, no. 6, pp. 397-403.
37. Sugimoto M., Kondo M., Kamimoto Y., Ikeda T., Cutler A., Mariya A., Anand-Apte B. Changes in VEGF-related factors are associated with presence of inflammatory factors in carbohydrate metabolism disorders during pregnancy. *PLoS One*, 2019, Vol. 14, no. 8, e0220650. doi: 10.1371/journal.pone.0220650.
38. Tagoma A., Haller-Kikkatalo K., Roos K., Oras A., Kirss A., Ilonen J., Uibo R. Interleukin-7, T helper 1, and regulatory T-cell activity-related cytokines are increased during the second trimester of healthy pregnancy compared to non-pregnant women. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2019, Vol. 82, no. 6, e13188. doi: 10.1111/aji.13188.
39. Tong M., Abrahams V.M. Immunology of the Placenta. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, 2020, Vol. 47, no. 1, pp. 49-63.
40. Toth B., Haufe T., Scholz C., Kuhn C., Friese K., Karamouti M., Makrigrannakis A., Jeschke U. Placental interleukin-15 expression in recurrent miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 64, no. 6, pp. 402-410.
41. Varla-Leftherioti M., Keramitsoglou T., Tsekoura C. The immunobiology of recurrent miscarriage. In: *Recurrent Pregnancy Loss*. 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press, 2020. pp. 89-98.
42. Viall C.A., Chamley L.W. Histopathology in the placentae of women with antiphospholipid antibodies: A systematic review of the literature. *Autoimm. Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 5, pp. 446-471.
43. Wagner M.M., Jukema J.W., Hermes W., Cessie S., Groot C.J.M., Bakker J.A., Lith J.M.M., Bloemenkamp K.W.M. Assessment of novel cardiovascular biomarkers in women with a history of recurrent miscarriage. *Pregnancy Hypertens.*, 2018, Vol. 11, pp. 129-135.
44. Wang W., Sung N, Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J. T helper (Th) cell profiles in pregnancy and recurrent pregnancy losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 2025. doi: 10.3389/fimmu.2020.02025.
45. Wang Y., Shi D., Chen L. Lipid profile and cytokines in hypertension of pregnancy: A comparison of preeclampsia therapies. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 394-399.
46. Wegmann T.G., Lin H., Guilbert L., Mosmann T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol. Today*, 1993, Vol. 14, no. 7, pp. 353-356.
47. Yang R., Zhang J., Zhang L., Liu Y., Guo Q. Combined detection of anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein 1 antibodies may predict pregnancy outcome. *Am. J. Transl. Res.*, 2022, Vol. 14, no. 3, pp. 1750-1756.
48. Yang X., Su S., Ren Q., Liu L., Li J., Zhang W., Cai K., Xu Z., Pan X.. BushenHuoxue recipe for the treatment of prethrombotic state of ACA-positive recurrent miscarriage via the regulation of the PI3K-AKT signaling pathway. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2022, Vol. 2022, 2385534. doi: 10.1155/2022/2385534.
49. Yang X., Tian Y., Zheng L., Luu T., Kwak-Kim J. The update immune-regulatory role of pro- and anti-inflammatory cytokines in recurrent pregnancy losses. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 1, 132. doi: 10.3390/ijms24010132.
50. Yockey L.J., Iwasaki A. Interferons and proinflammatory cytokines in pregnancy and fetal development. *Immunity*, 2018, Vol. 49, no. 3, pp. 397-412.
51. Zeisler H., Llubra E., Chantraine F., Vatish M., Staff A.C., Sennström M., Olovsson M., Brennecke S.P., Stepan H., Allegranza D., Dilba P., Schoedl M., Hund M., Verlohren S. Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N. Engl. J. Med.*, 2016, Vol. 374, no. 1, pp. 13-22.

**Авторы:**

**Чепанов С.В.** — к.м.н., старший научный сотрудник группы протеомной иммунорегуляции отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Сиротская А.А.** — студент ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Соколов Д.И.** — д.б.н., доцент, заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Authors:**

**Chepanov S.V.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Proteom Immunoregulation Group, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Sirotskaya A.A.**, Student, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Sokolov D.I.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Laboratory of Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Беспалова О.Н.** — д.м.н., заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Бабак В.Н.** — к.б.н., заведующий лабораторией молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»

Федерального медико-биологического агентства России, г. п. Кузьмоловский, г. п. Кузьмоловское, мкр-н Всеволожский, Ленинградская обл., Россия

**Роговская Н.Ю.** — научный сотрудник лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»

Федерального медико-биологического агентства России, г. п. Кузьмоловский, г. п. Кузьмоловское, мкр-н Всеволожский, Ленинградская обл., Россия

**Орлова Е.С.** — врач — акушер-гинеколог, заведующая акушерским физиологическим отделением ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Сельков С.А.** — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Bespalova O.N.,** PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Research, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Babakov V.N.,** PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Toxicology and Experimental Therapy, Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Kuzmolovsky settlement, Kuzmolovskoye settlement, Vsevolozhsky microdistrict, Leningrad Region, Russian Federation

**Rogovskaya N.Yu.,** Researcher, Laboratory of Molecular Toxicology and Experimental Therapy, Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Kuzmolovsky settlement, Kuzmolovskoye settlement, Vsevolozhsky microdistrict, Leningrad Region, Russian Federation

**Orlova E.S.,** Obstetrician-Gynecologist, Head, Obstetric Physiology Department, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Selkov S.A.,** PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 11.09.2023  
Принята к печати 09.03.2024

Received 11.09.2023  
Accepted 09.03.2024

## ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ ВЛАГАЛИЩА ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА

Рахматуллаева М.М.

Бухарский государственный медицинский институт имени Абу Али ибн Сина Министерства здравоохранения  
Республики Узбекистан, г. Бухара, Республика Узбекистан

**Резюме.** Бактериальный вагиноз представляет собой серьезную проблему для общественного здравоохранения в связи с повышенным риском заражения инфекциями, передающимися половым путем, и развитием ряда акушерско-гинекологических патологий. Локальная продукция цитокинов и антимикробных пептидов во влагалище играет важную роль в регуляции иммунитета в половых путях. Целью исследования стала сравнительная оценка микрофлоры и факторов неспецифической защиты влагалищной среды у женщин с бактериальным вагинозом до и после лечения. Объектом исследования явились 110 пациенток с бактериальным вагинозом (основная группа) и 26 условно-здоровых женщин с нормоценозом влагалища (контрольная группа). Проведено определение критериев Амсея, исследование микробиоценоза влагалища молекулярно-биологическим методом с использованием тест-системы Фемофлор-16, изучение содержания цитокинов IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL-10 и белков острой фазы С-реактивного белка, С3-компонента комплемента и лактоферрина в отделяемом влагалища методом твердофазного иммуноферментного анализа. Для статистического анализа применены методы вариационной параметрической и непараметрической статистики. Статистически значимыми приняты показатели при уровне достоверности  $p < 0,05$ . В результате исследования установлено, что бактериальный вагиноз сопровождается повышением уровня цитокинов IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  и IL-10 в 5,6; 5,5; 6,8; 4,1 раза и С-реактивного белка в более 10 раз и снижением С3-компонента комплемента и лактоферрина в 2,2 и 1,4 раза соответственно в отделяемом влагалища ( $p < 0,001$ ). После лечения в группах с исходным доминированием во влагалище облигатных анаэробов чаще отмечается повторный рост *Sneathia* spp./ *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp., *Atopobium vaginae* и *Mycoplasma hominis* с повышением уровня IL-6, TNF $\alpha$  и IL-10, что происходит на фоне низкого содержания С3-компонента комплемента и лактоферрина. Таким образом, сохранение низкого уровня С3-компонента комплемента и лактоферрина в динамике после лечения может служить маркером рецидивирующего течения бактериального вагиноза.

**Ключевые слова:** бактериальный вагиноз, микробиоценоз влагалища, облигатные анаэробы, цитокины, С-реактивный белок, С3-компонент комплемента, лактоферрин

### Адрес для переписки:

Рахматуллаева Махфуза Мубиновна  
Бухарский государственный медицинский институт  
имени Абу Али ибн Сина Министерства  
здравоохранения Республики Узбекистан  
200126, Республика Узбекистан, г. Бухара,  
ул. Гиждуван, 23.  
Тел.: +998906350906.  
E-mail: makhgiz@inbox.ru

### Address for correspondence:

Mahfuza M. Rakhmatullayeva  
Abu Ali ibn Sina Bukhara State Medical Institute  
23 Gijduvan St  
Bukhara  
200126 Republic of Uzbekistan  
Phone: +998906350906.  
E-mail: makhgiz@inbox.ru

### Образец цитирования:

М.М. Рахматуллаева «Показатели неспецифической  
иммунной защиты влагалища до и после лечения  
бактериального вагиноза» // Медицинская  
иммунология, 2025. Т. 27, № 4. С. 823-830.  
doi: 10.15789/1563-0625-ION-3162

© Рахматуллаева М.М., 2025

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

M.M. Rakhmatullaeva "Indexes of nonspecific immune  
protection of the vagina before and after treatment of bacterial  
vaginosis", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 4, pp. 823-830.  
doi: 10.15789/1563-0625-ION-3162

© Rakhmatullaeva M.M., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-ION-3162

# INDEXES OF NONSPECIFIC IMMUNE PROTECTION OF THE VAGINA BEFORE AND AFTER TREATMENT OF BACTERIAL VAGINOSIS

Rakhmatullaeva M.M.

Abu Ali ibn Sina Bukhara State Medical Institute, Bukhara, Republic of Uzbekistan

**Abstract.** Bacterial vaginosis is a serious public health problem due to the increased risk of sexually transmitted infections and development of various obstetric and gynecological disorders. The local production of cytokines and antimicrobial peptides in the vagina plays an important role in regulation of genital tract immunity. The aim of the present study was to compare microflora and factors of nonspecific protection in vaginal environment in women with bacterial vaginosis before and after treatment. Our study included 110 patients with bacterial vaginosis (main group) and 26 conditionally healthy women with vaginal normocenosis (control group). The Amsel clinical criteria were determined, the vaginal microbiocenosis was studied using a molecular biology method using the Femoflor-16 test system. The contents of IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL-10 cytokines and acute phase proteins of C-reactive protein, C3-complement component and lactoferrin in vaginal secretions were studied by ELISA test systems. Methods of variation parametric and nonparametric statistics were used for statistical analysis. Statistically significant differences were taken at a confidence level of  $p < 0.05$ . Bacterial vaginosis was found to be accompanied by increased levels of IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  and IL-10 (by 5.6, 5.5, 6.8, 4.1 times, respectively), and C-reactive protein by  $> 10$  times, along with decrease in the C3 component of complement, and lactoferrin by 2.2 and 1.4 times, respectively, in the vaginal discharge ( $p < 0.001$ ). After treatment of vaginosis, the patient groups with initial local dominance of obligate anaerobes (*Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp., *Atopobium vaginae* and *Mycoplasma hominis*) exhibited increased levels of IL-6, TNF $\alpha$  and IL-10, along with low content of the C3 component of complement and lactoferrin. Thus, post-treatment preservation of low C3 component and lactoferrin levels may serve as a marker of recurrent bacterial vaginosis.

**Keywords:** bacterial vaginosis, vaginal microbiocenosis, obligate anaerobes, cytokines, C-reactive protein, C3 complement component, lactoferrin

## Введение

Микробиоценоз влагалища является сложной интегральной биосистемой, которая путем создания колонизационной резистентности поддерживает не только защитную среду слизистых половых путей, но и играет важную роль в создании благоприятного иммуно-гормонального фона организма женщины. Огромное число исследований свидетельствуют в пользу того, что нарушение нормального состава микрофлоры влагалища повышает риск заражения инфекциями, передающимися половым путем [28, 30], способствует развитию воспалительных [14] и ряда пролиферативных заболеваний органов малого таза [18, 27] и гениталий [30], приводит к неблагоприятным исходам беременности [3, 25], родов [8, 17] и послеродового периода [22].

У клинически здоровых женщин в репродуктивном возрасте доминирующими бактериями влагалищной среды являются лактобактерии, которые составляют 95-98% всей микрофлоры [1]. Стабильность влагалищного микробиоценоза

обеспечивается способностью лактобактерий к образованию молочной кислоты и перекиси водорода, лизоцима и других гликолитических ферментов, бактериоцинов [4]. При бактериальном вагинозе происходит уменьшение количества лактобактерий, в результате которого повышается рН влагалищной жидкости и создаются условия для роста условно-патогенных бактерий. Наиболее распространенными микроорганизмами, ассоциированными с бактериальным вагинозом, являются *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Sneathia* spp., *Leptotrichia* spp., *Atopobium vaginae*, а также некоторые другие представители анаэробных микроорганизмов [19, 26].

Актуальность проблемы бактериального вагиноза обусловлена также широким распространением этого заболевания. По данным различных авторов, около 30% случаев патологических выделений из половых путей у женщин связаны с бактериальным вагинозом [6, 24]. При различных методах лечения более 50% женщин за полгода после лечения отмечают рецидивы заболевания [9], что приводит к ухудшению качества

жизни [7] и представляет собой большую медико-социальную проблему [24].

В последние годы уделяется все большее внимание роли иммунного ответа организма в развитии бактериального вагиноза и его рецидивирующем течении.

**Цель исследования** – провести сравнительную оценку микрофлоры и факторов неспецифической защиты влагалищной среды у женщин с бактериальным вагинозом до и после лечения.

## Материалы и методы

В основную группу включены 110 женщин с клинико-микроскопическим подтверждением диагноза «бактериальный вагиноз». Контрольную группу составили 26 практически здоровых женщин с нормоценозом влагалища. Изучены анамнестические данные, общий соматический и гинекологический статус обследуемых женщин. Клинико-микроскопические данные, подтверждающие бактериальный вагиноз включали определение критериев Амсея (наличие обильных выделений со специфическим «рыбным» запахом, повышение pH вагинальных выделений, положительный аминный тест (проба с гидроксидом калия) и присутствие «ключевых» клеток (эпителиальных клеток, стенка которых сплошь адгезирована грамвариабельной микрофлорой) в мазках). Микробиоценоз влагалища исследован молекулярно-биологическим методом с использованием Фемофлор-16. Концентрации IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IL-10, С-реактивного белка, С3-компонента комплемента и лактоферрина в отделяемом влагалища определены методом твердофазного иммуоферментного анализа с использованием соответствующих тест-наборов (АО «Вектор-Бест», Россия).

Применена двухэтапная терапия бактериального вагиноза: 1-й этап – клиндамицин (клиндамициновый крем 2%-ный, аппликации, 0,1 г клиндамицина) 7 дней и 2-й этап – пробиотики 10 дней. Проведена повторная оценка микробиоценоза и факторов неспецифической защиты влагалища через 3 месяца после лечения.

Полученные данные статистически обработаны на персональном компьютере с использованием программы Statistica 10.0, статистического программного приложения EpiInfo 7.2.2.2. Используются методы вариационной параметрической и непараметрической статистики с расчетом средней арифметической изучаемого показателя (M), среднего квадратического отклонения ( $\sigma$ ), стандартной ошибки среднего (m), относительных величин (частота, %). Значимость полученных показаний определена по критерию Стьюдента (t) с вычислением вероятности ошибки (p) при проверке нормальности распределения

(по критерию эксцесса) и равенства генеральных дисперсий (F-критерий Фишера). Значимыми приняты показатели с уровнем достоверности  $p < 0,05$ .

## Результаты

Средний возраст женщин основной группы составил  $35,5 \pm 0,68$  лет, контрольной группы –  $32,6 \pm 1,01$  ( $p > 0,05$ ). У каждой третьей больной с бактериальным вагинозом (35,4% против 7,7% в контрольной) репродуктивный анамнез был отягощен самопроизвольным выкидышем ( $p < 0,05$ ). Частота заболеваний органов мочевыделительной системы (20,9% против 3,8%), неспецифического кольпита в анамнезе (48,2% против 15,4%) и индекса массы тела (ИМТ) более 25 (69,1% против 30,8%) была достоверно выше в основной группе ( $p < 0,05$ ).

Жалобы на обильные, жидкие выделения серо-белого цвета с неприятным запахом отмечены в 83,6%, положительный аминный тест – в 81,8%, наличие «ключевых клеток» – в 90,0%, массивная микробная обсеменность – в 60,0% случаев в основной группе. pH влагалищных выделений составил  $6,18 \pm 0,03$  в основной и  $4,15 \pm 0,06$  в контрольной группах ( $p < 0,001$ ). Микробиоценоз влагалища пациенток с бактериальным вагинозом соответствовал выраженному анаэробному (70,9%) и выраженному аэробно-анаэробному дисбиозам (29,1%), контрольной группы – абсолютному (26,7%) и условному нормоценозам (73,3%). Абсолютное содержание лактофлоры в мазках пациенток основной группы было на несколько порядков ниже контрольных значений ( $3,92 \pm 0,22$  lg ГЭ/мл против  $7,21 \pm 0,24$  lg ГЭ/мл) ( $p < 0,001$ ). Отмечено достоверно высокое содержание факультативных анаэробов *Gardnerella vaginalis* / *Prevotella bivia* / *Porphyromonas* spp. ( $p < 0,001$ ) и облигатных анаэробов – *Eubacterium* spp. ( $p < 0,05$ ), *Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp. ( $p < 0,001$ ), *Lachnobacterium* spp. / *Clostridium* spp. ( $p = 0,013$ ), *Mobiluncus* spp. / *Corynebacterium* spp. ( $p = 0,004$ ), *Peptostreptococcus* spp. и *Atopobium vaginae* ( $p < 0,001$ ) у пациенток с бактериальным вагинозом.

Уровни IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  и IL-10 во влагалищном отделяемом женщин с бактериальным вагинозом составили  $186,00 \pm 12,01$ ,  $144,73 \pm 7,22$ ,  $171,5 \pm 10,6$  и  $92,87 \pm 5,68$  пг/мл, что достоверно в 5,6, 5,5, 6,8 и 4,1 раза выше аналогичных контрольных показателей ( $33,01 \pm 6,7$ ,  $26,16 \pm 9,48$ ,  $25,3 \pm 1,0$  и  $22,72 \pm 3,29$  пг/мл) ( $p < 0,001$ ). Содержание С-реактивного белка характеризовалось резким повышением в более 10 раз ( $51,56 \pm 6,97$  мг/л против  $3,83 \pm 0,88$  мг/л контроля) ( $p < 0,001$ ). Ло-

кальные уровни СЗ-компонента и лактоферрина были достоверно ниже контрольных показателей (в 2,2 раза –  $31,21 \pm 2,61$  нг/мл против  $68,88 \pm 7,05$  нг/мл и в 1,4 раза –  $523,97 \pm 45,21$  нг/мл против  $737,00 \pm 28,33$  нг/мл) соответственно ( $p < 0,001$ ).

Согласно кластерному распределению мазков с выраженным анаэробным дисбиозом влагалища (Назарова В.В и др., 2017) [2], пациентки с преобладающим содержанием в мазках анаэробов *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* были включены в 1-ю группу ( $n = 36$ ), с доминирующим содержанием групп облигатных анаэробов *Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp. и *Lachnobacterium* spp. / *Clostridium* spp. – во 2-ю группу ( $n = 33$ ). 3-ю группу ( $n = 31$ ) составили пациентки с выраженным аэробно-анаэробным (смешанным) дисбиозом. Такое деление на группы мы посчитали важным для дифференцированного изучения характера восстановления микрофлоры и местного иммунного ответа после лечения.

При контрольном визите через месяц после лечения жалобы, клинико-лабораторные признаки бактериального вагиноза не выявлены, однако через 3 месяца после лечения они отмече-

ны в нескольких случаях. Жалобы на выделения из влагалища с неприятным запахом отмечены у 14,3%, 17,5% и 21,9%,  $pH \geq 5,5$  – у 18,5%, 27,5%, 28,1%, положительный аминный тест – у 7,9%, 12,5% 21,9% пациенток 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно. «Ключевые клетки» присутствовали в 5,3%, 15,0% и 18,7% мазках пациенток 1-й, 2-й и 3-й групп соответственно. Выявлены случаи выраженного анаэробного (2 (5,3%) – в 1А и 4 (10,0%) – в 1В группах) и аэробно-анаэробного (6 (18,7%) – в 1С группе) дисбиоза, что клинически соответствовало рецидиву БВ. Умеренный анаэробный дисбиоз зафиксирован в 34,2% случаев в 1-й, в 30,0% – во 2-й и умеренный аэробно-анаэробный дисбиоз в 25,0% случаев в 3-й группе. В более половине случаев образцы мазков во всех группах соответствовали нормоценозу.

Содержание *Lactobacillus* spp. ( $p = 0,038$ ) было ниже в 3-й группе по сравнению с 1-й группой (табл. 1). Содержание *Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp. ( $p = 0,027$ ), *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp. ( $p = 0,047$ ) и *Mycoplasma hominis* ( $p = 0,029$ ) было существенно выше в 3-й группе по сравнению со 2-й группой, а *Atopobium vaginae* – выше во 2-й

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ ВЛАГАЛИЩА В ГРУППАХ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 1. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE COMPOSITION OF THE VAGINAL MICROFLORA IN THE GROUPS AFTER TREATMENT

Группа микроорганизмов, lg ГЭ/мл Group of microorganisms, lg GE/mL	1-я группа 1 <sup>st</sup> group	2-я группа 2 <sup>nd</sup> group	3-я группа 3 <sup>rd</sup> group	p
	1	2	3	
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,18±0,12	7,01±0,18	6,79±0,14	$p_{1-3} = 0,038$
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Prevotella bivia</i> / <i>Porphyromonas</i> spp.	2,46±0,37	3,17±0,33	3,27±0,38	
<i>Eubacterium</i> spp.	2,28±0,30	2,10±0,35	2,46±0,32	
<i>Sneathia</i> spp. / <i>Leptotrichia</i> spp. / <i>Fusobacterium</i> spp.	0,79±0,23	0,43±0,17	1,17±0,28	$p_{2-3} = 0,027$
<i>Megasphaera</i> spp. / <i>Veillonella</i> spp. / <i>Dialister</i> spp.	1,36±0,24	1,04±0,27	1,87±0,31	$p_{2-3} = 0,047$
<i>Lachnobacterium</i> spp. / <i>Clostridium</i> spp.	0,62±0,23	0,25±0,14	0,79±0,26	
<i>Mobiluncus</i> spp. / <i>Corynebacterium</i> spp.	1,12±0,27	1,39±0,27	1,47±0,29	
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	1,37±0,37	1,85±0,29	1,98±0,28	
<i>Atopobium vaginae</i>	1,02±0,26	1,68±0,19	1,89±0,33	$p_{1-2} = 0,044$ $p_{2-3} = 0,042$
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	0,42±0,21	0,25±0,14	0,74±0,29	
<i>Streptococcus</i> spp.	0,62±0,22	0,48±0,18	0,99±0,29	
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,74±0,21	0,89±0,25	1,31±0,23	
<i>Candida</i> spp.	1,05±0,25	1,22±0,25	1,62±0,31	
<i>Mycoplasma hominis</i>	0,73±0,23	0,43±0,12	0,91±0,18	$p_{2-3} = 0,029$
<i>Ureaplasma</i> spp.	2,12±0,65	1,89±0,34	2,38±0,34	

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ ЧЕРЕЗ 3 МЕСЯЦА ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 2. CYTOKINE LEVELS 3 MONTHS AFTER TREATMENT

Показатель, пг/мл Indicator, pg/mL	1-я группа 1 <sup>st</sup> group	2-я группа 2 <sup>nd</sup> group	3-я группа 3 <sup>rd</sup> group	Контроль Control	P <sub>1-4</sub> ; P <sub>2-4</sub> ; P <sub>3-4</sub>
	1	2	3	4	
IL-6	37,93±8,13	60,79±11,35	58,28±10,12	33,01±6,70	0,643; 0,043; 0,046
IL-8	26,14±5,98	41,89±9,82	49,13±13,78	23,16±9,48	0,792; 0,179; 0,131
TNFα	27,8±3,1	44,57±8,69	38,16±12,68	25,3±1,0	0,448; 0,035; 0,320
IL-10	29,44±5,23	42,71±9,78	37,39±6,33	22,72±3,29	0,285; 0,061; 0,048

ТАБЛИЦА 3. УРОВЕНЬ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ ЧЕРЕЗ 3 МЕСЯЦА ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 3. ACUTE PHASE PROTEIN LEVELS 3 MONTHS AFTER TREATMENT

Показатель Indicator	1-я группа 1 <sup>st</sup> group	2-я группа 2 <sup>nd</sup> group	3-я группа 3 <sup>rd</sup> group	Контроль Control	P <sub>1-4</sub> ; P <sub>2-4</sub> ; P <sub>3-4</sub>
	1	2	3	4	
С-реактивный белок, мг/л C-reactive protein, mg/L	4,74±3,66	17,59±6,49	11,15±3,13	3,83±0,88	0,809; 0,043; 0,031
С3-компонент комплемента, нг/мл C3-complement component, ng/mL	63,55±4,28	44,87±9,68	50,38±8,35	68,88±2,61	0,372; 0,022; 0,043
Лактоферрин, нг/мл Lactoferrin, ng/mL	725,2±29,7	636,1±71,4	619,7±46,4	737,0±28,3	0,776; 0,199; 0,035

( $p = 0,044$ ) и 3-й ( $p = 0,042$ ) группах по сравнению с 1-й группой.

Отмечена нормализация уровня изучаемых цитокинов в 1-й группе через 3 месяца после лечения. Уровни IL-6 и TNFα во 2-й группе, IL-6 и IL-10 в 3-й группе снизились без достижения целевых значений (табл. 2).

Содержание С-реактивного белка во 2-й и 3-й группах было достоверно выше контрольных показателей ( $p < 0,05$ ). Концентрация С3-компонента комплемента была низкой во 2-й и 3-й группах, а лактоферрина – в 3-й группе ( $p < 0,05$ ) (табл. 3).

## Обсуждение

Бактериальный вагиноз является полимикробным синдромом, и считается, что каждая бактериальная составляющая микробиоценоза влагалища вносит свой вклад в патогенез и развитие клинических симптомов заболевания [19]. Согласно гипотетической модели патогенеза бактериального вагиноза нарушение микробиоценоза влагалища прежде всего проявляется из-

быточным ростом *Gardnerella vaginalis* и *Prevotella bivia* [21]. Образование совместной биопленки *Gardnerella vaginalis* и *Prevotella bivia* не вызывает ответную иммунную реакцию эпителиально-макрофагальными клетками [13]. Благодаря этой возможности *Prevotella* spp. и *Gardnerella vaginalis* могут успешно адгезироваться на эпителиальные клетки и проявлять патогенные свойства. Далее происходит присоединение к первичной биопленке *Atopobium vaginae* и облигатных анаэробов с формированием зрелой полимикробной биопленки, что вызывает проявление резкой иммунной реакции [15]. По данным Anahtar M.N. и соавт. (2015), бактериальные сообщества с высоким разнообразием сильно коррелируют с концентрациями провоспалительных цитокинов в репродуктивном тракте как в поперечном, так и в продольном анализе [5]. Различные виды и группы микроорганизмов могут быть связаны с разными иммунными медиаторами. В экспериментальной работе Doerflinger S.Y. и соавт. (2014) *Atopobium vaginae* вызывала значительное усиление передачи сигналов образ-распознаю-

щих рецепторов, экспрессии муцина и сильный провоспалительный иммунный ответ (экспрессию  $\beta$ -дефензина 2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$ ) в трехмерных вагинальных эпителиальных клетках по сравнению с *Prevotella bivia* и *Lactobacillus iners* [12].

Еще одно оригинальное исследование подтверждает то, что *Atopobium vaginae* проявляет самые высокие провоспалительные свойства и индуцирует множество провоспалительных цитокинов и хемокинов. Инфекция *Sneathia amnii* также приводит к секреции нескольких ключевых иммунных медиаторов (IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ) [15]. Напротив, *Gardnerella vaginalis* и *Prevotella bivia* не вызывали сильных воспалительных реакций, что согласуется с концептуальной моделью бактериального вагиноза, предложенной Muzny С.А. и соавт. (2020) [21]. *Gardnerella vaginalis* значительно увеличивала уровни только двух цитокинов, IL-6 и TNF $\alpha$ , тогда как *Prevotella bivia* индуцировала только один цитокин, IL-1 $\alpha$  [15]. Более высокие уровни IFN $\gamma$  и IL-1 $\beta$  в вагинальной среде были выявлены у женщин с высоким разнообразием представителей микробиоты с присутствием *Prevotella* spp. [5].

Как видно, клинические данные о цитокинах и хемокинах в вагинальных выделениях женщин с бактериальным вагинозом противоречивы. Расхождения в иммунных маркерах могут быть результатом микробного разнообразия, а изменения в составе микрофлоры влагалища влияют на иммунные реакции организма [10].

Как известно, активация Th1-ответа при инфекции направлена на ограничение инфекционного процесса с последующим восстановлением состава нормофлоры влагалища. Повышение Th1-уровня запускает противоположное противовоспалительное активирование Th2-лимфоцитов. [10]. Повышение уровня С-реактивного белка наступает через короткое время после пикового повышения уровня провоспалительных цитокинов, в особенности IL-6 и TNF $\alpha$ . С-реактивный белок активирует систему комплемента и угнетает фагоцитоз нейтрофилов. С другой стороны, связываясь с рецепторами на макрофагах, С-реактивный белок вызывает выработку не только провоспалительных, но и в большей степени противовоспалительных цитокинов, которые способны подавлять активность клеток Th1 [20].

Система комплемента отвечает за фагоцитоз, разрушение чужеродных бактерий и поддерживает различные воспалительные реакции [23]. Фиксация С3-компонента комплемента на клеточной стенке бактерий (опсонизация) приводит к усилению фагоцитоза [11]. Очевидно, нарастание титра С-реактивного белка при дисбиозе вла-

галища вызвано активацией провоспалительного цитокинового профиля и направлено на инициацию иммунных эффекторных механизмов. Несмотря на это, мы определили недостаточное напряжение системы комплемента при бактериальном вагинозе. Снижение уровня лактоферрина в вагинальном секрете женщин с бактериальным вагинозом можно расценить как фактор снижения бактерицидной функции нормофлоры влагалища, поскольку именно в кислых средах условиях лактоферрин отделяет ионы железа, которые участвуют в образовании активных форм кислорода, токсичных для микроорганизмов [29]. Регуляторное действие лактоферрина на иммунный ответ проявляется созревaniem Т- и В-лимфоцитов, продукцией иммуноглобулинов, регуляцией активности натуральных киллеров, гранулоцитов, моноцитов, макрофагов и других иммунокомпетентных клеток, а также влиянием на образование цитокинов, металлопротеиназ и других медиаторов воспаления [16]. Все это располагает к тому, что в развитии дисбиоза важную роль играет нарушение взаимодействия компонентов врожденного иммунного ответа.

Оценивая динамику изменения уровня цитокинов влагалищной среды, следует указать, что во 2-й и 3-й группах отмечается повышение уровней про- и противовоспалительных цитокинов относительно контрольных показателей, что вызвано активацией условно-патогенной микрофлоры. Выявлены достоверные отличия в содержании С3-компонента комплемента во 2-й и 3-й группах, лактоферрина в 3-й группе, что отражает в определенной мере некоторую недостаточность местной иммунной защиты.

Таким образом, после лечения бактериального вагиноза в группах с исходным доминированием в составе микрофлоры влагалища облигатных анаэробов часто проявляется нарушение тонкого баланса Th1/Th2-ответа, что происходит на фоне недостаточной активности С3-компонента комплемента и лактоферрина. Именно такое состояние сочетается с клиническими рецидивами заболевания.

## Заключение

Рост условно-патогенной (в основном, облигатно-анаэробной) микрофлоры влагалища при бактериальном вагинозе сопровождается повышением уровня про- и противовоспалительных цитокинов и С-реактивного белка в вагинальной среде. Сохранение низкого уровня С3-компонента комплемента и лактоферрина в динамике после лечения у женщин с исходным доминированием в составе микрофлоры облигатных анаэробов может служить маркером рецидивирующего течения бактериального вагиноза.

## Список литературы / References

1. Будилова О.В., Шипицына Е.В., Герасимова Е.Н., Сафронова М.М., Савичева А.М. Видовое разнообразие вагинальных лактобацилл в норме и при дисбиотических состояниях // Журнал акушерства и женских болезней, 2017. Т. 66, № 2. С. 24-32. [Budilovskaya O.V., Shipitsyna E.V., Gerasimova E.N., Safronova M.M., Savicheva A.M. Species diversity of vaginal lactobacilli in norm and in dysbiotic states. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2017, Vol. 66, no. 2, pp. 24-32. (In Russ.)]
2. Назарова В.В., Шипицына Е.В., Герасимова Е.Н., Савичева А.М. Критерии диагностики бактериального вагиноза с использованием теста Фемофлор-16 // Журнал акушерства и женских болезней, 2017. Т. 66, № 4. С. 57-67. [Nazarova V.V., Shipitsyna E.V., Gerasimova E.N., Savicheva A.M. Criteria for diagnosis of bacterial vaginosis using the test Femoflor-16. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2017, Vol. 66, no. 4, pp. 57-67. (In Russ.)]
3. Синякова А.А., Шипицына Е.В., Будилова О.В., Болотских В.М., Савичева А.М. Клинико-анамнестические и микробиологические предикторы невынашивания беременности // Журнал акушерства и женских болезней, 2019. Т. 68, № 2. С. 59-70. [Sinyakova A.A., Shipitsyna E.V., Budilovskaya O.V., Bolotskikh V.M., Savicheva A.M. Anamnestic and microbiological predictors of miscarriage. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women's Diseases*, 2019, Vol. 68, no. 2, pp. 59-70. (In Russ.)]
4. Amabebe E., Anumba D.O.C. The vaginal microenvironment: the physiologic role of lactobacilli. *Front. Med. (Lausanne)*, 2018, Vol. 5, 181. doi: 10.3389/fmed.2018.00181.
5. Anahtar M.N., Byrne E.H., Doherty K.E., Bowman B.A., Yamamoto H.S., Soumillon M., Padavattan N., Ismail N., Moodley A., Sabatini M.E., Ghebremichael M.S., Nusbaum C., Huttenhower C., Virgin H.W., Ndung'u T., Dong K.L., Walker B.D., Fichorova R.N., Kwon D.S. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity*, 2015, Vol. 42, no. 5, pp. 965-976. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.019.
6. Bautista C.T., Wurapa E., Sateren W.B., Morris S., Hollingsworth B., Sanchez J.L. Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. *Mil. Med. Res.*, 2016, Vol. 3, 4. doi: 10.1186/s40779-016-0074-5.
7. Bilardi J.E., Walker S., Temple-Smith M., McNair R., Mooney-Somers J., Bellhouse C., Fairley C.K., Chen M.Y., Bradshaw C. The burden of bacterial vaginosis: women's experience of the physical, emotional, sexual and social impact of living with recurrent bacterial vaginosis. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 9, e74378. doi: 10.1371/journal.pone.0074378.
8. Brown R.G., Al-Memar M., Marchesi J.R., Lee Y.S., Smith A., Chan D., Lewis H., Kindinger L., Terzidou V., Bourne T., Bennett P.R., MacIntyre D.A. Establishment of vaginal microbiota composition in early pregnancy and its association with subsequent preterm prelabor rupture of the fetal membranes. *Transl. Res.*, 2019, Vol. 207, pp. 30-43. doi: 10.1016/j.trsl.2018.12.005.
9. Bradshaw C.S., Sobel J.D. Current treatment of bacterial vaginosis-limitations and need for innovation. *J. Infect. Dis.*, 2016, Vol. 214, no. 1, pp. 14-20.
10. Campisciano G., Zanutta N., Licastro D., De Seta F., Comar M. In vivo microbiome and associated immune markers: new insights into the pathogenesis of vaginal dysbiosis. *Sci. Rep.*, 2018, no. 8, no. 1, 2307. doi: 10.1038/s41598-018-20649-x.
11. Deng Y., Zhang Y., Wu T., Niu K., Jiao X., Ma W., Peng C., Wu W. Complement C3 deposition restricts the proliferation of internalized *Staphylococcus aureus* by promoting autophagy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2024, Vol. 14, 1400068. doi: 10.3389/fcimb.2024.1400068.
12. Doerflinger S.Y., Throop A.L., Herbst-Kralovetz M.M. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. *J. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 209, no. 12, pp. 1989-1999.
13. Gilbert N.M., Lewis W.G., Li G., Sojka D.K., Lubin J.B., Lewis A.L. Gardnerella vaginalis and Prevotella bivia trigger distinct and overlapping phenotypes in a mouse model of bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.*, 2019, Vol. 220, no. 7, pp. 1099-1108.
14. Gondwe T., Ness R., Totten P.A., Astete S., Tang G., Gold M.A., Martin D., Haggerty C.L. Novel bacterial vaginosis-associated organisms mediate the relationship between vaginal douching and pelvic inflammatory disease. *Sex. Transm. Infect.*, 2020, Vol. 96, no. 6, pp. 439-444.
15. Łaniewski P., Herbst-Kralovetz M.M. Bacterial vaginosis and health-associated bacteria modulate the immunometabolic landscape in 3D model of human cervix. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2021, Vol. 7, no. 1, 88. doi: 10.1038/s41522-021-00259-8.
16. Lepanto M.S., Rosa L., Paesano R., Valenti P., Cutone A. Lactoferrin in aseptic and septic inflammation. *Molecules*, 2019, Vol. 24, no. 7, 1323. doi: 10.3390/molecules24071323.
17. Lokken E.M., Mandaliya K., Srinivasan S., Richardson B.A., Kinuthia J., Lannon S., Jaoko W., Alumera H., Kemoli A., Fay E., John-Stewart G., Fredricks D.N., McClelland R.S. Impact of preconception vaginal microbiota on women's risk of spontaneous preterm birth: protocol for a prospective case-cohort study. *BMJ Open*, 2020, Vol. 10, no. 2, e035186. doi: 10.1136/bmjopen-2019-035186.
18. Mao X., Chen H., Peng X., Zhao X., Yu Z., Xu D. Dysbiosis of vaginal and cervical microbiome is associated with uterine fibroids. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2023, Vol. 13, 1196823. doi: 10.3389/fcimb.2023.1196823.

19. Mondal A.C., Sharma R., Trivedi N. Bacterial vaginosis: A state of microbial dysbiosis. *Med. Microecol.*, 2023, Vol. 16, 100082. doi: 10.1016/j.medmic.2023.10008.
20. Mouliou D.S. C-Reactive protein: pathophysiology, diagnosis, false test results and a novel diagnostic algorithm for clinicians. *Diseases*, 2023, Vol. 11, no. 4, 132. doi: 10.3390/diseases11040132.
21. Muzny C.A., Łaniewski P., Schwebke J.R., Herbst-Kralovetz M.M. Host-vaginal microbiota interactions in the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 33, no. 1, pp. 59-65. doi: 10.1097/QCO.0000000000000620.
22. Ng B.K., Chuah J.N., Cheah F.C., Mohamed Ismail N.A., Tan G.C., Wong K.K., Lim P.S. Maternal and fetal outcomes of pregnant women with bacterial vaginosis. *Front. Surg.*, 2023, Vol. 10, 1084867. doi: 10.3389/fsurg.2023.1084867.
23. Ostrycharz E., Hukowska-Szematowicz B. New insights into the role of the complement system in human viral diseases. *Biomolecules*, 2022, Vol. 12, no. 2, 226. doi: 10.3390/biom12020226.
24. Peebles K., Velloza J., Balkus J.E., McClelland R.S., Barnabas R.V. High global burden and costs of bacterial vaginosis: A systematic review and meta-analysis. *Sex. Transm. Dis.*, 2019, Vol. 46, no. 5, pp. 304-311.
25. Saadaoui M., Singh P., Ortashi O., Al Khodor S. Role of the vaginal microbiome in miscarriage: exploring the relationship. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2023, Vol. 13, 1232825. doi: 10.3389/fcimb.2023.1232825.
26. Sanchez-Garcia E.K., Contreras-Paredes A., Martinez-Abundis E., Garcia-Chan D., Lizano M., de la Cruz-Hernandez E. Molecular epidemiology of bacterial vaginosis and its association with genital micro-organisms in asymptomatic women. *J. Med. Microbiol.*, 2019, Vol. 68, no. 9, pp. 1373-1382.
27. Tian Z., Zhao M., Sui X., Li X., Qin L., Chen Z.J., Zhao S., Zhao H. Associations between vaginal microbiota and endometrial polypoid lesions in women of reproductive age: a cross-sectional study. *Reprod. Biomed. Online*, 2024, Vol. 48, no. 2, 103602. doi: 10.1016/j.rbmo.2023.103602.
28. van Teijlingen N.H., van Smoorenburg M.Y., Sarrami-Forooshani R., Zijlstra-Willems E.M., van Hamme J.L., Borgdorff H., van de Wijert J.H.H.M., van Leeuwen E., van der Post J.A.M., Strijbis K., Ribeiro C.M.S., Geijtenbeek T.B.H. *Prevotella timonensis* bacteria associated with vaginal dysbiosis enhance human immunodeficiency virus type 1 susceptibility of vaginal CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Infect. Dis.*, 2024, Vol. 230, no. 1, pp. e43-e47.
29. Valenti P., Rosa L., Capobianco D., Lepanto M.S., Schiavi E., Cutone A., Paesano R., Mastromarino P. Role of lactobacilli and lactoferrin in the mucosal cervicovaginal defense. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 376. doi: 10.3389/fimmu.2018.00376.
30. Zhang Z., Ma Q., Zhang L., Ma L., Wang D., Yang Y., Jia P., Wu Y., Wang F. Human papillomavirus and cervical cancer in the microbial world: exploring the vaginal microecology. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2024, no. 14, 1325500. doi: 10.3389/fcimb.2024.1325500.

---

**Автор:**

**Рахматуллаева М.М.** — д.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии Бухарского государственного медицинского института имени Абу Али ибн Сина Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Бухара, Республика Узбекистан

**Author:**

**Rakhmatullaeva M.M.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Abu Ali ibn Sina Bukhara State Medical Institute, Bukhara, Republic of Uzbekistan

Поступила 21.12.2024

Отправлена на доработку 17.01.2025

Принята к печати 23.03.2025

Received 21.12.2024

Revision received 17.01.2025

Accepted 23.03.2025

## **ДИАГНОСТИКА РИСКА ИЛИ НАЛИЧИЯ ИММУНОДЕФИЦИТНОГО СОСТОЯНИЯ У ДЕТЕЙ, СВЯЗАННОГО С СУБАТРОФИЕЙ, АТРОФИЕЙ И ПЕТРИФИКАЦИЕЙ ТИМУСА**

**Ровда Ю.И.<sup>1</sup>, Ведерникова А.В.<sup>1</sup>, Шабалдин А.В.<sup>1,2</sup>,  
Халивопуло И.К.<sup>2</sup>, Филипенко М.Л.<sup>3</sup>, Миняйлова Н.Н.<sup>1</sup>,  
Шмакова О.В.<sup>1</sup>, Отставнов Г.А.<sup>4</sup>, Вакулова Т.М.<sup>1</sup>, Бухтоярова О.С.<sup>4</sup>,  
Краснова Н.В.<sup>4</sup>, Анчикова Т.А.<sup>4</sup>, Мухамадияров Р.А.<sup>2</sup>, Дадонов В.В.<sup>1</sup>,  
Катаныхова М.В.<sup>5</sup>, Торгунакова А.В.<sup>5,6</sup>**

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

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> АО Клиническая медико-санитарная часть «Энергетик», г. Кемерово, Россия

<sup>5</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

<sup>6</sup> ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Своевременная диагностика иммунодефицитных состояний (ИДС) у детей до сих пор является существенной проблемой. Тем более когда причиной их развития является несостоятельность тимуса. Известно, что патология тимуса может быть обусловлена не только фетогенетическими причинами, но и преждевременной возрастной инволюцией, инволюцией вследствие воздействия «запредельных» стрессовых факторов, таких как инфекция, длительный голод, химиотерапия, лучевая нагрузка (включая рентгенологические исследования), длительная гипоксия, тубинфицирование,

### **Адрес для переписки:**

Ведерникова Алена Владимировна  
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ  
650056, Россия, 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  
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, И.К. Халивопуло, М.Л. Филипенко, Н.Н. Миняйлова, О.В. Шмакова, Г.А. Отставнов, Т.М. Вакулова, О.С. Бухтоярова, Н.В. Краснова, Т.А. Анчикова, Р.А. Мухамадияров, В.В. Дадонов, М.В. Катаныхова, А.В. Торгунакова «Диагностика риска или наличия иммунодефицитного состояния у детей, связанного с субатрофией и петрификацией тимуса» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 4. С. 831-846.

doi: 10.15789/1563-0625-DOT-3075

© Ровда Ю.И. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

### **For citation:**

Yu.I. Rovda, A.V. Vedernikova, A.V. Shabal'din, I.K. Khalivopulo, M.L. Filipenko, N.N. Minyailova, O.V. Shmakova, G.A. Orstavnov, T.M. Vakulova, O.S. Bukhtoyarova, N.V. Krasnova, T.A. Anchikova, R.A. Mukhamadiyarov, V.V. Dadonov, M.V. Katanakhova, A.V. Torgunakova "Diagnosis of the risk, or existence of immunodeficiency state in children associated with sub-atrophy and petrification of the thymus", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 4, pp. 831-846.

doi: 10.15789/1563-0625-DOT-3075

© Rovda Yu.I. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-DOT-3075

опухолевый рост и т. д. Инволютивные (вторичные) процессы в тимусе могут приводить не только к его субатрофии (микротимусу), но и сопровождаться петрификацией, приводя к необратимой потере площади функционирующей паренхимы. Чаще из перечисленных причин такую роль отводят вирусной инфекции, тем более что доказано инфицирование самого тимуса. Не последнее место занимает вирус SARS-CoV-2. Клинические проявления недостаточности иммунного обеспечения могут на несколько месяцев (а может быть, и больше) «отстоять» от момента воздействия в прошлом основной причины (чаще инфекции), поскольку на организацию петрификата и его распространение требуется время. Столь выраженный патоморфоз тимуса очень редко диагностируется прижизненно (УЗИ), а в основном является патоморфологической «находкой», когда, допустим, инфекция, приведшая к смерти, является проявлением уже сформировавшегося ИДС, а непосредственную причину необходимо «искать» в предшествующем катамнезе. Это является актуальным поводом для выявления группы риска таковых пациентов (на доклинической стадии развития выше обозначенных состояний) с последующим обеспечением им как более своевременной диагностики, консервативной медикаментозной поддержки (или радикального лечения), так и безопасного эпидемиологического окружения. Полученные нами результаты свидетельствуют о значимой диагностической роли УЗ-исследования тимуса для своевременной верификации его критических инволюций (субатрофии), тем более имеющих стабильный характер и признаки петрификации. При наличии этих признаков у пациента в комбинации с высокой инфекционной, иммуноопосредованной заболеваемостью и низкой концентрацией копий TREC в ядросодержащих клетках крови в «сухой капле» (менее 500 копий) предлагаются конкретные рекомендации для окончательного исключения высоко вероятного иммунодефицитного заболевания.

*Ключевые слова:* тимус, иммунодефицитные состояния, инволюция тимуса, кальцинаты в тимусе

## DIAGNOSIS OF THE RISK, OR EXISTENCE OF IMMUNODEFICIENCY STATE IN CHILDREN ASSOCIATED WITH SUB-ATROPHY AND PETRIFICATION OF THE THYMUS

Rovda Yu.I.<sup>a</sup>, Vedernikova A.V.<sup>a</sup>, Shabaldin A.V.<sup>a, b</sup>, Khalivopulo I.K.<sup>b</sup>, Filipenko M.L.<sup>c</sup>, Minyailova N.N.<sup>a</sup>, Shmakova O.V.<sup>a</sup>, Otstavnov G.A.<sup>d</sup>, Vakulova T.M.<sup>a</sup>, Bukhtoyarova O.S.<sup>d</sup>, Krasnova N.V.<sup>d</sup>, Anchikova T.A.<sup>d</sup>, Mukhamadiyarov R.A.<sup>b</sup>, Dadonov V.V.<sup>a</sup>, Katanakhova M.V.<sup>e</sup>, Torgunakova A.V.<sup>e, f</sup>

<sup>a</sup> Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

<sup>b</sup> Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

<sup>c</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

<sup>d</sup> JSC Clinical Medical and Sanitary Unit "Energetik", Kemerovo, Russian Federation

<sup>e</sup> Federal Research Center for Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

<sup>f</sup> Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

**Abstract.** Timely diagnosis of immunodeficiency states (IDS) in children still presents significant issues, especially, when they develop due to failure of the thymus. Thymus pathology may be caused not only by fetogenetic reasons, but also by premature age-related involution caused by the impact of "excessive" stress factors such as infection, continuous hunger, chemotherapy, radiation exposure (including X-ray studies), prolonged hypoxia, tuberculosis infection, tumor growth, etc. Secondary involution processes in the thymus may lead not only to its sub-atrophy (microthymus), but also be accompanied by petrification, leading to irreversible loss of functional parenchyma. More often than any mentioned reasons, such deleterious effects are assigned to viral infections, especially in cases of proven thymic infections, with SARS-CoV-2 virus taking

a significant place. Clinical manifestations of immune deficiency can persist for several months (or more), from the moment of past pathogenic exposure (usually, infectious factor), over the time required for evolving a petrified structure and its spread. Such pronounced pathomorphosis of the thymus gland is uncommonly diagnosed during the lifetime by means of ultrasound examination. This is, mainly, a pathomorphological finding, when, for example, a life-threatening infection is a manifestation of the already evolved IDS. The immediate cause must be sought via the preceding monitoring. This is a relevant reason for identifying a risk group of such patients performed at the pre-clinical stage of the above-mentioned conditions, with subsequent provision of these patients with both timely diagnostics, conservative drug support (or radical treatment), and a safe epidemiological environment. Our results suggest a significant diagnostic role of ultrasound examination of the thymus for early verification of its critical involution (i.e., sub-atrophy), especially, persisting changes and signs of petrification. Upon revealing these signs in the patient, being combined with high infectious, immune-mediated morbidity and low concentration of TREC copies in nucleated blood cells in a dry drop preparations (less than 500 copies), specific recommendations are offered for the final exclusion of highly probable immunodeficiency disorder.

*Keywords: thymus, immunodeficiency states, thymus involution, thymus calcifications*

## Введение

Иммунодефицитные и иммуноопосредованные состояния чаще выявляются только в случаях клинически значимой симптоматики (в основном это проявления: аутоиммунной патологии, панцитопении, увеличенной частоты и продолжительности инфекционных заболеваний, присоединения оппортунистических инфекций, миелодиспластического синдрома, случаев мотивированной антибактериальной терапии с минимальным эффектом и т. д.), что является актуальным поводом для более раннего выявления причин этих клинических ситуаций или выявления группы риска таковых пациентов (на доклинической стадии развития выше обозначенных состояний) с последующим обеспечением им как более своевременной диагностики, консервативной медикаментозной поддержки (или радикального лечения), так и безопасного эпидемиологического окружения. Помимо этого, и посмертная морфологическая диагностика иммунодефицитных состояний (ИДС) также является важным аспектом установления причин тяжести и летального исхода.

Тимус в настоящее время рассматривается как производное иммунной системы и в большей степени как ее центральный орган. Он во многом определяет инфекционную, онкологическую заболеваемость, иммуноагрессивную патологию, проблему пересадки органов и т. д. ИДС и иммунная дисрегуляция по определению зависят от качества вилочковой железы, которое может быть фетогенетически детерминировано. А также из-за возможности и характера ее прижизненных повреждений, возрастной инволюции в различные периоды жизни. Не случайно в детской популяции (особенно раннего возраста) встречаются различные морфометрические биполярные состояния вилочковой железы (5-10%), где ее

размеры на порядок могут быть больше/меньше вариативных величин. Речь идет о размерах вилочковой железы (биполярных трансформациях) выше 90 перцентиля и меньше 10 перцентиля, в соответствующих по возрасту таблицах. В определенных случаях феномен тимомегалии (например, у новорожденных) рассматриваются как результат генетических поломок (нервно-эндокринно-иммунный синдром с тимомегалией), индуцированный модифицированными Нохгенами. Этот синдром может ассоциироваться и с врожденной патологией сердца [7]. Также предметом дискуссии является вопрос избыточной инфекционной заболеваемости (чаще респираторного тракта) у детей грудного и раннего возраста с биполярными состояниями тимуса, где оппоненты придерживаются прямо противоположных точек зрения. Отечественные ученые более категоричны с ответом «о более высокой заболеваемости, отчасти обусловленной иммунодефицитом» и иллюстрируют это достаточно большим исследовательским материалом [1, 3, 4, 11, 12, 14]. Тем не менее точка зрения зарубежных исследователей (и отчасти отечественных) тоже заслуживает внимания, где в качестве доказательств приводятся факты относительно благополучных исходов у этих детей [2, 6, 16, 17, 18, 20]. При этом окончательная точка в научном споре об ИДС или иммунной дисрегуляции у детей с биполярными трансформациями тимуса еще не поставлена и причина этого кроется в отсутствии надежных иммуноопосредованных биомаркеров, практической малодоступности генетической диагностики первичных иммунодефицитов, в снижении интереса медицинской науки к проблеме биполярных состояний вилочковой железы в грудном и раннем возрасте, в отсутствии длительных лонгитудинальных наблюдений за этой категорией больных и т. д. [15].

Тимус, как очень сложная регулирующая структура, постоянно подвергается острым стрессам, которые вызывают в органе так называемую адаптивную акцидентальную инволюцию, проявляющуюся циклической динамикой, т. е. увеличением/снижением его массы (объема) и изменением функциональной активности. Степень выраженности и обратимость акцидентальной инволюции тимуса зависит от величины стрессового фактора (чаще инфекционно-воспалительного процесса), а также от исходного гено-фенотипически обусловленного функционального состояния иммунной системы [13]. Помимо этого в литературе представлены данные об агентах, вызывающих инфицирование самого тимуса [5, 23]. Несмотря на существование так называемого гемато-тимусного барьера, внутри органа были обнаружены инфекционные агенты, в том числе вирусы (грипп, корь, Коксаки В, вирус иммунодефицита человека, обезьян, лимфоцитарный хориоменингит и т. д.) [5, 23]. Также активно обсуждается интратимическая активность возбудителя COVID-19 [25]. И может быть, как следствие этого процесса, обозначены появление случаев болезни Кавасаки, системной красной волчанки и другой аутоиммунной патологии по истечению это инфекционного заболевания [5, 22]. Приводятся существенные доводы в пользу того, что интратимическая инфекция может играть непосредственную роль в возникновении атрофии тимуса, обусловленной повышенной гибелью телец Гассала и кальцификацией [5, 22]. К сожалению, сейчас нет четких методик прижизненного определения у человека возбудителей в тимусе, что в значительной степени оказало бы содействие в установлении факта формирующегося ИДС при данной конкретной инфекции [5]. В некоторых случаях при четвертой, а чаще – пятой стадии акцидентальной инволюции тимуса (субатрофии, атрофии – по определению зарубежных и некоторых отечественных ученых) выявляется обызвествление (кальцификация, петрификация) участков паренхимы, в частности телец Гассала [2]. Площадь петрификации (кальцификации) тимуса может быть различной, вплоть до поглощения основной части паренхимы, что, возможно, является в ряде случаев причиной столь радикальной и преждевременной инволюции органа. Отсюда возникает вопрос: может ли являться фактором риска развития ИДС (а может быть, уже свершившимся фактом) обнаружение кальцификатов в тимусе с критически низкой массой (за счет субатрофии, атрофии), и существуют ли (или возможны) на сегодняшний день этому достаточно веские обоснования?

Важный аспект заключается в том, что петрификат (кальцификат) – это свидетельство ло-

кального конечного патоморфоза, срок организации которого в органах не менее 2–4 месяцев, в связи с чем не всегда возможно его этиологию связать с той инфекцией, которая определяется в режиме online. Необходимо также учитывать, что петрификация ткани вилочковой железы идет за счет сокращения функционирующей ее паренхимы, приводящей к стабильной критичной инволюции органа и возможному развитию ИДС или других иммуноопосредованных состояний. Последний тезис является научной новизной, поскольку при активном научном поиске аналогичных предположений, утверждений (за исключением патоморфолога Ивановской Е.И. [2]) и попыток доказать обратное среди клиницистов получено не было.

Исходя из целенаправленного обзора литературы, складывается убеждение, что из многих факторов, вызывающих акцидентальную инволюцию, вплоть до кальцификации и атрофии тимуса (особенно у детей грудного, раннего возраста, отчасти дошкольного), доминирующее положение занимает инфекция. Во-первых, это наиболее частая причина, встречающаяся в перечне и природе перечисленных ниже патологических состояний, во-вторых, неинфекционные стрессоры (например, длительный голод, химиотерапия, лучевая нагрузка, системные аутоиммунные заболевания, иммуносупрессивная терапия, длительная гипоксия, опухолевый рост, патология беременности и плода и т. д. [2]) имеют более объективный анамнез, историю и стадии развития. Инфекция же может иметь различное течение (в том числе латентное), начало которой может быть неизвестным, а исход – непредсказуемым (фиброз, кальцификация, генерализация, тромбоз; в частности постковидный синдром и т. д.). Процесс кальцификации тканей (в нашем случае – при инфекции) может иметь разную степень интенсификации и распространения (иногда вне зависимости от активности основного процесса), а также хронологическую составляющую, занимающую по времени (до момента возможной идентификации) от 2 до 4 месяцев и более. Данное обстоятельство может затруднять диагностику начала необратимых инволютивных процессов в тимусе, связанных как с течением инфекционного процесса (в том числе в самом органе), так и развитием его кальцификации. Поэтому клинически значимое ИДС в виде тяжело протекавшей локальной инфекции или сепсиса (с транслокацией инфекции, синдромом системного воспалительного ответа, полиорганной симптоматикой, ДВС, цитопенией, со смешанной – в том числе оппортунистической флорой и пр.) может проявиться в достаточно отсроченном отрезке времени от момента первичного инфи-

цирования и иметь совершенно другую адгезивную флору и (или) системную гемокультуру, т. е. тогда, когда уже определилась критично низкая величина массы вилочковой железы (с петрификацией), не способной осуществлять свои непосредственные функции и неспособной к компенсаторной пролиферации.

Своевременная диагностика инволютивных изменений в тимусе, обусловленная кальцификацией матрикса является актуальным моментом, поскольку этот процесс необратим и имеет только негативный вектор развития со временем. Принципиально важным аспектом должно быть выявление начального этапа импрегнации тканей солями кальция, т. е. еще до развития атрофических процессов в вилочковой железе и нарушения ее функции. Особенно это касается детей грудничкового, раннего, дошкольного возраста, когда тимус наиболее активен в плане селекции и передачи основного пула дифференцированных наивных рабочих Т-лимфоцитов на периферию (в ткани) для защиты постоянства внутренней среды. Эта популяция в дальнейшем растет и поддерживается в автоматическом режиме, замещая со временем основные функции вилочковой железы и приводя ее к возрастной инволюции. Чем раньше произошла кальцификация паренхимы тимуса (например, внутриутробно, или в грудном, раннем возрасте), тем меньше должен быть пул эффекторных дифференцированных Т-лимфоцитов и лимфоцитов долговременной памяти на периферии, тем ниже процесс ауторегуляции иммунного ответа в условиях «отключения» импрегнированной кальцием вилочковой железы и тем большая вероятность развития ИДС и других иммуноопосредованных патологических состояний.

Одним из методов, позволяющих оценивать морфометрические параметры тимуса в режиме мониторинга, является сонография, которая может регистрировать в динамике не только объем и массу данного органа, но и его структуру (в том числе наличие петрификатов, характер и площадь их распределения). До сих пор нет опубликованных исследований частоты распространенности субатрофии, атрофии (с сочетанным кальцинозом) вилочковой железы по данным ультразвукового исследования у детей, и в том числе с оценкой их катамнеза. Во многом это зависит от отсутствия декретированного УЗИ-скрининга тимуса у детей вообще и в зависимости от возраста.

Как правило, такой патоморфоз тимуса фиксируют патологоанатомы и причину которого, в основном, связывают с инфекцией и реже — с некоторыми вышеперечисленными неинфекционными причинами (стрессорами) и которые не

вызывают побуждения для анализа и обсуждения подобной фатальной ситуации. В качестве непосредственной причины смерти указывается, например, эта инфекция (не ИДС), а изменения в тимусе характеризуются как последняя стадия (V) акцидентальной инволюции, дополнительно сочетающаяся с кальцинатами. Иногда и с кальцинатами в других органах. Принципиальным в этих случаях является то, что не учитывается значимость вилочковой железы и характер патоморфоза в ней, не принимается во внимание хронологический аспект образования кальцинатов (а отсюда — и последующей атрофии тимуса и ИДС), срок образования которых составляет от 2 до 4 и более месяцев. А поскольку это так, то причину инициирующую их появление логично было соотнести к более раннему сроку, чем та инфекция от которой ребенок экзистировал. В подобных клинических ситуациях в протоколах обследования нет декретированных показаний для УЗИ тимуса, и в случаях смерти атрофия тимуса, сочетанная с кальцинозом является патоморфологической находкой.

Еще раз необходимо подчеркнуть, что это очень редкая ситуация, когда подобная трансформация тимуса выявляется прижизненно (УЗ-диагностика), и в этом аспекте является подозрительным тот факт, что относительно большое число таких случаев у детей 1-й группы приходилось на последние 2-3 года, т. е. в период COVID-19-эпидемии. И в связи с этим было проведено исследование, результаты которого представлены ниже и которое проводилось в плане исключения возможных причин патоморфоза тимуса, а также в рамках предполагаемой концепции о вероятности внутритимического инфицирования (в частности COVID-19) со всеми вытекающими отсюда последствиями [21, 25]. Этому предшествовали другие исследования, целью которых было не только определение нормативных параметров вилочковой железы в популяции детей Кузбасса, но и диагностика риска развития или наличия ИДС способом выявления (или исключения) высокой сопряженности выше обозначенных УЗ-патоморфологических «находок» (микротимус+петрификаты) с «неадекватным» лабораторным иммунным профилем (TREC и KREC) и с «неблагополучным» целенаправленным «инфекционным» и иммуноопосредованным катамнезом у исследуемых пациентов основной группы (1) и группы сравнения, в отличие (3) от таковых детей контрольной группы (2).

## Материалы и методы

Исследования проводились на базах ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава РФ г. Кемерово, ФГБНУ НИИ КПССЗ г. Кемерово, ГАУЗ КОКБ

им. С.В. Беляева, АО КМСЧ «Энергетик» г. Кемерово. В них включались данные целенаправленного обзора отечественной и зарубежной литературы, их анализ и обобщение.

В процессе исследования с 2010 по 2024 год проводилась УЗИ-верификация морфометрических параметров тимуса у 850 детей популяции г. Кемерово, средний возраст которых составлял 3 года 6 мес. с вариациями отклонения от 10 до 90 перцентилей  $\pm 2$  года 8 мес. Из них группу 2 (контрольную) составили 375 детей в возрасте от 3 до 6 лет, у которых тимус визуализировался как образование средней эхогенности с несколько неоднородной структурой за счет небольшого количества включений точечного и линейного характера (которые подобным образом были обозначены и в крупном УЗ-исследовании тимуса у детей, проведенного Кузьменко Л.Г. и соавт. (2014) [8]), и величина которого (объем/масса) укладывалась в границы 10-90 перцентилей, что составляло  $21,0 \pm 11,02$  см<sup>3</sup>/ $28,0 \pm 14,0$  г соответственно. Критерии включения и исключения из исследования отчасти заимствованы у Кузьменко Л.Г. и соавт. [7].

Группу 1 (основную) составили 20 детей, из которых 15 детей (75%) имели одинаковое возрастное и гендерное соотношение (м:д = 1,1:1,0) с детьми контрольной группы (n 2) и группы сравнения (n 3), а остальные 5 человек (25%) имели более зрелый возраст (от 7 до 17 лет). Определяющим критерием для формирования этой группы явилось 100%-ное наличие у них симптома «микротимуса» [9], или по другим источникам – субатрофия, атрофия или гипоплазия [8], или акцидентальная инволюция IV-V степени [3]) при УЗ-исследовании, морфометрические характеристики которого (объем/масса) были минимальными и соответствовали величинам в границах менее 10-5 перцентилей для данного возраста и пола ( $6,72 \pm 3,3$  см<sup>3</sup> /  $9,4 \pm 4,6$  г соответственно). Данная инволюция в 100% сочеталась с наличием кальцинатов (петрификатов) в паренхиме вилочковой железы, которые были множественными и диффузно расположенными. Среди пациентов с 3 до 6 лет включительно (15 человек, 75%) средняя масса вилочковой железы составляла 7,2 г, при этом в нормативном процентильном коридоре данного возраста масса тимуса колеблется от 16 до 48 г [8]. В старшей возрастной группе (5 человек, 25%) средняя масса тимуса составила 3,99 г, при значениях в нормативном диапазоне 7-29 г [8]. Петрификация также регистрировалась еще у 3 детей (2 ребенка (брат и сестра из двойни) в возрасте 3 лет и у 1 ребенка 10 лет с нормативными параметрами тимуса, что явилось поводом для исключения их из основной группы.

Что касается статистики, то относительный риск трансформации в «микротимус» (а точнее – в субатрофию, атрофию) у детей первой группы с кальцинатами в органе был очень высоким и равен значению 37,2, доверительный интервал (11,4-121,7), чувствительность – 86%, специфичность – 90%. В целом следует отметить, что выше названная группа была сформирована из числа обследуемых детей, обращавшихся в детскую поликлинику (в 2023-2024 годах) с жалобами по поводу частых респираторных и прочих инфекционных или других заболеваний (табл. 1) и которым с учетом информированного согласия родителей проводилось целенаправленное исследование иммунного и прочего статуса, включая УЗИ тимуса.

Группу 3 (сравнения) составили 30 детей того же в возрасте от 3 до 6 лет с сопоставимым гендерным соотношением с группой контроля и основной группой. Критерием отбора в эту группу была УЗ-морфометрическая величина (объем/масса) тимуса менее 10-5 перцентилей и которая была равна  $7,5 \pm 4,1$  см<sup>3</sup> /  $10,4 \pm 5,8$  г соответственно. Группа формировалась из части детей контрольной группы с вышеуказанными параметрами тимуса. Здесь нужно обозначить обратимость микротимуса у детей группы сравнения, тогда как в основной группе этот феномен был стабильным. Другими отличиями от основной группы являлись отсутствие в паренхиме тимуса кальцинатов и несколько другой характер жалоб (в основном по поводу частых респираторных и прочих инфекционных или других заболеваний), который представлен в таблице 1 и на рисунке 1.

Важно отметить, что характер вскармливания и удельный вес посещающих детское дошкольное учреждение детей основной, контрольной групп и группы сравнения был примерно одинаковым.

Группу 4 составили 50 детей (от 1 мес. до 3 лет), истории болезни которых демонстрировали факты вынужденной тотальной тимэктомии в результате оперативного лечения врожденного порока сердца. Практически все дети страдали длительной недостаточностью кровообращения 2а-2б (т. е. находились в состоянии длительной гипоксии). Удаленный тимус в каждом случае подвергался морфологическому и гистологическому исследованию.

Сонографию тимуса и оценку результатов проводили согласно данным Кузьменко Л.Г. и соавт. (2002, 2014) [8, 10].

У детей был выполнен забор периферической крови, которая наносилась на фильтры Perkin Elmer 226 Guthrie cards (Perkin Elmer Health Sciences, США). Гатри-карты до использования хранились при комнатной температуре в лаборатории генетики КемГУ. Выделения ДНК вы-

**ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ (И RR 95% CI) В КАТАМНЕЗЕ КЛИНИЧЕСКИХ СИНДРОМОВ И НОЗОЛОГИЙ У ДЕТЕЙ 3-6 ЛЕТ (1-3-Й ГРУПП) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НОРМОМОРФОЗА, ПАТОМОРФОЗА ТИМУСА**

TABLE 1. FREQUENCY OF DETECTION (AND RR 95% CI) IN THE FOLLOW-UP OF CLINICAL SYNDROMES AND NOSOLOGIES IN CHILDREN 3-6 YEARS OLD (GROUPS 1-3) DEPENDING ON THE NORMAL PATHOMORPHOSIS OF THE THYMUS.

Синдромы и нозологические формы Syndromes and nosological forms	Основная группа (n 1) Main group (n 1) n = 15		Контрольная группа (n 2) Control group (n 2) n = 375	Группа сравнения (n 3) Comparison group (n 3) n = 30	
	Абс. (%) Abs. (%)	Rn1/Rn2 (95% ДИ) Rn1/Rn2 (95% CI)		Rn3/Rn2 (95% ДИ) Rn3/Rn2 (95% CI)	Абс. (%) Abs. (%)
<b>ОРВИ (более 8 раз в году)</b> ARI (more than 8 times a year)	14 (93)	110,091 (14,8-817,095)	30 (8)	4 (1,98-8,10)	9 (30)
<b>ОРВИ не осложненная (менее 8 раз в году)</b> Uncomplicated acute respiratory viral infection (less than 8 times a year)	1 (7)	0,003 (0,000-0,019)	375 (100)	0,051 (0,03-0,07)	20 (67)
<b>Обструктивный бронхит/бронхиальная астма</b> Obstructive bronchitis/bronchial asthma	7 (47)	8,3 (3,2-21,7)	30 (8)	5,1 (2,6-10,0)	11 (37)
<b>Катаральный отит / Catarrhal otitis</b>	7 (47)	3,6 (1,3-9,8)	68 (18)	1,826 (0,8-3,8)	9 (30)
<b>Гнойный отит / Purulent otitis</b>	4 (27)	3,8 (1,3-11,3)	30 (8)	1,2 (0,4-3,9)	3 (10)
<b>Пневмония / Pneumonia</b>	3 (20)	5,2 (1,6-16,7)	15 (4)	4,5 (2,0-9,9)	4 (13)
<b>Кандидоз слизистых оболочек</b> Candidiasis of the mucous membranes	3 (20)	3,65 (1,1-12,1)	22 (6)	1,63 (0,53-5,00)	3 (10)
<b>Острая кишечная инфекция</b> Acute intestinal infection	5 (33)	15,7 (6,3-39,0)	7 (2)	7,5 (3,7-15,2)	6 (20)
<b>Дважды перенесенная ветряная оспа</b> Twice suffered from chickenpox	2 (13)	9,8 (2,8-34,4)	4 (1)	4,7 (1,4-15,5)	2 (7)
<b>Лямблиоз / Giardiasis</b>	1 (7)	1,3 (0,1-9,5)	19 (5)		0
<b>Иммуноопосредованная патология (аутоиммунный тиреоидит, сахарный диабет, целиакия, очаговая склеродермия и т. д.)</b> Immune-mediated pathology (autoimmune thyroiditis, diabetes mellitus, celiac disease, focal scleroderma, etc.)	2 (13)	7,3 (1,9-27,3)	6 (2)	3,5 (1,0-12,4)	2 (7)
<b>Афтозные и (или) герпетические проявления на коже и слизистых</b> Aphthous and/or herpetic manifestations on the skin and mucous membranes	0		22 (6)	2,8 (1,16-6,70)	5 (17)
<b>Атопический дерматит / Atopic dermatitis</b>	3 (20)	5,1 (1,5-16,7)	19 (5)	1,2 (0,4-6,2)	2 (7)
<b>Селективный дефицит IgA / Selective IgA deficiency</b>	2 (13)	14,8 (4,8-45,3)	2 (0,5)		0

полняли 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, США).

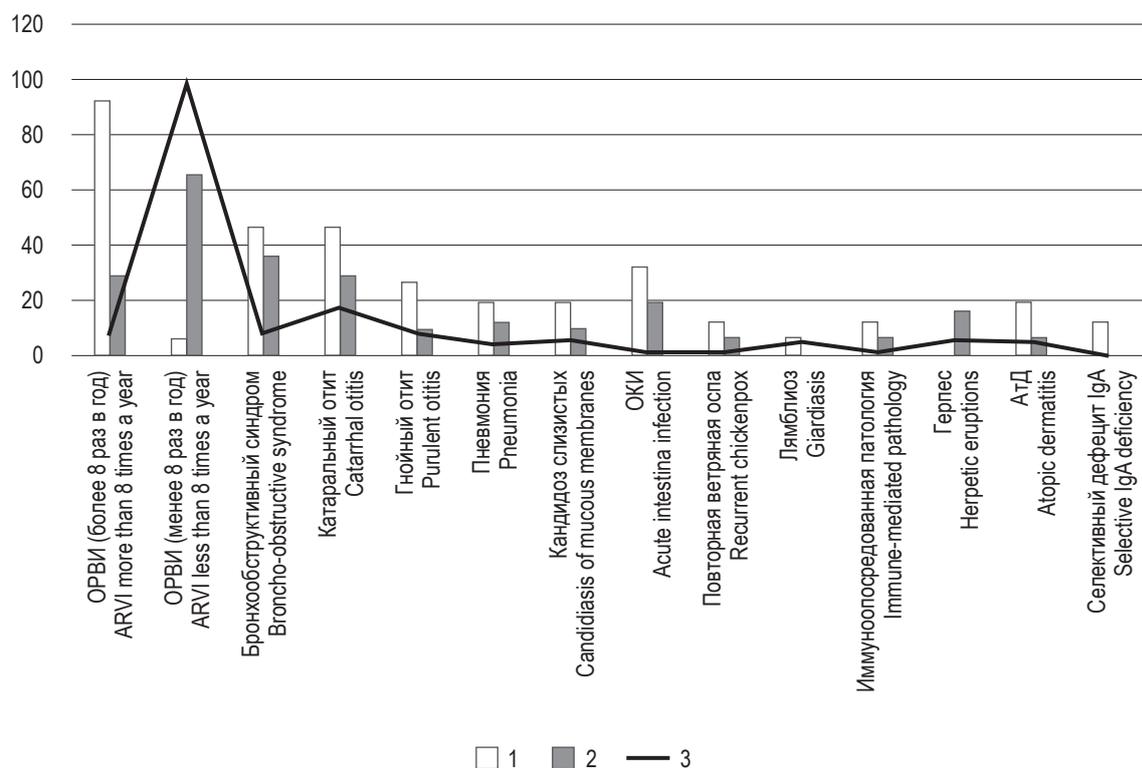
## Результаты

В настоящем исследовании были представлены результаты сравнительного изучения катанеза детей трех групп, отличающихся характером морфометрических (морфологических) изменений в тимусе (рис. 1, табл. 1).

По данным, полученным в ходе статистического анализа (табл. 1), наиболее высокий относительный риск (110, 091 ДИ (14,8-817,095)) в реализации наиболее частой (более 8 раз в год)

заболеваемости ОРВИ наблюдается у детей 1-й группы с выявленным кальцинозом и субатрофией, атрофией вилочковой железы сравнении с контрольной группой (n 2). Также эти дети имеют значительно более высокие риски заболеваемости острой кишечной инфекцией (15,7 ДИ (6,3-39)) и наличия селективного дефицита иммуноглобулина А (14,8 ДИ (4,8-45,3)). В меньшей степени, но статистически значимо дети 1-й группы были отягощены риском более частых проявлений бронхообструктивного синдрома / бронхиальной астмы (8,3 ДИ (3,2-21,7)), иммуноопосредованных заболеваний (АИТ, СД и т. д) (7,3 ДИ (1,9-27,3)), пневмонии (5,167 ДИ (1,5-16,7)), атопического дерматита (5,1 ДИ (1,5-16,7)), кандидоза слизистых оболочек (3,65 (1,1-12,1)), катарального и гнойного отита (3,6 ДИ (1,3-9,8) и 1,7 ДИ (0,4-7,2) соответственно); возобновлением повторных эпизодов ветряной оспы (9,8 ДИ (2,8-34,4)). Такие заболевания, как лямблиоз, афтозные и (или) герпетические проявления на коже и слизистых имели риск реализации не чаще, чем у детей контрольной группы.

Дети 3-й группы (группа сравнения) с микро-тимусом (гипоплазией или субатрофией), но без



**Рисунок 1. Процент частоты выявления в катанезе клинических синдромов и нозологий у детей 3-6 лет (1-3-й групп) в зависимости от нормоморфоза, патоморфоза тимуса**

Примечание. 1 – основная группа, 2 – контрольная группа, 3 – группа сравнения.

Figure 1. The percentage of frequency of detection in follow-up of clinical syndromes and nosologies in children 3-6 years old (groups 1-3) depending on the normal pathomorphosis of the thymus.

Note. 1, main group; 2, control group; 3, comparison group.

проявлений кальциноза в сравнении с группой 2 (контроля), также имеют повышенный риск развития большинства вышеперечисленной патологии, что является основанием для статистического сравнительного сопоставления с аналогичным показателем детей основной группы (n 1) (рис. 2). Риск реализации такой патологии, как гнойный отит, лямблиоз, atopический дерматит, селективный дефицит IgA у детей 3-й группы был не выше детей контрольной группы (n 2).

Необходимо сделать акцент на том, что по полученным данным, дети 1-й группы по сравнению с 3-й группой имеют статистически более высокий относительный риск реализации тех заболеваний, которые также значимо преобладали в последней группе по отношению к контролю (n 2), а именно: ОРВИ более 8 раз в год – 13,391 ДИ (1,9-93), (хи-квадрат – 16, при  $p < 0,001$ ), острая кишечная инфекция (7,5 ДИ (3,7-15,2)), бронхиальная астма/обструктивный бронхит (5,1 ДИ (2,6-10)), пневмония (4,5 ДИ (2-9,9)), иммуноопосредованные состояния (3,5 ДИ (1-12,4)), гнойный и катаральный отит (1,97 ДИ (0,88-4,45)) и (1,5 ДИ (0,7-3,5)) соответственно; кандидоз слизистых оболочек (1,6 (0,6-4,1)), воз-

обновление повторных эпизодов ветряной оспы (1,5 ДИ (0,5-4,6)). И если риск развития таких заболеваний, как гнойный отит, atopический дерматит, селективный дефицит IgA в третьей группе был не выше, чем у детей популяции (группа 2), то в первой группе он также достоверно доминировал над ними.

В изучаемом статусе 5 детей 1-й группы, возраст которых был от 7 до 17 лет, имелись также критически низкие морфометрические параметры вилочковой железы (микротимус) и ее существенная петрификация. И если анализировать из катамнеза весь спектр фиксированных заболеваний, указанных в таблице 1, на рисунках 1, 2, то такие заболевания, как ОРВИ (более 8 раз в году), бронхиальная астма, пневмония, иммуноопосредованная патология имели риск реализации в этой подгруппе в 7-14 раз чаще в сравнении с контрольной группой. Таким образом, вся основная группа (от 3 до 17 лет) была скомпрометирована не только стабильным негативным патоморфозом тимуса (микротимус+петрификация), но и избыточной инфекционной и иммуноопосредованной заболеваемостью, что с высокой степенью вероятности может являться критерием

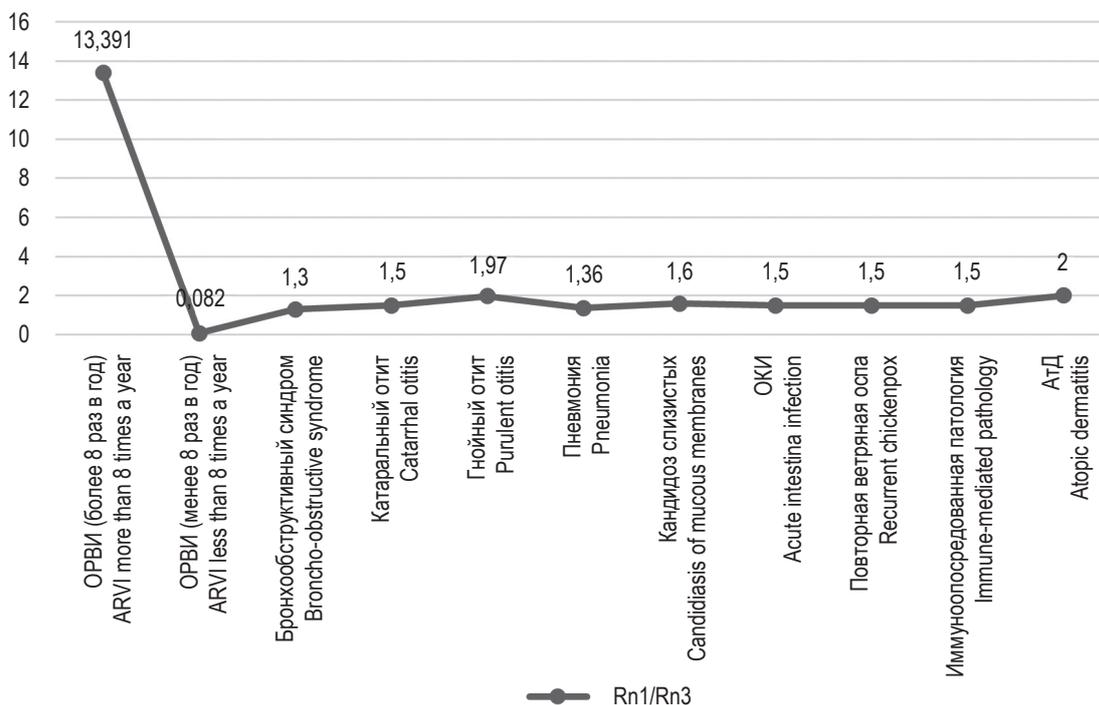


Рисунок 2. Относительный риск (Rn1/Rn3) выявления в катамнезе клинических синдромов и нозологий у детей 3-6 лет (1-й и 3-й групп) в зависимости от нормо-,патоморфоза тимуса

Примечание. ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция; бронхообструктивный синдром – бронхиальная астма / обструктивный бронхит; ОКИ – острая кишечная инфекция; АД – atopический дерматит.

Figure 2. Relative risk (Rn1/Rn3) of identifying clinical syndromes and nosologies in follow-up in children 3-6 years old (groups 1 and 3) depending on the normal pathomorphosis of the thymus

Note. ARVI, acute respiratory viral infection; broch-obstructive syndrome, bronchial asthma/obstructive bronchitis; All, acute intestinal infection; ATD, atopic dermatitis.

ИДС у них с неблагоприятным в будущем прогнозом.

С целью уточнения причин кальциноза и субатрофии, атрофии ткани вилочковой железы у детей 1-й группы, анализ анамнестических данных и оценка предшествующих перенесенных инфекций была сделана с акцентом на заболеваемость COVID-19. Если оценивать антенатальный период всех детей этой группы, то у большинства пациентов не было выявлено отягощающих факторов в это время, но 3 детей были зачаты путем экстракорпорального оплодотворения (13%), в двух случаях беременность протекала на фоне коронавирусной инфекции (10%), в одном случае мать пациентки имела сахарный диабет 1-го типа (5%). Все исследуемые дети родились доношенными. Из 20 детей 1-й группы, с субатрофией, атрофией и петрификацией вилочковой железы, у 15 человек (75%) коронарвирусная инфекция была документирована по амбулаторным картам и из бесед с родителями или в ходе исследования путем выявления титра IgG к COVID-19. В контрольной группе (n 2) из 21 ребенка (метод случайной выборки) от 3 до 17 лет, регистрировалось 5 (24%) документированных случаев перенесенного COVID-19 ( $\chi^2 = 10,74$  p = 0,002), среди них, 1 ребенок с относительно малыми размерами тимуса без наличия петрификатов. Учитывая столь явное статистическое преобладание коронарвирусной инфекции у детей 1-й группы в прошлом, в период заболевания у них не исключена и интратимическая инвазия вируса SARS-CoV-2 с последующим патоморфозом вилочковой железы (субатрофия, атрофия + петрификация).

Чтобы поставить значимую точку в дискуссии о взаимосвязи морфологии и функции органов, о наличии иммунодефицита, было решено сопоставить катамнез и уровни его сопряженности с тимопоэтической функцией (по концентрации копий TREC в ядросодержащих клетках крови в «сухом пятне») у детей, которые имели как критическую инволюцию (микротимус) с петрификацией (n 1), так и нормальную структуру органа (n 2).

В иммунном профиле 10 детей (от 3 до 6 лет) основной группы (n 1), среднее количество копий TREC (в 105 ядросодержащих клеток из образцов сухой капли крови) было существенно ниже такового 30 детей (n 2) контрольной группы (449,4 против 1267;  $\chi^2 = 7,4$ , при p < 0,05). Количество копий KREC в 105 аналогичных клеток было примерно равным (907 против 1005;  $\chi^2 = 2,1$ , при p < 0,05). Столь выраженное снижение количества TREC в образцах сухой капли крови являлось дополнительным аргументом в пользу наличия высокого риска ИДС (в большей степени клеточного звена) детей основной группы (n 1).

Если по данным большинства источников причиной столь глубокой и необратимой инволюции тимуса (его атрофия + кальцификация) является запредельный по силе или времени фактор (стрессор), то в клинической практике должны быть подобные примеры, которые можно было обобщить либо подвергнуть исследованию. В настоящем исследовании приводится анализ историй болезни 50 детей раннего возраста (от 1 мес. до 3 лет) (n 4), подвергшихся вынужденной тотальной тимэктомии в результате оперативного лечения врожденного порока сердца. Практически все дети страдали относительно длительной недостаточностью кровообращения 2а-2б (т. е. находились в состоянии длительной гипоксии), что являлось экстремальной стрессовой нагрузкой на органы, в том числе и на тимус. При морфологическом и гистологическом исследовании удаленного тимуса фиксировали как нормальную величину и массу, так и тимомегалию и критически низкие его параметры. Количество детей, у которых морфологи регистрировали субатрофию, атрофию тимуса, было равно 15 (30%), но ни в одном из них не было случаев петрификации. В данном случае это иллюстрация, противоречащая представлению о том, что любая неинфекционная экстремальная стрессовая ситуация (в данном случае длительная гипоксия) — почти обязательное условие развития субатрофии, атрофии тимуса с сочетанной его петрификацией.

## Обсуждение

Все выше представленные результаты свидетельствуют о высокой степени иммунной недостаточности (в большей степени комбинированной), которая наиболее демонстративно проявляется у детей первой группы с критично малыми размерами тимуса и его петрификацией. Это проявляется статистически значимым более частым возникновением широкого спектра нозологий, клинических синдромов, связанных как с вирусной, так отчасти с бактериальной и грибковой инфекцией, с иммуноопосредованными состояниями в сравнении с таковыми у детей как контрольной группы, так и детей, тимус которых также имел низкие морфометрические параметры, но без кальцификации. У последних, перечень вышеобозначенных патологических состояний (кратность которых тоже выше популяционной) был на треть меньше; реже, чем у детей 1-й группы, возникали заболевания, обусловленные бактериальной и грибковой инфекцией. Представленные клинические «параллели» у детей исследуемых групп в определенной степени могут отражать выраженность и глубину морфологических изменений в тимусе. Логично пред-

полагать, что степень патоморфоза вилочковой железы и недостаточности иммунного обеспечения в третьей группе были выражены в меньшей степени, поскольку в ее паренхиме не было признаков кальцификации как в первой группе и патологические клинические проявления были более редкими и менее выражены. В пользу этого предположения свидетельствует и восстановление размеров и массы вилочковой железы до нормативных по результатам повторного УЗ-исследования (спустя 1-2 месяца) у трети исследуемых детей третьей группы. В совокупности это может отражать более функциональный характер процессов в вилочковой железе, который обозначается во многих отечественных источниках как акцидентальная (стрессзависимая) инволюция с очень высокими шансами на восстановление. Напротив, у детей первой группы (у которых наличие микротимуса сочеталось с его кальцификацией) при повторном УЗ-исследовании обратной восстановительной динамики со стороны морфометрических параметров органа не наблюдалось.

Учитывая значительное преобладание случаев заболевания коронарновирусной инфекцией у детей 1-й группы и явное учащение случаев прижизненной диагностики (УЗ-исследование) злокачественного патоморфоза тимуса (субатрофия, атрофия + петрификация) в период COVID-19-эпидемии, не исключена его зависимость от внутритимического инфицирования вирусом SARS-CoV-2. Также выраженное снижение количества TREC (в образцах сухой капли крови) по отношению к группе контроля являлось дополнительным аргументом в пользу наличия высокого риска ИДС (в большей степени клеточного звена) у детей основной группы (n 1).

Исходя из обзора целенаправленного списка литературы, складывается убеждение, что из многих факторов, вызывающих акцидентальную инволюцию вплоть до кальцификации и атрофии тимуса (особенно у детей грудного, раннего возраста, отчасти дошкольного), доминирующее положение занимает инфекция. Об этом в определенной степени могут свидетельствовать результаты фиксирующие отсутствие петрификации в субатрофичных, атрофичных тимусах детей, подвергшихся воздействию длительного стрессового неинфекционного фактора – гипоксии (проявления НК 2а-2б), которым была проведена вынужденная тимэктомия при операции на порочном сердце. Возможно, в этом процессе могут быть задействованы другие причины, скорее всего инфекция и (или) конституция.

В нашем представлении инфекция – это наиболее частая причина, встречающаяся в перечне и природе выше перечисленных патологиче-

ских состояний (или неинфекционных стрессоров), которые имеют более объективный анамнез, историю и стадии развития. Инфекция же может иметь различное течение (в том числе латентное), начало которой может быть неизвестным, а исход – непредсказуемым (фиброз, кальцификация, генерализация, тромбоз; в частности – постковидный синдром и т. д.). Процесс кальцификации тканей (в нашем случае – при инфекции) может иметь разную степень интенсивности и распространения (иногда вне зависимости от активности основного процесса), а также – хронологическую составляющую, занимающую по времени (до момента возможной идентификации) от 2-4 месяцев и более. Данное обстоятельство может затруднять диагностику начала необратимых инволютивных процессов в тимусе, связанных как с течением инфекционного процесса (в том числе в самом органе), так и развитием его кальцификации. Поэтому клинически значимое ИДС в виде тяжело протекающей локальной инфекции или сепсиса может проявиться в достаточно отсроченном отрезке времени от момента первичного инфицирования и повреждения тимуса и иметь совершенно другую адгезивную флору и (или) системную гемокультуру, т. е. тогда, когда уже определилась критично низкая величина массы вилочковой железы, не способной осуществлять свои непосредственные функции и компенсаторную пролиферацию. Принципиально важно в случаях летального исхода у детей такой же возрастной группы проводить ретроспективный анализ медицинской документации с целью выяснения причины смерти (в первую очередь ИДС) и связи ее с инволютивными изменениями в вилочковой железе (до стадии субатрофии, атрофии с сочетанной петрификацией) с большой вероятностью обусловленных перенесенной ранее инфекцией (за несколько месяцев, а может быть, и лет до момента смерти) либо актуальной инфекцией на момент смерти, в том числе с внутритимической локализацией, либо другими причинами неинфекционного происхождения. Большое значение имеет информация о наличии сочетанных петрификатов в других органах и определение инфекционных возбудителей в самом тимусе. Случаи выявления корреляционной связи между фатальным (летальным) исходом (вследствие развития генерализованной инфекции – сепсиса, или локальной инфекции с тяжелыми необратимыми осложнениями) и критичной инволюцией тимуса (атрофия, акцидентальная инволюция IV-V стадии) с сочетанной кальцификацией могут являться достаточным аргументом в пользу выше представленных версий: наличия ИДС и причины его проявления. Но в реальной врачебной практике

у детей с подобной угрожающей клинко-морфологической ситуацией целенаправленное УЗИ тимуса и иммунный профиль крови зачастую не проводятся, в анализируемых посмертных эпикризах историй болезни, так же как и в протоколах патоморфологического исследования, диагноз «иммунодефицитное состояние» не выставляется либо выставляется как «фоновый диагноз — акцидентальная инволюция тимуса»; при аутопсии целенаправленно не определяется инфекционная флора в ткани тимуса.

В качестве демонстрации такого предположения приводятся ниже 2 клинических примера.

#### **Клинический случай 1**

Ребенок 4 лет, из тройни, несколько пониженного питания. Из диспансерной группы часто и длительно болеющих инфекционными заболеваниями (преимущественно ОРВИ), которые по данным амбулаторной карты и анамнеза регистрировались в среднем 10 и более случаев в год. Из них вирусной этиологии — свыше 30 раз (из них 1 раз COVID-19); бактериальной этиологии — 4 случая (3-кратно — острый тонзиллит, 1 — дакриоцистит), случаев грибковой этиологии — 3 (рецидивирующий кандидоз слизистых оболочек ротовой полости). Средняя продолжительность заболеваний составила 20 дней, Срочная госпитализация потребовалась в 8 случаях в связи с судорожным (5 случаев), бронхообструктивным синдромами (3 случая). Несколько раз проводилось лечение антибиотиками. Исходя из этих данных, пациента отнесли к группе риска с предполагаемого ИДС. Следующим этапом диагностики являлось проведение сонографии вилочковой железы, при которой были обнаружены ее критично низкие масса (3,4 г) и объем (2,5 см<sup>3</sup>) по отношению к референсным значениям таковых (масса 16-48 г, объем 9,2-15,2 см<sup>3</sup>) для детей данной возрастной группы. Паренхима тимуса на всем протяжении была диффузно импрегнирована гиперэхогенными включениями — кальцинатами. Концентрация TREC в 105 ядросодержащих клеток из образцов сухой капли крови равнялась 421 копии и была значительно ниже, чем в группе сравнения — 1267 копий. Данный результат также являлся поводом для предположения ИДС. При сборе анамнеза и изучении медицинских документов двух других sibсов, их инфекционная заболеваемость укладывалась в средние значения по региону и настороженности не вызвала. Никаких патологических изменений на УЗИ тимуса обнаружено не было. Таким образом, в представленном случае определялись 3 «формализованных маркера» (высокая сочетанная инфекционная заболеваемость, наличие субатрофии, атрофии тимуса с петрификацией, низкая концентрация TREC в 105 ядросодержа-

щих клеток из образцов сухой капли крови) высоковероятного ИДС. В настоящее время проводится дообследование и реабилитация.

#### **Клинический случай 2**

Ребенок Ч.М., в возрасте 4 месяца 15 дней, заболел со слов матери ОРВИ, протекающей с фебрильной лихорадкой и с синдромом бронхообструкции, по поводу которых поступил в местный стационар практически на 2-й день заболевания, где оказывалась патогенетическая и симптоматическая терапия + антибиотик (ампициллин). На 5-й день заболевания по настоянию матери выписан из отделения с нормальной температурой тела, но ингаляции с пульмикортом продолжались в амбулаторных условиях. На 3-й день от момента выписки вновь рецидив лихорадки и нарастание тяжести бронхообструктивного синдрома + появление симптомов ларинготрахеита. Резкая динамика нарастания тяжести заболевания послужила поводом для госпитализации в этот же день в специализированное детское отделение раннего возраста ГАУЗ областной клинической больницы г. Кемерово, где выставлен предварительный диагноз «полисегментарная пневмония» (подтвержденная рентгенологически), острый стенозирующий ларинготрахеит. Тяжесть состояния потребовала перевод в этот же день в отделение реанимации и интенсивной терапии и оказания медицинской помощи по протоколу токсико-септической бактериальной инфекции + посиндромная терапия ларинготрахеита и бронхообструкции и т. д. На 2-й день госпитализации переведен на управляемое дыхание в связи с нарастанием тяжести состояния из-за дыхательной недостаточности. Появились признаки полиорганной недостаточности, ДВС, транслокации инфекции (энтероколит), рефрактерности к проводимой антибактериальной терапии широкого спектра действия. Столь стремительное развитие вышеперечисленных синдромов послужило поводом для постановки диагноза «сепсис» на фоне ИДС с соответствующей коррекцией медикаментозной терапии. Несмотря на проводимые лечение, на 3-й день госпитализации ребенок экзитировал. При аутопсии, патологоанатомами был установлен основной диагноз «острая генерализованная вирусно-бактериальная инфекция (сепсис), стенозирующий ларинготрахеит, умеренный энтероколит, миозит задней перстнечерпаловидной мышцы, очагово-сливная бронхопневмония, серозный менингоэнцефалит, серозный интерстициальный миокардит, серозный перикардит». Осложнение: ДВС-синдром, отек головного мозга. При посмертном бактериологическом исследовании выявлены комбинации *E. Coli*, *Str. viridans*, *Candida spp*, *Kl. pneumoniae* в тканях

головного мозга, легких, кишечника. Помимо этого, при макроскопическом исследовании и гистологии внутренних органов было установлено, что ребенок имеет признаки акцидентальной инволюции вилочковой железы 5-й степени (субатрофия, атрофия), а именно, крайне малые морфометрические параметры, равные объему в 4,5 см<sup>3</sup> и массе 6,0 г (при средней массе у детей данной возрастной группы 10-12 г), тельца Гас-саля многочисленные, кистозно расширенные, слоистые с мелкими фокусами кальциноза. Кроме того, выявлены рассеянные мелкие фокусы кальциноза в мягких оболочках головного мозга. При анализе данных анамнеза жизни никакихотячающих обстоятельств в антенатальном периоде и на всем протяжении жизни выявлено не было, за исключением перенесенной ОРВИ-инфекции на 2-м месяце жизни без видимых внешне клинических последствий. На патолого-анатомической конференции был сделан вывод о том, что ребенок имел тяжелый комбинированный иммунодефицит, связанный с выраженной атрофией тимуса вследствие импрегнации солями кальция всей паренхимы железы. На наличие тяжелого комбинированного иммунодефицита указывает необратимая критически низкая величина массы и объема тимуса (с наличием петрификатов), и фактор фатальной генерализации инфекции (сепсис). Учитывая данные о среднем сроке формирования кальцинатов в течение 2-4 месяцев и более, высказаны предположения о перенесенной инфекции внутриутробно или за несколько месяцев до настоящего заболевания, которая в том числе имела внутритимическую локализацию и локализацию в оболочках головного мозга. Инфекция, диагностируемая в стационаре, приобрела характер смешанной и генерализованной уже на фоне формирующегося иммунодефицита, нарастающего параллельно инволютивным процессам в вилочковой железе. Диагноз «ИДС» патологоанатомами поставлен не был, хотя регистрировались ими все выше обозначенные маркеры. Посев ткани тимуса на флору не осуществлялся. Таким образом, данный пациент имел 2 больших формализованных критерия (субатрофию, атрофию тимуса с петрификацией и наличие фатальной генерализованной инфекции – сепсиса, что соответствовало определенному ИДС.

## Заключение

В связи с высокой вероятностью развития у детей крайне неблагоприятного исхода тяжело и (или) длительно протекающих инфекционных заболеваний (вплоть до сепсиса) с целью исключения вторичного ИДС показано УЗ-исследование тимуса (сонографию) для выявления его критически низких морфометрических параметров (соответствующим понятию субатрофия, атрофия) и его петрификации.

Считаем необходимым сонографию тимуса включить в декретированный список обследований детей с кратностью 1 раз в 2 года.

Рекомендуем обязательную сонографию тимуса спустя 2-3 месяца от момента выздоровления от тяжелой инфекции (в том числе COVID-19); при резком похудании, химиотерапии, избыточной лучевой нагрузке, тубинтоксикации, длительной гипоксии, тубинфицировании, онкологии и при действии других «запредельных стрессоров». При выявлении критически малых морфометрических параметров тимуса (масса/объем) относительно его нормативных величин для данного возраста, необходимо повторное исследование через 2-3 месяца. При обнаружении отсутствия динамики или прогрессирования субатрофии, атрофии (микротимуса), тем более наличия петрификатов в паренхиме, показано клиническое обследование, включая полный иммунный профиль пациента для исключения ИДС и его причин.

В случае смерти детей от инфекционных заболеваний, аутоиммунных, эндокринных, врожденных аномалий, и других выше обозначенных патологических состояниях, патоморфологу оценивать и описывать состояние тимуса (массу, объем, структуру, оценку степени лимфатизации органа, наличие петрификатов, определение микрофлоры в ткани органа, в том числе методом ПЦР), в том числе петрификаты в других органах – для более точной диагностики ИДС как одной из основной причины смерти. При наличии петрификатов в субатрофичном, атрофичном тимусе для исключения ИДС ретроспективно оценивать присутствие в анамнезе (истории болезни и других сопутствующих медицинских документах) информации о перенесении ранее тяжелых инфекционных заболеваний (в том числе COVID-19), выше представленных неинфекционных заболеваний и данных иммунологического обследования (если такое проводилось).

## Список литературы / References

1. Ваганов П.Д., Мартынов М.И., Михеева И.Г. Гормональные нарушения у детей с синдромом увеличения вилочковой железы и возможная их коррекция // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2000. Т. 45, № 4. С. 32. [Vaganov P.D., Martynov M.I., Mikheeva I.G. Hormonal disorders in children with thymus

enlargement syndrome and their possible correction. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2000, Vol. 45, no. 4, p. 32. (In Russ.)]

2. Ивановская Т.Е., Зайратьянц О.В., Леонова Л.В., Волощук И.Н. Патология тимуса у детей. СПб.: Сотис, 1996. 270 с. [Ivanovskaya T.E., Zairatyants O.V., Leonova L.V., Voloshchuk I.N. Pathology of the thymus in children]. St. Petersburg: Sotis, 1996. 270 p.

3. Иноземцева-Фермин Е.А., Кузьменко Л.Г., Острые инфекционные заболевания у детей с увеличенной вилочковой железой в анамнезе // Педиатрия, 1993. № 5. С. 107-108. [Inozemtseva-Fermin E.A., Kuzmenko L.G., Acute infectious diseases in children with a history of enlarged thymus gland. *Pediatriya = Pediatrics*, 1993, no. 5, pp. 107-108. (In Russ.)]

4. Кельцов В.А. Современные представления о роли эндокринной системы в регуляции иммуногенеза в норме и патологии // Вопросы охраны материнства и детства, 1986. № 7. С. 58-60. [Keltsov V.A. Modern ideas about the role of the endocrine system in the regulation of immunogenesis in health and pathology. *Voprosy okhrany materinstva i detstva = Issues of Maternal and Childhood Protection*, 1986, no. 7, pp. 58-60. (In Russ.)]

5. Козлов В.А. Определяющая роль тимуса в иммунопатогенезе аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 39-58. [Kozlov V.A. The decisive role of the thymus in the immunopathogenesis of autoimmune, oncological and infectious diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 39-58. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-DRO-2591.

6. Косенкова Т.В., Леонова Е.С., Ляликова Г.В. Уровни активации системы комплемента и его компонентов у здоровых детей // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 1990. № 7. С. 104. [Kosenkova T.V., Leonova E.S., Lyalikova G.V. Levels of activation of the complement system and its components in healthy children. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*, 1990, no. 7, p. 104. (In Russ.)]

7. Кузьменко Л.Г. Концептуальный взгляд на генез врожденной тимомегалии // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2012. Т. 91, № 3. С. 37-43. [Kuzmenko L.G. Conceptual view on the genesis of congenital thymomegaly. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*, 2012, Vol. 91, no. 3, pp. 37-43. (In Russ.)]

8. Кузьменко Л.Г., Неижко Л.Ю., Смылова З.В., Быстрова О.В., Эсмурзиева З.И., Вахрушева С.И., Ряхина Н.Н., Нкане Нзола М.М., Уддин М.Д. Оценка массы тимуса у детей разного возраста по данным ультразвукового сканирования // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2014. Т. 93, № 3. С. 56-61. [Kuzmenko L.G., Neizhko L.Yu., Smyslova Z.V., Bystrova O.V., Esmurzieva Z.I., Vakhrusheva S.I., Ryakhina N.N., Nkane Nzola M.M., Uddin M.D. Assessment of thymus mass in children of different ages according to ultrasound scanning data. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*, 2014, Vol. 93, no. 3, pp. 56-61. (In Russ.)]

9. Кузьменко Л.Г., Смылова З.В., Киселева Н.М., Быстрова О.В., Агарвал Р.К. К вопросу о тимусе, связанной с ним терминологии и состоянии здоровья детей с большим тимусом // Здоровье и образование в XXI веке, 2015. Т. 17, № 4. С. 97-107. [Kuzmenko L.G., Smyslova Z.V., Kiseleva N.M., Bystrova O.V., Agarwal R.K. On the issue of the thymus, related terminology and the health status of children with a large thymus L.G. Kuzmenko. *Zdorovye i obrazovanie v XXI veke = Health and Education in the XXI Century*, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 97-107. (In Russ.)]

10. Кузьменко Л.Г., Сименихина К.Н., Неижко Л.Ю., Саркер Л., Вахрушева С.И. Оценка величины вилочковой железы у детей первых двух лет жизни по данным ультразвукового сканирования // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2002. Т. 81, № 6. С. 22-26. [Kuzmenko L.G., Simenikhina K.N., Neizhko L. Yu. Sarker L., Vakhrusheva S.I. Assessment of the size of the thymus gland in children of the first two years of life according to ultrasound scanning. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*, 2002, Vol. 81, no. 6, pp. 22-26. (In Russ.)]

11. Кузьменко Л.Г., Тюрин Н.А., Мазурин М.А. Особенности анамнеза, соматического и невропсихического статуса детей первого года жизни с тимомегалией // Педиатрия, 1985. Т. 64, № 2. С. 26-29. [Kuzmenko L.G., Tyurin N.A., Mazurina M.A. Features of the anamnesis, somatic and neuropsychic status of children of the first year of life with thymomegaly. *Pediatriya = Pediatrics*, 1985, Vol. 64, no. 2, pp. 26-29. (In Russ.)]

12. Матковская Т.В. К патогенезу тимомегалии у детей // Проблемы эндокринологии, 1988. Т. 34, № 2. С. 34-38. [Matkovskaya T.V. On the pathogenesis of thymomegaly in children. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 1988, Vol. 34, no. 2, pp. 34-38. (In Russ.)]

13. Постовалова Е.А., Макарова О.В., Косырева А.М., Михайлова Л.П. Морфология тимуса и особенности его клеточного состава при экспериментальном остром и хроническом язвенном колите // Архив патологии, 2019. Т. 81, № 5. С. 53-63. [Postovalova E.A., Makarova O.V., Kosyreva A.M., Mikhailova L.P. Morphology of the thymus and features of its cellular composition in experimental acute and chronic ulcerative colitis. *Arkhiv patologii = Archives of Pathology*, 2019, Vol. 81, no. 5, pp. 53-63. (In Russ.)]

14. Прилуцкая В.А. Функциональное состояние гипофизарно-тиреоидной системы у детей раннего возраста с синдромом тимомегалии. Минск, 2001. С. 256-260. [Prilutskaya V.A. Functional state of the pituitary-thyroid system in young children with thymomegaly syndrome]. Minsk, 2001, pp. 256-260.

15. Ровда Ю.И., Миняйлова Н.Н., Ведерникова А.В., Шабалдин А.В., Халивопуло И.К., Зинчук С.Ф., Шмакова О.В., Лобыкина А.А. Эволюционные аспекты тимологии в педиатрической практике // Медицин-

ская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 59-68. [Rovda Yu.I., Minyailova N.N., Vedernikova A.V., Shabaldin A.V., Khalivopulo I.K., Zinchuk S.F., Shmakova O.V., Lobykina A.A. Evolutionary aspects of thymology in pediatric practice. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 59-68. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-ЕАО-2544.

16. Харченко В.П., Саркисов Д.С., Ветшев П.С., Галил-Оглы Г.А., Заратьянц О.В. Болезни вилочковой железы. М.: Триада-Х, 1998. 232 с. [Kharchenko V.P., Sarkisov D.S., Vetshev P.S., Galil-Ogly G.A., Zaratyants O.V. Diseases of the thymus gland]. Moscow: Triada-X, 1998. 232 p.

17. Хлыстова З.С., Калинина И.И., Шмелева С.П. Время появления эндокринной и лимфоцитопоэтической функции тимуса человека в эмбриогенезе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2000. Т. 130, № 10. С. 453-457. [Khlystova Z.S., Kalinina I.I., Shmeleva S.P. Time of appearance of the endocrine and lymphocytopoietic function of the human thymus in embryogenesis. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2000, Vol. 130, no. 10, pp. 453-457. (In Russ.)]

18. Эсмурзиева З.И., Кузьменко Л.Г., Осадчая О.А., Каск Л.Н. Морфометрия тимуса плодов различного гестационного возраста и доношенных новорожденных детей по данным ультразвукового исследования // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2015. Т. 94, № 1. С. 68-72. [Esmurzieva Z.I., Kuzmenko L.G., Osadchaya O.A., Kask L.N. Morphometry of the thymus of fetuses of different gestational ages and full-term newborns according to ultrasound data. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*, 2015, Vol. 94, no. 1, pp. 68-72. (In Russ.)]

19. Getts D.R., Chastain E.M., Terry R.L., Miller S.D. Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity. *Immunol. Rev.*, 2013, Vol. 255, no. 1, pp. 197-209.

20. Hofmann W.J., Möller P., Otto H.F. Thymic hyperplasia. I. True thymic hyperplasia. Review of the literature. *Klin. Wochenschr.*, 1987, Vol. 65, no. 2, pp. 49-52.

21. Lins M.P., Smaniotta S. Potential impact of SARS-CoV-2 infection on the thymus. *Can. J. Microbiol.*, 2021, Vol. 67, no. 1, pp. 23-28.

22. Mucci J., Hidalgo A., Mocetti E., Argibay P.F., Leguizamón M.S., Campetella O. Thymocyte depletion in Trypanosomacruzi infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cell complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, pp. 3896-3901.

23. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.*, 2006, Vol. 2, no. 6, e62. doi: 10.1371/journal.ppat.0020062.

24. Salle V. Coronavirus-induced autoimmunity. *Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 226, 108694. doi: 10.1016/j.clim.2021.108694.

25. Wang K., Chen W., Zhang Z., Deng Y., Lian J.Q., Du P., Wei D., Zhang Y., Sun X.-X., Gong L., Yang X., He L., Zhang L., Yang Z., Geng J.-J., Chen R., Zhang H., Wang B., Zhu Y.-M., Nan G., Jiang J.-L., Li L., Wu J., Lin P., Huang W., Xie L., Zheng Z.-H., Zhang K., Miao J.-L., Cui H.-Y., Huang M., Zhang J., Fu L., Yang X.-M., Zhao Z., Sun S., Gu H., Wang Z., Wang C.-F., Lu Y., Liu Y.-Y., Wang Q.-Y., Bian H., Zhu P., Chen Z.-N. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2020, Vol. 5, no. 1, 283. doi: 10.1038/s41392-020-00426-x.

---

**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.** — ассистент 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

**Authors:**

**Rovda Yu.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Vedernikova A.V.**, Assistant Professor, 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 Researcher, Laboratory of Heart Diseases, Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Халивопуло И.К.** — к.м.н., кардиохирург, заведующий отделением кардиохирургии № 2 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 ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

**Миняйлова Н.Н.** — д.м.н., профессор кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Шмакова О.В.** — к.м.н., заведующая кафедрой педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Отставнов Г.А.** — врач-педиатр педиатрического отделения АО Клиническая медико-санитарная часть «Энергетик», г. Кемерово, Россия

**Вакулова Т.М.** — ассистент кафедры поликлинической педиатрии, пропедевтики детских болезней и последипломной подготовки ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Бухтоярова О.С.** — врач ультразвуковой диагностики АО Клиническая медико-санитарная часть «Энергетик», г. Кемерово, Россия

**Краснова Н.В.** — к.м.н., врач ультразвуковой диагностики АО Клиническая медико-санитарная часть «Энергетик», г. Кемерово, Россия

**Анчикова Т.А.** — генеральный директор, главный врач АО Клиническая медико-санитарная часть «Энергетик», г. Кемерово, Россия

**Мухамадияров Р.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Дадонов В.В.** — студент педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Катанакхова М.В.** — лаборант лаборатории цитогенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

**Торгунакова А.В.** — ведущий инженер-технолог лаборатории цитогенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук»; инженер кафедры генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

**Khalivopulo I.K.**, PhD (Medicine), Chief Regional Specialist Cardiovascular Surgeon, Head, Department of Cardiac Surgery No. 2, Cardiovascular Surgeon, Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Filipenko M.L.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Head, Pharmacogenomics Group, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

**Minyailova N.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Shmakova O.V.**, PhD (Medicine), Head, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Otstavnov G.A.**, Pediatrician, Pediatric Department, JSC Clinical Medical and Sanitary Unit "Energetik", Kemerovo, Russian Federation

**Vakulova T.M.**, Assistant Professor, Department of Outpatient Pediatrics, Propaedeutics of Childhood Diseases and Postgraduate Training, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Bukhtoyarova O.S.**, Ultrasound Diagnostics Doctor, JSC Clinical Medical and Sanitary Unit "Energetik", Kemerovo, Russian Federation

**Krasnova N.V.**, PhD (Medicine), Ultrasound Diagnostics Doctor, JSC Clinical Medical and Sanitary Unit "Energetik", Kemerovo, Russian Federation

**Anchikova T.A.**, General Director, Chief Physician, JSC Clinical Medical and Sanitary Unit "Energetik", Kemerovo, Russian Federation

**Mukhamadiyarov R.A.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Dadonov V.V.**, Student, Pediatric Faculty, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

**Katanakhova M.V.**, Laboratory Assistant, Cytogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center for Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

**Torgunakova A.V.**, Leading Engineer-Technologist, Cytogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center for Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Engineer-Technologist, Department of Genetics and Fundamental Medicine, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

## ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ КИНАЗЫ mTOR В CD4<sup>+</sup>T-ЛИМФОЦИТАХ ПРИ АУТОИММУННОМ ТИРЕОИДИТЕ

Бурцева А.В.<sup>1</sup>, Тихонова А.Н.<sup>1</sup>, Афанасьева З.А.<sup>2</sup>, Абрамова З.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

<sup>2</sup> Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

**Резюме.** В настоящее время при изучении аутоиммунных процессов стали обращать внимание на специфические процессы, в которых участвуют митохондрии: это нарушение внутриклеточной передачи сигналов, включая генерацию активированных кислородных метаболитов и выход из митохондрий в цитоплазму белков, активирующих процесс апоптоза. Эти функции митохондрий, как правило, связаны с нарушением их биоэнергетических функций и избыточной продукцией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В настоящее время активно развивается новое направление – участие митохондрий в иммунном ответе. Поэтому целью данного исследования было изучение динамики факторов апоптоза и аутофагии, связанных с митохондриями CD4<sup>+</sup>T-клеток при аутоиммунном тиреоидите. Работа выполнена на CD4<sup>+</sup>T-клетках, полученных от пациентов с АИТ и здоровых доноров методом магнитной сепарации. Для оценки программируемой клеточной гибели I и II типа использовали метод проточной цитометрии. Для анализа белков-маркеров аутофагии – p62, LC3I/II, киназы mTOR и регулятора апоптоза Bcl-2 в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах пациентов и здоровых доноров использовали вестерн-блоттинг. Состояние митохондрий в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах оценивали методом конфокальной микроскопии. На экспериментальной модели в условиях возрастания перекиси H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> мы показали, что АФК активируют LC3-белок в клетках пациентов с АИТ и накапливается аутофагический белок-адаптер p62, который регистрируется на внешней митохондриальной мембране. Установлен повышенный уровень митофагосом в CD4<sup>+</sup>T-клетках пациентов с АИТ. На основе полученных данных можно предположить, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывает активацию митофагии в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах пациентов с АИТ, а развитие ОС при избыточной продукции АФК приводит к необратимым повреждениям митохондрий, которые приводят к снижению апоптотической активности и, как следствие, развитию вторичного некроза CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов при АИТ, делая их цитотоксическими. Накопление таких клеток в ткани ЩЖ может приводить к нарушению апоптоза в тироцитах и, как следствие, ко вторичному некрозу. Результат – развитие аутоиммунного ответа. Полученные данные требуют дополнительных исследований, т. к. выявление в крови пациентов с АИТ CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, склонных к апоптозу или к некрозу, может использоваться как диагностический критерий прогноза воспалительного процесса.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, mTOR, CD4<sup>+</sup>T-лимфоцит, митофагия, аутоиммунном тиреоидит

### Адрес для переписки:

Абрамова Зинаида Ивановна  
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
420008, Россия, Республика Татарстан,  
г. Казань, ул. Кремлевская, 18, каб. 104.  
Тел.: 8 (960) 040-43-47.  
E-mail: ziabramova@mail.ru

### Address for correspondence:

Zinaida I. Abramova  
Kazan (Volga Region) Federal University  
18 Kremlevskaya St, Room 104  
Kazan, Republic of Tatarstan  
420008 Russian Federation  
Phone: +7 (960) 040-43-47.  
E-mail: ziabramova@mail.ru

### Образец цитирования:

А.В. Бурцева, А.Н. Тихонова, З.А. Афанасьева, З.И. Абрамова «Влияние окислительного стресса на активность киназы mTOR в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах при аутоиммунном тиреоидите» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 4. С. 847-862.  
doi: 10.15789/1563-0625-IOO-3141

© Бурцева А.В. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

A.V. Burtseva, A.N. Tikhonova, Z.A. Afanasyeva, Z.I. Abramova “Influence of oxidative stress on the activity of mTOR kinase in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in autoimmune thyroiditis”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 4, pp. 847-862.  
doi: 10.15789/1563-0625-IOO-3141

© Burtseva A.V. et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-IOO-3141

## INFLUENCE OF OXIDATIVE STRESS ON THE ACTIVITY OF mTOR KINASE IN CD4<sup>+</sup>T LYMPHOCYTES IN AUTOIMMUNE THYROIDITIS

Burtseva A.V.<sup>a</sup>, Tikhonova A.N.<sup>a</sup>, Afanasyeva Z.A.<sup>b</sup>, Abramova Z.I.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

<sup>b</sup> Kazan State Medical Academy, Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

**Abstract.** Current studies of autoimmunity processes are addressing specific processes involving mitochondria, i.e., altered intracellular signaling including the generation of ROS and release of proteins from mitochondria to the cytoplasm, thus activating apoptosis. These functions of mitochondria are usually associated with disturbed bioenergetic functions and excessive production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Currently, a new area is actively developing, i.e., potential participation of mitochondria in the immune response. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the dynamics of apoptosis factors and autophagy associated with mitochondria of CD4<sup>+</sup>T cells in autoimmune thyroiditis (AIT). The study was performed with CD4<sup>+</sup>T cells of AIT patients and healthy donors obtained by magnetic separation. Apoptosis and autophagy were assessed by flow cytometry. Western blotting was used to analyze autophagy marker proteins (p62, LC3I/II, mTOR kinase), and apoptosis regulator Bcl-2 in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes of the patients and donors. The state of mitochondria in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes was assessed by confocal microscopy. Using an experimental model with increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, we showed that ROS activate LC3 protein in cells of patients with AIT along with accumulation of autophagic adapter protein p62, as registered on the outer mitochondrial membrane. An increased level of mitophagosomes was found in CD4<sup>+</sup>T cells from the AIT patients. On the basis of these data, one may assume that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causes activation of mitophagy in CD4<sup>+</sup>T cells of patients with AIT, and the development of oxidative stress with excessive production of ROS leads to irreversible damage to mitochondria, which causes a decreased apoptotic activity followed by development of secondary necrosis of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in AIT, making them cytotoxic. Accumulation of such cells in the thyroid tissue may lead to impaired apoptosis in thyrocytes and, as a consequence, to secondary necrosis, thus resulting in development of autoimmune response. The obtained data require additional studies, since the detection of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes prone for apoptosis or necrosis in patients with AIT may be used as a diagnostic criterion for prediction of inflammatory conditions.

*Keywords:* oxidative stress, mTOR, CD4<sup>+</sup>T lymphocyte, mitophagy, autoimmune thyroiditis

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00443).

### Введение

В 1912 году японский хирург Х. Хашимото описал аутоиммунный тиреоидит (АИТ), и, несмотря на более чем 100-летнюю историю изучения фундаментальных закономерностей развития аутоиммунных патологий, проблема остается актуальной. По статистике ежегодная заболеваемость болезнью Хашимото составляет около 2%. Поэтому важно создавать системы прогнозирования данных расстройств в семьях и популяции в целом, их предотвращения, раннего выявления и эффективной коррекции. По мнению автора [14], «требуется использование новых достижений в иммунологии, молекулярной генетике и клеточной биологии. Принимая во внимание современную концепцию «сигнального заболевания» в составе мультиорганного аутоиммунного синдрома ... следует использовать аутоим-

мунные заболевания щитовидной железы (АИЗ ЩЖ), в первую очередь АИТ, для расширенного диагностического поиска новых патологических состояний — компонентов синдрома».

Итак, заболевания ЩЖ, включая аутоиммунные заболевания, нарушения функции ЩЖ и новообразования, остаются серьезной социальной проблемой с быстро растущей распространенностью заболевания среди населения, что связывают с окислительным стрессом (ОС) [29]. Установлено, что активные формы кислорода (АФК) являются основным проявлением ОС в биологических системах, и их продукция может преодолеть антиоксидантную защиту, в конечном итоге приводя к повреждению клеток, апоптозу и смерти [13]. Данные клинических исследований указывают на то, что баланс между окислителями и антиоксидантами смещен в сторону окислительной активности у пациентов с АИТ, что позволило считать ОС ключевым событием в патофизиологии заболевания, независимо от функции ЩЖ. Исследования на моделях животных (мыши

NOD.H2h4) подтверждают, что накопление АФК в ЩЖ играет роль как в иницировании, так и прогрессировании заболевания [19].

Дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами наблюдается на разных стадиях и при разных типах заболевания. ЩЖ, как часть эндокринной системы, использует свободные радикалы (АФК) для выработки гормонов. Клетки ЩЖ выделяют ферменты, катализирующие генерацию АФК. Нарушения баланса производства и разрушения АФК приводят к накоплению в клетке молекул с высоким окислительным потенциалом. Вследствие высокой реакционной способности АФК могут окислять и повреждать различные компоненты клетки, что является причиной развития ОС [43].

В патогенезе АИТ рассматривают несколько возможных механизмов, но наибольшее значение отводится клеточному звену иммунитета [11, 19, 39]. Например, из-за генетически обусловленного дефекта избыточно стимулированные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты начинают принимать клетки ЩЖ за патогены, атакуют и разрушают их путем апоптоза. В свою очередь, в норме H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> выступает эффективным индуктором апоптоза, позволяющим выявить и элиминировать популяцию клеток с ослабленным антиоксидантным потенциалом и клеток, предрасположенных к генетическим повреждениям, относительно безвредным для организма. По мнению авторов [47], для иммунной системы важно распознавание и ответ на сигналы опасности, образующиеся в результате повреждения клеток, а не выяснение различий между «своим и чужим», поэтому особое внимание стали уделять исследованиям эндогенных механизмов антиоксидантной защиты, в числе которых рассматривается аутофагия [23].

Аутофагия – основа негативной селекции аутореактивных Т-клеток. В работе Walsh С.М., Edinger А.Л. (2010) показано, что блокирование гена аутофагии Atg5 приводило к аутоиммунному CD4<sup>+</sup>T-клеточному пролиферативному заболеванию мышей [52] и накоплению апоптотических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>T-клеток. В другой работе [38] было показано, что дефицит аутофагии в Т-клетках периферической крови вызывал ускоренную клеточную смерть наивных, но не Т-клеток памяти, что связывали с продукцией супероксидных анионов при активации наивных Т-клеток. Процесс аутофагии включает захват субстратов в аутофагосомы, которые впоследствии доставляются в лизосомы для ферментативного расщепления и переработки метаболитических предшественников. В норме АФК активируют аутофагию, которая облегчает клеточную адаптацию и уменьшает окислительное повреждение за счет деградации и переработки внутриклеточных поврежденных макромолекул и дисфункциональных органелл [34]. Т. е. важной функцией аутофагии яв-

ляется изоляция поврежденных митохондрий (мтХ), генерирующих супероксидные анионы, как источник стресса и повреждения вплоть до апоптоза самой клетки [2]. С другой стороны, удаление поврежденных мтХ с помощью митофагии исключительно важно для защиты клеток от ОС и нарушений метаболизма [3].

Вопрос о соотношении основных механизмов клеточной смерти при изучении аутоиммунной патологии до настоящего времени остается актуальным и полностью не изученным. Поэтому **целью данного исследования** был анализ влияния ОС на аутофагию CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов больных АИТ.

## Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты периферической крови здоровых доноров и пациентов с АИТ. В группу пациентов с АИТ входили 10 человек (женщины, средний возраст 25±4 года). Контрольную группу составили 11 условно здоровых доноров: (женщины средний возраст 23,5±3,5 года). Критерий исключения – жалобы и объективные признаки острых заболеваний, хронические заболевания в фазе обострения, данные о ревматологических и аутоиммунных заболеваниях в семейном анамнезе. Представленные материалы получены при информированном согласии пациентов на участие. При проведении научных биомедицинских исследований пользовались признанным этическим стандартом – Хельсинкской декларацией Международной медицинской ассоциации 1996 года, пересмотренной в 2013 г. Диагноз АИТ устанавливали на основании результатов ультразвукографии и наличия в сыворотке крови антител к тиреоидной пероксидазе и к тиреоглобулину.

Выделение CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты проводили в 2 этапа. На первом этапе в фалькон вносили 6 мл раствора фиколл-урогафина (ρ = 1,077) и наслаивали 9 мл крови, разведенной в PBS в соотношении 1:1. Центрифугировали в течение 35 мин при 400 g (Eppendorf, 5810R). Лимфоциты собирали по всей площади сечения пробирки, переносили в центрифужную пробирку и разбавляли PBS-буфером в соотношении 1:2, центрифугировали 10 минут при 18 °С 400 g (Eppendorf, 5810R). Процедуру повторяли 2 раза. Осадок клеток разбавляли в 5 мл MojoSort Buffer (BioLegend, США). Подсчет клеток проводили в камере Горяева, используя 0,1%-ный раствор трипанового синего.

Для выделения популяции CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов использовали магнитный штатив DynaMag Invitrogen, США. После промывки клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера MojoSort™. Добавляли 10 мкл биотин-антител, перемешивали и инкубировали на ледяной бане при 4 °С в течение 15 мин. Далее добавляли 10 мкл наногра-

нул стрептавидин-конъюгата, перемешивали и так же выдерживали на ледяной бане в течение 15 мин. После инкубации образцы разбавили в 2,5 мл MojoSort™ и ставили на магнитный штатив. Через 5 мин собрали образец с клетками и повторили магнитную сепарацию.

Для определения влияния ОС выделенные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты инкубировали в течение 24 ч в растворе пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в концентрации от 0 до 40 мкМ в RPMI-1640 с добавлением 10% FBS.

Уровни АФК, аутофагии и апоптоза CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов оценивали на проточном цитометре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Для анализа АФК в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах использовали 6-Карбокси-H2DCFDA, который начинает флуоресцировать после отщепления ацетильных групп клеточными эстеразами и окисления его АФК внутри клетки. Клетки отмывали дважды холодным PBS, добавили краситель в концентрации 5 мкМ. Инкубировали 30 мин в темноте при 37 °С. Образцы анализировали на первом FL1 детекторе цитометра в течение 20 мин с применением программного обеспечения CellQuest (Becton Dickinson, США). На каждый вариант опыта просчитывали не менее 10 000 клеток. Мертвые клетки исключали на основании параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. С помощью программного обеспечения FlowJo подсчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

Для количественного определения аутофагосом в циркулирующих клетках периферической крови применяли набор для детекции аутофагии (Cyto-ID® Autophagy Detection Kit (Enzo Life Sciences, PA, США), содержащий индикаторный краситель Cyto-ID, конъюгированный с флуорохромом FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианат). Этот катионный амфифильный зонд специфически распознает аутофагические вакуоли на всех стадиях аутофагии: преаутофагосомы → аутофагосомы → аутофаголизосомы. Пробоподготовку анализируемых образцов осуществляли в соответствии с инструкциями поставляемых наборов. После обработки образцы анализировали в зеленом (FL1) канале. Количество активных аутофагосом оценивали по средней интенсивности флуоресценции (MFI, mean fluorescence intensity) красителя Cyto-ID.

Уровень апоптоза в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах анализировали по количеству аннексина V с помощью коммерческого набора для проточной цитометрии Annexin V-AF 488 (Lumiprobe, Россия). Для каждого анализа было использовано 500 000 клеток. Клетки промывали один раз охлажденным PBS и один раз аннексин V-связывающим буфером, после чего ресуспендировали в 100 мкл аннексин V-связывающего буфера. Затем клетки инкубировали с аннексином V-AF 488 10 мин

и пропидий йодидом (PI) в течение 5 мин при комнатной температуре (25 °С) в темноте. Без предварительной отмывки добавили 400 мкл аннексин V-связывающего буфера. Образцы анализировали на первом FL1 и втором FL2 детекторах цитометра. После с помощью программного обеспечения FlowJo подсчитывали процент популяции клеток, находящихся на стадии раннего и позднего апоптоза.

Для анализа белков-маркеров аутофагии – p62, LC3I/II, киназы mTOR и регулятора апоптоза Bcl-2 в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах пациентов и здоровых доноров использовали вестерн-блоттинг. Для получения лизата к клеточному осадку (1 × 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов) добавляли 50 мкл RIPA-буфера с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (Thermo Scientific, США). Концентрацию белка в образцах определяли, используя набор BCA Protein Assay (Thermo Scientific, США). Перед нанесением на гель в образцы добавляли раствор бромфенолового синего (0,1%). Аликвоты, равные по количеству белка, разделяли в 4-12%-ном градиенте SDS-ПААГ-геля и анализировали вестерн-блоттированием. Для этого по окончании электрофореза PVDF-мембрану активировали, собирали сэндвич по схеме: спонж – мембрана-гель – спонж. Помещали сэндвич в кассету трансфер-системы на 2 часа при напряжении 100 V и температуре +4 °С. Загрузку и перенос равных количеств белка подтверждали окрашиванием мембраны Ponceau S. В качестве вторичных антител использовали антимышьи или антикроличьи IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Life Technologies, Индия). После промывки блоты визуализировали с применением ECL-набора на основе хемилюминесцентного субстрата (Bio-Rad, Китай) и детектировали хемилюминесценцию заданных белков с помощью системы гель-документирования BIORAD ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Китай). Для учета вариативности при загрузке проб осуществлялась нормализация с помощью антител к β-актину (Life Technologies, Индия).

Для оценки аутофагического клиренса мТХ свежeweделенные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты инкубировали в течение 18 часов с 10 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS. Клетки промывали дважды в PBS, окрашивали мТХ и аутофагосомы с использованием красителей MitoTracker® Red CM-H2Xros (Invitrogen, США) и CYTO-ID® Green Detection Reagent (Enzo Life Sciences, США) соответственно. Для этого осадок клеток разводили в 100 мкл PBS, добавляли к суспензии клеток MitoTracker® в конечной концентрации 200 нМ и 0,1 мкл Green Detection Reagent и инкубировали 30 мин при 37 °С.

Для окрашивания нуклеиновых кислот использовали синий флуоресцентный краситель DAPI, разводили до 1 мкг/мл в PBS. Добавляли

разбавленный краситель к суспензии клеток и инкубировали при комнатной температуре 5 мин, затем клетки промывали в PBS и анализировали на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 980.

Достоверность полученных результатов определяли с помощью анализа ANOVA. Обработка изображений электрофоретических блотов проводилась с помощью программного обеспечения ImageLab. Анализ изображений, полученных методом конфокальной микроскопии, осуществляли с помощью пакета программ Fiji. Для анализа данных цитометрии использовали программу FlowJo.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Результаты выражены как среднее значение величины  $\pm$  стандартное отклонение. Данные обрабатывали с использованием однофакторного дисперсионного анализа и последующего попарного сравнения с поправкой на множественность Бонферрони (\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,005$ , \*\*\* –  $p < 0,0005$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ ). Нормальность распределения количественной переменной и гомогенность дисперсий у нескольких распределений определяли с помощью тестов Шапиро–Уилка и Бартлетта соответственно.

## Результаты

Аутофагию рассматривают как вторичную защиту от ОС благодаря ее способности облегчать обмен поврежденных субстратов, которые могут накапливаться во время этого процесса. Поэтому одной из первых задач экспериментального исследования явилась оценка уровня внутриклеточной продукции апоптоз-положительных клеток (аннексин V-положительные частицы) и АФК при действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Добавление в культуральную среду H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в различных конечных концентрациях является одним из распространенных способов моделирования ОС *in vitro* [1], т. к. показана регуляторная роль АФК в процессе жизнедеятельности клеток: АФК постоянно образуются в клетках и тканях в низких, но измеримых концентрациях [48], таким образом, применение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в качестве модулирующего стресс-агента основано на ее способности образовываться в клетке в физиологических условиях.

По данным Roth S., Dröge W., в физиологическом диапазоне концентраций (от 1 нМ до 0,1–0,5 мкМ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> действует как сигнальная молекула, стимулируя миграцию и пролиферацию клеток, не вызывает заметных повреждений клетки, например при добавлении к смешанной культуре лимфоцитов 10 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> наблюдался значительный рост включения H3-тимидина, маркера пролиферативной активности клеток. Повышении концентрации до 1–10 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

вызывает остановку деления, которое обычно восстанавливается и даже ускоряется в случае успешной адаптации к ОС. Сигнальная функция H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> косвенно подтверждается тем, что в больших концентрациях (10–500 мкМ) и экзогенная, и внутриклеточная H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывают ОС: в клетках активируются механизмы антиоксидантной защиты и репарации поврежденных белков и липидов. Если они не справляются, наступают необратимые повреждения, например при 500 мкМ и более внеклеточной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> адаптация не срабатывает, клетка уходит в апоптоз [50]. Однако следует отметить, что границы этих реакций относительно и сильно зависят от типа клеток, условий культивирования и неоднородного распределения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетке. По данным работы Часовских Н.Ю. и соавт. [18], в клетках мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров инициировали ОС добавлением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в конечной концентрации 10, 50, 100 и 500 мкМ. При этом оптимальной для моделирования ОС *in vitro* считалась концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, при которой внутриклеточный уровень АФК, превышая контрольные значения и вызывая интенсификацию процесса апоптоза, не приводил к возрастанию числа некротизированных клеток в культуре.

Поэтому для моделирования ОС в культуральную среду добавляли H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и определяли реакцию CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов на повышение концентрации индуктора (10, 20, 30, 40 мкМ) в клетках здоровых доноров и пациентов с АИТ. Следует отметить, что выбранные концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> являются часто используемыми для индукции экспрессии ОС при изучении его влияния на внутриклеточные процессы [6].

Используя краситель 6-Карбокси-H2DCFDA, который начинает флуоресцировать под воздействием образующихся АФК внутри клетки (рис. 1А, см. 2-ю стр. обложки), мы установили, что инкубация CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов здоровых доноров с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в диапазоне от 10 до 40 мкМ приводила к увеличению уровня АФК-положительных клеток по сравнению с интактными клетками. Однако в группе с АИТ относительное количество АФК-положительных клеток было достоверно ниже ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе здоровых доноров, и это отличие увеличивалось при повышении концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). Полученные данные могут служить признаком развития ОС.

Кроме ОС, фундаментальным механизмом регуляции клеточного гомеостаза является апоптоз. Апоптоз – это процесс физиологической гибели клеток без воспалительного и иммунного ответа организма [26]. В норме формирование иммунной системы и созревание антиген-специфических Т- и В-лимфоцитов сопровождается массовым апоптозом клеток. Элиминация апоптотических клеток в основном происходит на

«ранних» этапах апоптоза (частицы, положительные только по аннексину V), когда экспрессия фосфатидилсерина на внешней мембране сигнализирует об «измененном своем» [36]. Ранние этапы апоптоза обратимы, а их продление обеспечивает фагоцитоз апоптотических клеток и формирование толерантности иммунной системы [54].

Как следует из рисунка 2 (см. 2-ю стр. обложки), CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты пациентов с АИТ (рис. 2Б, см. 2-ю стр. обложки) были менее чувствительны к апоптозу, индуцированному H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, чем клетки здоровых доноров.

Уровень апоптотической активности (количество аннексин V-положительных клеток на ранней и поздней стадиях апоптоза в свежeweыделенных лимфоцитах (0 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) здоровых доноров (рис. 2А, см. 2-ю стр. обложки) был выше по сравнению с образцами пациентов с АИТ (рис. 2Б, см. 2-ю стр. обложки). Это различие достоверно возрастало при культивировании клеток в присутствии экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> как на ранней стадии, так и на позднем этапе апоптоза (рис. 2В, см. 2-ю стр. обложки). Среднее значение апоптотической активности в свежeweыделенных клетках пациентов с АИТ было достоверно ниже контроля в среднем в 1,2 раза. Под влиянием возрастающей концентрации экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в Т-лимфоцитах пациентов с АИТ доля апоптотирующихся клеток снижалась в среднем в 1,4 раза при 10 мкМ, 1,8 раза при 20 мкМ и 1,3 раза при 40 мкМ.

Эффект ОС зависит от силы и формы его выраженности, в частности клетки при небольших нарушениях могут вернуться в исходное состояние, а более выраженный ОС приводит к возникновению в клетке необратимых нарушений, и, в зависимости от его силы, клетки могут погибнуть либо некрозом, либо, включив механизмы ПКГ, апоптозом и аутофагией [15]. Как следует из полученных нами данных, инкубация клеток при низких концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (до 10 мкМ) приводила к достоверному росту доли FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> клеток (рис. 2А, Б, см. 2-ю стр. обложки). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в концентрации 20 мкМ способствовала увеличению доли FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> клеток здоровых доноров и пациентов с АИТ до 34,7% и 16,1% соответственно, доля FITC<sup>-</sup>PI<sup>+</sup> в среднем составляла примерно 2% (рис. 2А, Б, см. 2-ю стр. обложки). При повышении концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до 40 мкМ доля FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>Т-лимфоцитов здоровых доноров составляла 56,5%, доля FITC<sup>-</sup>PI<sup>+</sup> – 0,86%.

В образцах пациентов с АИТ доля FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> снижалась до 44,1%, а доля некротических (FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>) клеток возрастала до 6,13% по сравнению с образцами контроля, что может свидетельствовать о нарушении реализации апоптоза: снижение апоптотической активности может быть связано со стимуляцией в цитоплазме митохондриальной аутофагии, которая развивается при некрозе клеток.

Ранее в исследованиях Уразова О.А. и соавт. [16] также было показано, что содержание FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> клеток у больных аутоиммунными тиреопатиями было ниже нормы: при АИТ в фазу эутиреоза в 1,9 раза, в фазу гипотиреоза – в 2,4 раза, ДТЗ – в 4,6 раза. Таким образом, полученные нами данные соответствуют клиническому диагнозу пациентов – АИТ в фазе эутиреоза, при котором иммунная система человека начинает разрушать структуру ЩЖ, уничтожая клетки.

Т. к. АФК являются эффективными индукторами аутофагии [8, 23] для оценки аутофагической активности под действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, мы определяли количество аутофагосом в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах методом проточной цитометрии. Для этого использовали флуоресцентный краситель Cyto-ID, конъюгированный с флуорохромом FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианат), который селективно связывается с аутофагосомами (рис. 3А, см. 3-ю стр. обложки).

В результате обнаружили, что в свежeweыделенных CD4<sup>+</sup>Т-клетках пациентов с АИТ содержание аутофагосом достоверно выше по сравнению с контрольными образцами доноров (рис. 3Б, см. 3-ю стр. обложки). С увеличением концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> аутофагическая активность в условиях развития ОС понижалась как в Т-клетках здоровых доноров, так и пациентов с АИТ, но повышенное количество аутофагосом в клетках пациентов с АИТ сохранялось (рис. 3Б, см. 3-ю стр. обложки). Из полученных результатов следует, что у пациентов с АИТ в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах наблюдается как снижение чувствительности к апоптозу (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки), так и снижение активности аутофагии, которая сопровождается повышением количества аутофагосом в клетках (рис. 3Б, см. 3-ю стр. обложки) по сравнению с образцами контроля.

Как известно в норме конечным этапом аутофагии является слияние аутофагосомы с лизосомой с образованием аутофаголизосомы, которое приводит к деградации аутофагосомы вместе с грузом ферментами лизосом. Установленное нами повышенное содержание аутофагосом при АИТ может указывать на незавершенность процесса аутофагии в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах пациентов с АИТ (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки) в стрессовых условиях.

Между аутофагией и апоптозом существует тесная взаимосвязь: оба процесса индуцируются АФК. В ответ на ОС аутофагия активируется, чтобы защитить клетки от апоптоза, тогда как ингибирование аутофагии приводит к накоплению повреждений, вызванных ОС, и гибели клеток [8], поэтому на следующем этапе мы оценили влияние ОС в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах на взаимосвязь апоптоза и аутофагии при АИТ. Учитывая, что в условиях ОС в клетке происходят нарушения структурных и функциональных элементов,

которые влияют на общий цитотоксический эффект АФК, мы провели анализ белков-маркеров аутофагии: p62, LC3I/II, белка-регулятора аутофагии mTOR и белка-регулятора апоптоза Bcl-2 при развитии ОС на фоне увеличения количества H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ) (рис. 4).

Как следует из рисунка 4, при увеличении концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на фоне низкого уровня mTOR в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах пациентов с АИТ экспрессируются цитоплазматический белок LC3-I, его липидированная форма LC3-II. Уровень белка-регулятора аутофагии p62 возрастает, а ингибитора апоптоза Bcl-2 снижается по отношению к образцам контроля.

При оценке результатов вестерн-блоттинга показали (рис. 5), что в свежeweделенных CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах здоровых доноров (0 мкМ экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) содержание антиаутофагической киназы mTOR (рис. 5А, а) достоверно выше по сравнению с образцами пациентов с АИТ (рис. 5А, б), что может говорить о базальном/репаративном уровне аутофагии в здоровых клетках, которая необходима для поддержания нормальных физиологических условий их функционирования. С увеличением концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах здоровых доноров уровень киназы снижается в ответ на ОС, что говорит об активации аутофагии, а в Т-лимфоцитах пациентов с АИТ не изменяется (рис. 5А, а).

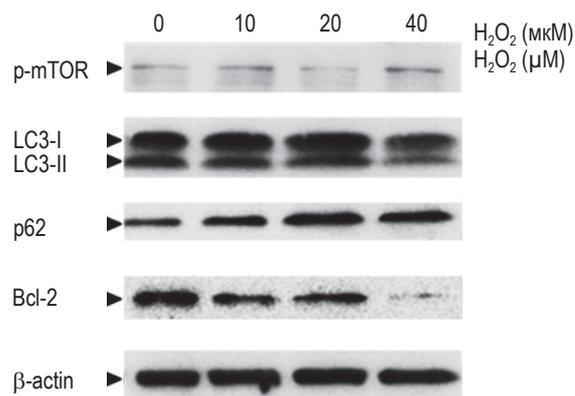
Баланс между аутофагией и апоптозом поддерживается системой взаимодействий между сигнальными путями, в которых задействованы как ключевые белки аутофагии, так и апоптоза [27]. Одним из общих регуляторов этого взаимодействия является белок Bcl-2. Этот белок относится к белкам-ингибиторам посткаспазного каскада, которые регулируют митохондриальный путь апоптоза. В клетках белок Bcl-2 связан с внешней митохондриальной мембраной и контролирует каналы транспорта цитохрома с и протеазы АИФ. Таким образом, белок, закрывая эти каналы, защищает клетку от спонтанного апоптоза [12, 51].

Изучение особенностей экспрессии Bcl-2 в интактных CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах здоровых доноров показало крайне низкую интенсивность экспрессии этого белка (рис. 5Б, а), что можно связать с устойчивостью зрелых CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов к апоптозу, при нормальных физиологических условиях функционирования [22]. В свежeweделенных клетках пациентов с АИТ определили достоверно высокий по сравнению с контролем уровень экспрессии Bcl-2 (рис. 5Б, б). Таким образом, установленное (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки) методом проточной цитометрии снижение чувствительности свежeweделенных CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов пациентов с АИТ к апоптозу может быть связано с тем, что сверхэкспрессия Bcl-2 повышает устойчивость клеток к апоптозу под действием эндогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ранее было установле-

но [49], что регуляция избыточных уровней Bcl-2 помогает гарантировать, что апоптоз происходит только тогда, когда это необходимо, способствуя поддержанию клеточного гомеостаза.

Добавление экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ) дозозависимо снижало экспрессию Bcl-2 в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах (рис. 5А, б), что сопровождалось повышением количества аутофагосом в этих клетках (рис. 3Б, см. 3-ю стр. обложки) по сравнению с образцами контроля, что говорит об активации аутофагии. Полученные результаты согласуются с данными работы [45], в которой было показано, что снижение экспрессии белка Bcl-2 может усиливать аутофагию каспаза-независимым путем, в результате в клетках формировались многочисленные аутофагосомы при интактных ядрах и интактных мтХ без вовлечения активации каспаз [17].

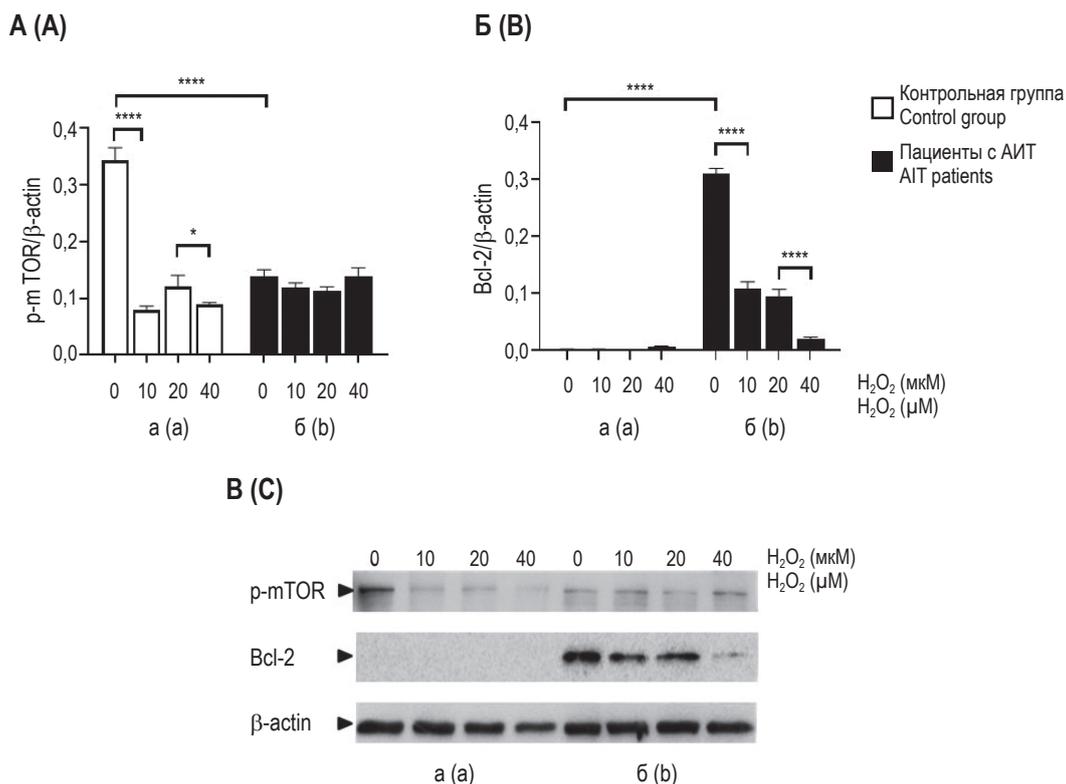
Таким образом, снижение содержания в клетках Bcl-2 при повышении экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ) может быть причиной зарегистрированного ранее (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки) снижения раннего апоптоза, повышения на поздней стадии апоптоза количества апоптотических и вторично-некротических клеток и увеличения некротизированных клеток у пациентов с АИТ. Конверсия апоптотических клеток во вторично-некротические происходит, как правило, при нарушении их утилизации в результате дисфункции мтХ, выражающейся в повышении проницаемости их мембран и снижении трансмембранного потенциала. Т. е. «умирающие клетки» влияют на живой организм пе-



**Рисунок 4.** Оценка содержания белков-маркеров аутофагии: p62, LC3I/II, регуляторов аутофагии (киназы mTOR) и регулятора апоптоза (Bcl-2) в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах больных АИТ с эутиреозом и здоровых доноров методом иммуноблоттинга

Примечание. Показаны репрезентативные данные.

Figure 4. Evaluation of the content of autophagy marker proteins: p62, LC3I/II, autophagy regulators (mTOR kinases) and apoptosis regulator (Bcl-2) in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes of euthyroid AIT patients and healthy donors by immunoblotting. Note. Representative data are shown.

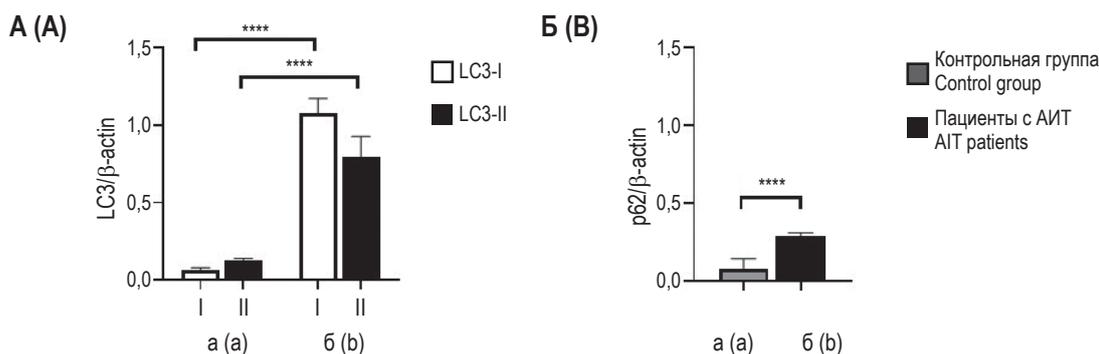


**Рисунок 5.** Сравнение уровня экспрессии киназы mTOR (А) и белка-регулятора Bcl-2 (Б) в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах при развитии окислительного стресса при добавлении экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ)

Примечание. А и Б – результаты денситометрии представлены в виде среднего значения ± SEM. \* – p < 0,05, \*\*\*\* – p < 0,0001. В – белковый иммуноблот определения в образце mTOR и Bcl-2. а – образцы CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов здоровых доноров, б – пациентов с АИТ.

Figure 5. Comparison of the expression level of mTOR kinase (A) and the Bcl-2 regulatory protein (B) in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes during the development of oxidative stress with the addition of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM, 20 μM, 40 μM)

Note. A and B, the densitometry results are presented as the mean ± SEM. \*, p < 0.05; \*\*\*\*, p < 0.0001. C, protein immunoblot of the determination of mTOR and Bcl-2 in the sample. a, CD4<sup>+</sup>T lymphocyte samples from healthy donors, b, patients with AIT.

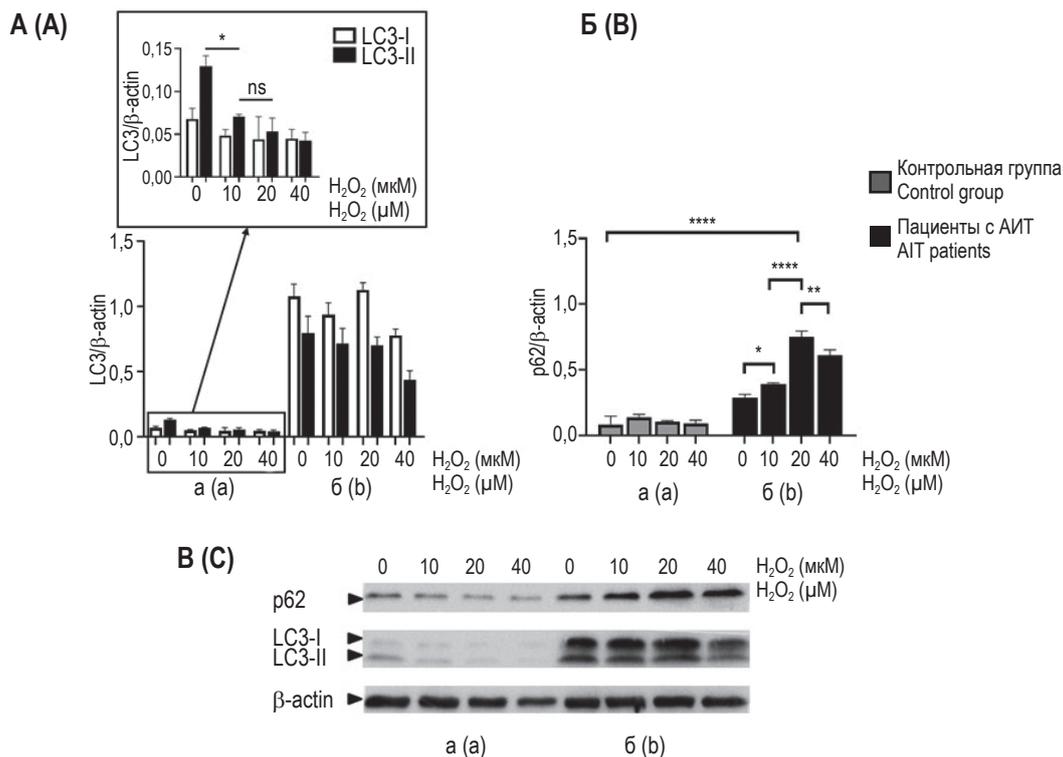


**Рисунок 6.** Сравнение экспрессии ключевых белков аутофагии LC3 (биомаркер формирования активных аутофагосом) (А) и адаптерного белка p62 (регулятор аутофагии, участвующий в формировании аутофагосом) (Б) в свежeweделенных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах

Примечание. а – образцы CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов здоровых доноров, б – пациентов с АИТ. I – цитоплазматическая (LC3-I) и II – липидированная (LC3-II) формы LC3-белка. Результаты денситометрии представлены в виде среднего значения ± SEM. \*\*\*\* – p < 0,0001.

Figure 6. Comparison of expression of key autophagy proteins LC3 (biomarker of active autophagosome formation) (A) and adapter protein p62 (autophagy regulator involved in autophagosome formation) (B) in freshly isolated CD4<sup>+</sup>T lymphocytes

Note. a, CD4<sup>+</sup>T lymphocyte samples from healthy donors, b, from patients with AIT. I, cytoplasmic (LC3-I) and II, lipidated (LC3-II) forms of LC3 protein. Densitometry results are presented as mean ± SEM. \*\*\*\*, p < 0.0001.



**Рисунок 7.** Сравнение уровня экспрессии цитоплазматического белка LC3-I и мембраносвязанного LC3-II белка (А) и белка-адаптера p62 (Б) в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах при развитии окислительного стресса при добавлении экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ)

**Примечание.** А и Б – результаты денситометрии представлены в виде среднего значения ± SEM; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,005$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ . В – белковый иммуноблот определения в образце LC3/II белка и p62 белка. а – образцы CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов здоровых доноров, б – пациентов с АИТ.

Figure 7. Comparison of the expression level of cytoplasmic LC3-I protein and membrane-bound LC3-II protein (A) and adapter protein p62 (B) in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes during the development of oxidative stress with the addition of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM, 20 μM, 40 μM)

Note. A and B, densitometry results are presented as the mean ± SEM. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ . C, protein immunoblot for the determination of LC3/II protein and p62 protein in the sample. a, samples of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes from healthy donors, b, patients with AIT.

реходом клеток на поздние этапы апоптоза, что сопровождается снижением антиоксидантной защиты и развитием аутоиммунной реакции [24].

Один из важных механизмов, с помощью которого аутофагия ингибирует апоптоз, заключается в том, что она может поглощать поврежденные мтХ. При благоприятных условиях конститутивная аутофагия выполняет функцию контроля качества этих клеточных компонентов. При нехватке энергии аутофагия становится механизмом удаления поврежденных структур и ремобилизации метаболитов, используемых для синтеза новых структур и АТФ, что способствует выживанию клетки. Ключевые белки аутофагии LC3 (биомаркер формирования активных аутофагосом) и адаптерный белок p62 (регулятор аутофагии, участвующий в формировании фагофора аутофагосом) находятся в тесном взаимодействии с митохондриальными белками и участвуют в индукции конститутивной митофагии (удаление поврежденных мтХ) [44].

При оценке уровня аутофагии (рис. 6) в интактных CD4<sup>+</sup>Т лимфоцитах (0 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) мы установили повышение уровня биомаркера формирования активных аутофагосом – LC3 (рис. 6А, б) и адаптерного белка p62 (рис. 6Б, б) в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах пациентов с АИТ.

Увеличение экспрессии LC3-I (рис. 6А, б) у пациентов с АИТ свидетельствует об увеличении активности процесса аутофагии по сравнению с образцами контроля. Соотношение этих белков (LC3-I/LC3-II) в Т-лимфоцитах пациентов с АИТ (рис. 6А, б) было достоверно ( $p < 0,0001$ ) выше, чем в образцах контроля (рис. 6А, а), таким образом нарастание соотношения LC3-I/LC3-II может свидетельствовать об активации инициации аутофагии при АИТ.

На экспериментальной модели в условиях увеличения концентрации экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ) мы показали, что в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах здоровых доноров снижается уровень маркера аутофагосом LC3-II (рис. 7А)

и белка-адаптора р62 (рис. 7Б, а), что может свидетельствовать о репаративной форме аутофагии в норме в результате запуска антиоксидантной системы.

В клетках пациентов с АИТ в условиях увеличения концентрации экзогенной  $H_2O_2$  (рис. 7) мы обнаружили, что АФК существенно не влияют на рост экспрессии LC3-I и скорость конверсии формы LC3-I в LC3-II по сравнению с контрольным образцом свежесыведенных клеток, за исключением высокой дозы  $H_2O_2$  (40 мкМ) (рис. 7А, б), что происходило на фоне накопления белка-адаптера р62 (рис. 7Б, б и 7В). Это наблюдение может быть связано с нарушением базового уровня процесса аутофагии и скорости деградации аутофагосом.

Скопление р62 регистрируют на внешней мембране мтХ, поэтому полученные нами данные могут свидетельствовать [21] об участии митофагии в патогенезе АИТ. Белок р62 (рецептор груза) функционирует как селективный рецептор митофагии для деградации убиквитинированных субстратов. Благодаря наличию LC3 – взаимодействующего мотива (LIR), молекула р62 вместе с грузом связывается с LC3-II белком в составе фагофора аутофагосомы при митофагии. Нарушение процесса аутофагии приводит к накоплению р62, поэтому уровни р62 используются в качестве маркера аутофагического потока вместе с LC3-II белком [32].

Как следует из результатов рисунка 7Б (б), увеличение концентрации  $H_2O_2$  значительно ингибирует деградацию р62, что также указывает на возможную дисфункцию аутофагии. Таким образом, из данного эксперимента следует, что при ОС в  $CD4^+$ Т-лимфоцитах у пациентов с АИТ на-

блюдается нарушение процесса аутофагии, что подтверждается накоплением белка р62 при высоких уровнях белка LC3, в то время как у здоровых доноров можно говорить о репаративной форме аутофагии.

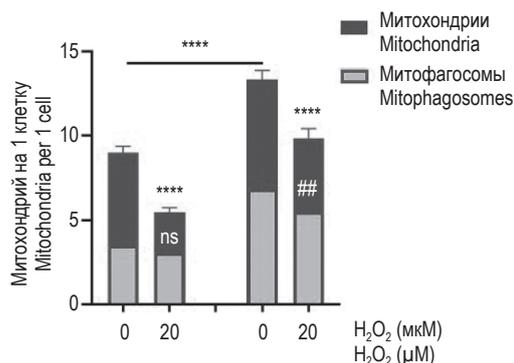
По результатам проточной цитометрии (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки) у пациентов с АИТ при развитии ОС происходит снижение активации апоптоза. Один из механизмов, с помощью которого аутофагия может ингибировать апоптоз, заключается в том, что она может поглощать поврежденные мтХ (митофагия). Поэтому мы оценили состояние мтХ в  $CD4^+$ Т-лимфоцитах методом конфокальной микроскопии. МтХ и митофагосомы (мтФ) окрашивали с помощью красителей MitoTracker и СITO-ID соответственно и далее определяли их колокализацию (рис. 8, см. 3-ю стр. обложки).

В результате выявили повышение митохондриального пула у пациентов с АИТ в свежесыведенных клетках по сравнению с контрольными образцами, который снижался при внесении 20 мкМ экзогенной  $H_2O_2$  (рис. 8А, см. 3-ю стр. обложки).

Повышение пула мтХ в образцах пациентов с АИТ было связано с увеличением количества мтФ. В контрольной группе, как показано на рисунке 8Б (см. 3-ю стр. обложки) преобладали аутофагосомы.

Чтобы выяснить, как  $CD4^+$ Т-клетки реагируют на  $H_2O_2$ , мы оценили соотношение уровня мтФ к уровню мтХ на одну клетку с базальным уровнем  $H_2O_2$  здоровых доноров и пациентов с АИТ и при добавлении 20 мкМ  $H_2O_2$  (рис. 9). И установили, что уровень мтФ достоверно выше у пациентов с

А (А)



Б (Б)

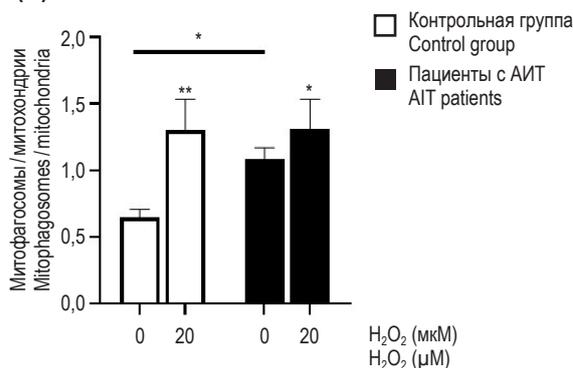


Рисунок 9. Оценка митофагии в  $CD4^+$ Т-лимфоцитах

Примечание. А – количество митохондрий и митофагосом на 1 клетку здоровых доноров (А, а) и пациентов с АИТ (А, б) при окислительном стрессе. Б – соотношение количества митофагосом к количеству митохондрий (FC) в клетке здоровых доноров (Б, а) и пациентов с АИТ (Б, б); \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,005$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ . Показаны репрезентативные данные.

Figure 9. Evaluation of mitophagy in  $CD4^+$ Т lymphocytes

Note. A, the number of mitochondria and mitophagosomes per 1 cell of healthy donors (A, a) and AIT patients (A, b) during oxidative stress. B, the ratio of the number of mitophagosomes to the number of mitochondria (FC) in the cell of healthy donors (B, a) and AIT patients (B, b); \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ . Representative data are shown.

АИТ как в свежевыделенных клетках, так и при внесении экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 9А, Б).

Мерой устойчивости клеток к препарату считают отношение количества измененных клеток к аналогичному показателю «здоровых клеток». Этот параметр называют изменением устойчивости (fold change-FC) или показателем кратности. Показатель кратности у резистентного (устойчивого) варианта клеток всегда меньше 1, у гиперчувствительных – больше 1. Мы определяли FC по формуле:  $FC_{H_2O_2} = C_{мтФ}; C_{мтХ}$ . Как следует из рисунка 9Б, показатель кратности, который отражает количество мтФ на 1 клетку, в свежевыделенных клетках здоровых доноров ниже 1 (FC = 0,65), а при действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> достоверно возрастал до FC = 1,304 (p < 0,005); в свежевыделенных клетках пациентов с АИТ FC – больше 1 (FC = 1,08), который также достоверно возрастал (p < 0,05) под действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до FC = 1,310. Т. е. добавление экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, как мы полагаем, увеличивает количество поврежденных мтХ. Также следует отметить, что в здоровых клетках количество мтХ превышает количество мтФ.

На основе полученных данных можно предположить, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывает активацию митофагии в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах пациентов с АИТ, а развитие ОС при избыточной продукции АФК приводит к необратимым повреждениям мтХ, которые приводят к снижению апоптотической активности и, как следствие, развитию вторичного некроза CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов при АИТ (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки).

## Обсуждение

Цитотоксический потенциал активированных Т-лимфоцитов реализуется двумя способами: за счет экзоцитоза гранул, содержащих перфорин и гранзим В (т. е. за счет прямой активации каспаз клеток-мишеней). В этом случае действуют преимущественно CD8<sup>+</sup> лимфоциты, тогда как цитотоксический эффект CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов (Th1-лимфоцитов), которые в большом количестве присутствуют в тироцитах при АИТ, осуществляется в основном через клеточные «рецепторы смерти», и главным посредником цитотоксического действия этих клеток являются «смертельные лиганды» (FasL, TRAIL) [35]. При АИТ фолликулярные клетки ЩЖ, окруженные лимфоцитами, обнаруживают все признаки апоптоза [9]. Особенно в разрушенных фолликулах вблизи инфильтрированных областей по сравнению с неаутоиммунными железами. По данным [35], интратироидные лимфоциты из ЩЖ при АИТ сохраняют функциональную активность киллера. Эти результаты, по мнению авторов, говорят о том, что интратироидные лимфоциты могут быть ответственны за гибель тиро-

цитов *in vivo*. При АИТ также было обнаружено нарушение генов антиапоптоза Bcl-2 и Bcl-X на тироцитах. Эти результаты свидетельствуют о том, что гибель тироцитов может быть результатом не только специфических взаимодействий между рецепторами смерти и их лигандами, но и связано с нарушением защитных генов семейства Bcl-2. Является ли нарушение семейства Bcl-2 прямым следствием воздействия окружающей среды или результатом внутреннего изменения тироцитов (мтХ?), на тот период было неизвестно [35]. В другой работе [31] было показано, что опосредованный рецепторами апоптоз регулируется ингибиторами посткаспазного каскада, к которому относится белок Bcl-2, влияющий на проницаемость митохондриальной мембраны, которой принадлежит одна из центральных ролей в регуляции апоптоза. Белок препятствует повышению проницаемости митохондриальной мембраны и тем самым блокирует процесс апоптоза.

Еще одним важным аспектом в оценке влияния ОС на поведении Т-лимфоцитов при АИТ является образование количеств активированных кислородных метаболитов. мтХ – поставщики энергии в клетке: они производят АТФ, за счет которой происходят практически все биохимические процессы. Ранее считалось, что роль мтХ в развитии патологий – это нарушение энергообеспечения, например при дефиците кислорода или генетических нарушениях. В настоящее время стали обращать внимание на специфические процессы, в которых участвуют мтХ: это нарушение внутриклеточной передачи сигналов, включая один из наиболее изучаемых митохондриальных процессов – генерацию активированных кислородных метаболитов и выход из мтХ в цитоплазму белков, активирующих процесс апоптоза (например, цитохрома с). Эти функции мтХ, как правило, связаны с нарушением их биоэнергетических функций и избыточной продукцией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. С другой стороны, по новым данным, в условиях гипоксии мтХ подвергаются делению и выглядят как отдельные органеллы митохондриальной сети, что нужно для содействия митофагии, поддержания продукции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на физиологически низком уровне и поддержания клеточного гомеостаза за счет снижения дыхательной активности. Таким образом, если роль митохондриальных АФК (митоАФК) в ОС достаточно хорошо известна, то их участие в иммунном ответе в настоящее время представляет собой активно развивающееся направление, в частности есть данные, которые позволяют предположить, что митоАФК являются потенциально незаменимыми факторами для активации Т-клеток, их эффекторных функций и дифференцировки [41]. Например, ведущее значение клеточному звену иммунитета придают при патогенезе АИТ. Предполагается

несколько механизмов развития, и по одному из них [39, 46] АИТ характеризуется иммуно-опосредованной деструкцией ЩЖ вследствие апоптоза тиреоцитов. Гибель тиреоцитов связывают с цитотоксическим эффектом в результате активации CD4<sup>+</sup>T-клеток, инфильтрирующих ЩЖ [5, 7]. Происходит апоптоз тиреоцитов в результате индуцированной цитокинами экспрессии FasR и FasL (FasL экспрессируется на поверхности активированных T-лимфоцитов и связывается с FasR клетки-мишени) и проапоптотических белков.

По другому механизму разрушение клеток ЩЖ является следствием усиления ОС [13]. Активированные кислородные метаболиты участвуют во взаимодействии между аутофагией и апоптозом благодаря способности H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> опосредовать окислительно-восстановительные сигнальные пути. Это взаимодействие запускает реакцию аутофагии, которая в дальнейшем вызывает ОС, если функция аутофагии нарушается.

Впервые участие мТХ в процессе аутофагии обнаружили в 2010 году, когда Hailey D.W. и соавт. [25] наблюдали транслокацию некоторых митохондриальных белков, например белка наружной митохондриальной мембраны, в аутофагосомы.

Одной из связей между аутофагией и мТХ является избирательное устранение избыточных или поврежденных мТХ (митофагия), которые и сами являются значительным источником ОС. Таким образом, количество и функциональная активность мТХ регулируются митофагией – процессом, при котором поврежденные мТХ подвергаются аутофагической деградации. Хотя долгое время предполагалось, что это случайный процесс, доказательства указывают на то, что митофагия является избирательным процессом [29]. Следовательно, аутофагия является ключевым фактором, определяющим здоровье мТХ и правильное функционирование клеток.

Помимо значения аутофагии для целостности мТХ, ряд работ указывают на то, что мТХ также могут существенно влиять на процесс аутофагии. Способность мТХ влиять и подвергаться влиянию аутофагии ставит мТХ и аутофагию в уникальное положение, где дефекты в одной или другой системе могут увеличить риск различных метаболических и аутофагических заболеваний.

Итак, дополнительным митохондриальным продуктом, влияющим на аутофагию, являются активированные кислородные метаболиты. Во время голодания питательных веществ повышение уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> необходимо для индукции аутофагии. Белок аутофагии – редокс-регулируемый фермент – цистеин-зависимая протеаза АТG4, – был идентифицирован как основа окислительно-восстановительной чувствительности аутофагии. Основная функция этого фермента – процессинг

белка Atg8 (LC3), который после такой посттрансляционной модификации становится способным связывать фосфотидилэтаноламин и, таким образом, инициировать образование аутофагосомы. На протяжении всего формирования аутофагосомы благодаря частичному протеолизу аминокислотной последовательности с С-конца LC3-I белка становится возможным его связывание с аминокислотной группой фосфатидилэтаноламина в зарождающейся аутофагосомальной мембране (белок получает название LC3-II) [28]. На сегодняшний день АТG4 считается наиболее известным белком аутофагии, который регулируется сигнализацией АФК, но другие белки также могут вносить дополнительный вклад в окислительно-восстановительную регуляцию процесса аутофагии, включая самый главный регулятор аутофагии – mTOR [40].

Белок mTOR также является одним из факторов молекулярного взаимодействия путей аутофагии и апоптоза. mTOR контролирует сигналы о питательных и энергетических ресурсах клетки, и, при достаточном количестве этих ресурсов, поддерживается базальный (репаративный) уровень аутофагии, необходимый для поддержания нормальных физиологических условий функционирования клеток. Гиперактивированный mTOR приводит к чрезмерной стимуляции биосинтеза белка в клетке и подавлению аутофагии, что, в свою очередь, приводит к окислительному и протеотоксическому стрессу. Снижение активности этой киназы является причиной некротической гибели клеток и изменения тканевой структуры [53]. Как следует из экспериментальных данных (рис. 5B, а), на фоне mTOR, контролирующего сигналы об энергетических ресурсах клетки, в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах здоровых доноров при нормальных физиологических условиях функционирования клеток с увеличением концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> уровень этой киназы снижается в ответ на ОС, что говорит об активации аутофагии на фоне очень низкого уровня экспрессии Bcl-2 белка, в то время как в CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитах пациентов с АИТ реакция mTOR на повышение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> нарушена.

Каноническая функция Bcl-2 связана с его способностью ингибировать проницаемость митохондриальной мембраны, регулируя сборку и активацию апоптосомы путем блокирования цитозольной транслокации факторов смерти, например цитохрома с. Помимо поддержания митохондриальной целостности, Bcl-2 связан с клеточным окислительно-восстановительным состоянием. Сверхэкспрессия Bcl-2 модулирует митохондриальный окислительно-восстановительный метаболизм, создавая «прооксидантную» среду, благоприятную для выживания клеток. В условиях ОС Bcl-2 функционирует как окислительно-восстановительный сток, предот-

вращая чрезмерное накопление АФК, ингибируя сигналы выполнения. Данные [37] указывают на различные окислительно-восстановительные транскрипционные изменения и посттрансляционные модификации с различными функциональными результатами.

Нами показано, что при АИТ задействован внутренний, т. е. митотический путь апоптоза, причем активность этого процесса ниже по сравнению с образцами контроля (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки), более того, апоптоз представлен не только стадией позднего апоптоза, но и накоплением некротических клеток. Маркеры аутофагии также показали отклонение в функционировании от нормы: отмечено повышенное количество белка Bcl-2 у пациентов с АИТ (рис. 5Б, 6) и накапливается количество p62 белка (рис. 6Б). Эти биохимические показатели свидетельствовали о возможном повреждении мтХ при АИТ. Что было подтверждено при экспериментальном исследовании: в клетках пациентов с АИТ обнаружено повышенное содержание мтФ (рис. 8, см. 3-ю стр. обложки) по сравнению с контрольными образцами, а относительное содержание мтФ к мтХ достоверно было выше по сравнению с контрольными образцами.

Итак, АФК являются основным выражением ОС в биологических системах, и их продукция может преодолеть антиоксидантную защиту, в конечном итоге приводя к повреждению клеток, апоптозу и смерти. Данные клинических исследований четко указывают на то, что баланс между окислителями и антиоксидантами смещен в сторону окислительной активности у пациентов с АИТ, что позволяет предположить, что ОС может быть ключевым событием в патофизиологии заболевания, независимо от функции ЩЖ. Исследования на моделях животных, таких как мыши NOD.H2h4, подтверждают, что накопление АФК в ЩЖ играет роль в инициировании и прогрессировании АИТ [43].

Как известно, аутофагия — это одна из основных форм клеточной защиты от ОС: в норме АФК активируют аутофагию, которая облегчает клеточную адаптацию и уменьшает окислительное повреждение за счет деградации и переработки внутриклеточных поврежденных макромолекул и дисфункциональных органелл. Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза при патологических состояниях ведет к чрезмерному образованию АФК, что приводит к ОС и связанному с ним окислительному повреждению клеточных компонентов [34]. Современные исследования предполагают центральную роль аутофагии как реакции на ОС у млекопитающих и ее взаимосвязь с другими системами защиты от стресса.

Измененные фенотипы аутофагии наблюдались при заболеваниях онкологических, нейродегенеративных, иммунных, в частности астмы, и заболеваниях ЩЖ, поэтому понимание механизмов, с помощью которых АФК регулируют аутофагию, может предложить новые терапевтические цели для лечения заболеваний.

## Заключение

Каноническая функция Bcl-2 связана с его способностью ингибировать проницаемость митохондриальной мембраны, помимо поддержания митохондриальной целостности, Bcl-2 связан с клеточным окислительно-восстановительным состоянием, кроме того, функция ингибирования апоптоза белком Bcl-2 тесно связана с сигнальным путем ПКГ II типа, т. е. аутофагией. Маркеры аутофагии также показали отклонение в функционировании от нормы: отмечено повышенное количество белка Bcl-2 у пациентов с АИТ (рис. 5Б, 6) и накапливается количество p62 белка (рис. 6Б). Эти биохимические показатели свидетельствовали о возможном повреждении мтХ при АИТ.

Ключевые белки макроаутофагии LC3 (биомаркер формирования активных аутофагосом) и адаптерный белок p62 (регулятор аутофагии, участвующий в формировании аутофагосом) также находятся в тесном взаимодействии с митохондриальными белками и участвуют в индукции конститутивной митофагии. Функциональное связывание липидированной формы белка LC3-II и p62 важно для нормального протекания этого процесса [44]. На экспериментальной модели в условиях возрастания перекиси H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> мы показали, что АФК активируют цитоплазматический LC3-I в клетках пациентов с АИТ, и накапливается аутофагический белок-адаптер p62, который регистрируется на внешней митохондриальной мембране, что свидетельствует об участии митофагии в патогенезе заболеваний [21]. И установленный в эксперименте повышенный уровень мтФ в CD4<sup>+</sup>T-клетках пациентов с АИТ (рис. 8, см. 3-ю стр. обложки) подтверждает наше предположение о нарушении функций мтХ при АИТ, делая CD4<sup>+</sup>T-клетки цитотоксическими.

Накопление таких клеток в ткани ЩЖ может приводить к нарушению апоптоза в тироцитах и, как следствие, ко вторичному некрозу. Результат — развитие аутоиммунного ответа. Полученные данные требуют дополнительных исследований, т. к. выявление в крови пациентов с АИТ CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, склонных к апоптозу или к некрозу, может использоваться как диагностический критерий прогноза воспалительного процесса.

## Список литературы / References

1. Архипов С.А., Шкурупиц В.А., Зайковская М.В., Ахраменко Е.С., Ильин Д.А. Разнонаправленные эффекты  $H_2O_2$  на макрофаги и фибробласты в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* // Современные наукоемкие технологии, 2010. № 8. С. 76-77. [Arkhipov S.A., Shkurupiy V.A., Zaikovskaya M.V., Akhramenko E.S., Ilyin D.A. Multidirectional effects of  $H_2O_2$  on macrophages and fibroblasts under conditions of *in vitro* oxidative stress modeling. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii = Modern High-Tech Technologies*, 2010, no. 8, pp. 76-77. (In Russ.)]
2. Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели (обзор) // Биохимия, 2005. Т. 70, № 2. С. 284-293. [Bra M., Kvinan B., Suzin S.A. Mitochondria in programmed cell death: various mechanisms of death (review). *Biokhimiya = Biochemistry*, 2005, Vol. 70, no. 2, pp. 284-293. (In Russ.)]
3. Буданов А.В. Роль сестринов в регуляции клеточного ответа на стресс // Успехи современной биологии, 2022. Т. 142, № 1. С. 5-24. [Budanov A.V. The role of sestrins in the regulation of the cellular response to stress. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2022, Vol. 142, no. 1, pp. 5-24. (In Russ.)]
4. Буданов А.В. Роль сестринов в регуляции клеточного ответа на стресс // Успехи современной биологии, 2022. Т. 142, № 1. С. 5-24. [Budanov A.V. The role of sestrins in the regulation of cellular response to stress. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2022, Vol. 142, no. 1, pp. 5-24. (In Russ.)]
5. Вольпе Р. Болезни щитовидной железы / Под ред. Л.И. Бравермана: Пер. с англ. М.: Медицина, 2010. С. 140-172. [Volpe R. Diseases of the thyroid gland / Ed. L.I. Braverman: Trans. from English]. Moscow: Meditsina, 2010. pp. 140-172.
6. Гамалей И.А., Клубин И.В. Перекись водорода как сигнальная молекула // Цитология, 1996. Т. 38, № 12. С. 1233-1247. [Gamalei I.A., Klubin I.V. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Tsitologiya = Tsitologiya*, 1996, Vol. 38, no. 12, pp. 1233-1247. (In Russ.)]
7. Жукова С.И., Каннер И.Д., Мамонтова Т.М., Шеломенцева Е.М., Максимов М.Л. Роль Т-регуляторных клеток в аутоиммунном тиреоидите // Медицинский совет, 2020. № 21. С. 152-159. [Zhukova S.I., Kanner I.D., Mamontova T.M., Shelomentseva E.M., Maksimov M.L. The role of T-regulatory cells in autoimmune thyroiditis. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2020, no. 21, pp. 152-159. (In Russ.)]
8. Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 2. С. 195-214. [Zenkov N.K., Chechushkov A.V., Kozhin P.M., Martinovich G.G., Kandalintseva N.V., Menshchikova E.B. Autophagy as a mechanism of protection under oxidative stress. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 2, pp. 195-214. (In Russ.)]
9. Кандрор В.И. Аутоиммунные заболевания щитовидной железы и апоптоз // Проблемы эндокринологии, 2002. Т. 48, № 1. С. 45-48. [Kandror V.I. Autoimmune diseases of the thyroid gland and apoptosis. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2002, Vol. 48, no. 1, pp. 45-48. (In Russ.)]
10. Кормош Н.Г. Физиологическая роль активных форм кислорода (субклеточный уровень) – взгляд клинициста // Российский биотерапевтический журнал, 2011. Т. 10, № 4. С. 29-35. [Kormosh N.G. The physiological role of reactive oxygen species (subcellular level) – a clinician's view. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2011, Vol. 10, no. 4, pp. 29-35. (In Russ.)]
11. Нуралиева Н.Ф., Юкина М.Ю., Трошина Е.А. Основы иммунопатогенеза аутоиммунных тиреопатий и сахарного диабета 1 типа // Доктор. Ру, 2019. № 4 (159). С. 49-53. [Nuralieva N.F., Yukina M.Yu., Troshina E.A. Fundamentals of immunopathogenesis of autoimmune thyropathies and type 1 diabetes mellitus. *Doktor.Ru = Doctor.Ru*, 2019, no. 4 (159), pp. 49-53. (In Russ.)]
12. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология, 2002. Т. 23, № 4. С. 237-243. [Potapnev M.P. Apoptosis of immune system cells and its regulation by cytokines. *Immunologiya = Immunologiya*, 2002, Vol. 23, no. 4, pp. 237-243. (In Russ.)]
13. Рыбакова А.А., Платонова Н.М., Трошина Е.А. Оксидативный стресс и его роль в развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Проблемы эндокринологии, 2019. Т. 65, № 6. С. 451-457. [Rybakova A.A., Platonova N.M., Troshina E.A. Oxidative stress and its role in the development of autoimmune thyroid diseases. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2019, Vol. 65, no. 6, pp. 451-457. (In Russ.)]
14. Трошина Е.А. Хронический аутоиммунный тиреоидит – «сигнальное заболевание» в составе мультиорганный аутоиммунного синдрома // Проблемы эндокринологии, 2023. Т. 69, № 4. С. 4-10. [Troshina E.A. Chronic autoimmune thyroiditis – a “signal disease” as part of a multiorgan autoimmune syndrome. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2023, Vol. 69, no. 4, pp. 4-10. (In Russ.)]
15. Тюкавин А.И., Сучков С.В. Молекулярные механизмы функционирования клетки в норме и патологии // Формулы Фармации, 2022. Т. 4, № 4. С. 26-40. [Tyukavin A.I., Suchkov S.V. Molecular mechanisms of cell functioning in norm and pathology. *Formuly Farmatsii = Formulas of Pharmacy*, 2022, Vol. 4, no. 4, pp. 26-40. (In Russ.)]
16. Уразова О.И., Кравец Е.Б., Новицкий В.В., Рогалева А.В., Будкина Т.Е., Синюкова О.А., Недосекова Ю.В., Кузнецова В.Н. Апоптоз лимфоцитов крови у больных аутоиммунными тиреопатиями // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 2-3. С. 187-192. [Urazova O.I., Kravets E.B., Novitsky V.V., Rogaleva A.V., Budkina T.E., Sinyukova O.A., Nedosekova Yu.V., Kuznetsova V.N. Apoptosis of lymphocytes of blood in patients with autoimmune thyroid diseases // *Meditsinskaya immunologiya*, 2008. T. 10, No. 2-3. P. 187-192. (In Russ.)]

Budkina T.E., Sinyukova O.A., Nedosekova Yu.V., Kuznetsova V.N. Apoptosis of blood lymphocytes in patients with autoimmune thyropathies. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 2-3, pp. 187-192. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-2-3-187-192.

17. Фрейдлин И.С., Маммедова Д.Т., Старикова Э.А. Роль аутофагии при инфекциях // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2019. Т. 105, № 12. С. 1486-1501. [Freidlin I.S., Mammadova D.T., Starikova E.A. The role of autophagy in infections. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*, 2019, Vol. 105, no. 12, pp. 1486-1501. (In Russ.)]

18. Часовских Н.Ю., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Апоптоз и окислительный стресс. Томск: Печатная мануфактура, 2009. 148 с. [Chasovskikh N.Yu., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V. Apoptosis and oxidative stress]. Tomsk: Pechatnaya manufaktura, 2009. 148 p.

19. Ates I., Arikan M.F., Altay M., Yilmaz F.M., Yilmaz N., Berker D., Guler S. The effect of oxidative stress on the progression of Hashimoto's thyroiditis. *Arch. Physiol. Biochem.*, 2018, Vol. 124, no. 4, pp. 351-356.

20. Bermann M., Magee M., Koenig R.J., Kaplan M.M., Arcott P., Maastricht J., Johnson J., Baker J.R. Differential autoantibody responses to thyroid peroxidase in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993, Vol. 77, no. 4, pp. 1098-1101.

21. Bjørkøy G., Lamark T., Brech A., Outzen H., Perander M., Øvervatn A., Stenmark H., Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.*, 2005, Vol. 171, no. 4, pp. 603-614.

22. Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A., Adams J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2014, Vol. 15, no. 1, pp. 49-63.

23. Filomeni G., De Zio D., Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* 2015, Vol. 22, no. 3, pp. 377-388.

24. Green D.R. The end and after: how dying cells impact the living organism. *Immunity*, 2011, Vol. 35, no. 4, pp. 441-444.

25. Hailey D.W., Rambold A.S. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 2010, Vol. 141, no. 4, pp. 656-667.

26. Hu H., Tian M., Ding C., Yu S. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 9, 3083. doi: 10.3389/fimmu.2018.03083.

27. Jiang P., Mizushima N. Autophagy and human diseases. *Cell Res.*, 2014, Vol. 24, no. 1, pp. 69-79.

28. Kaminsky V., Zhivotovsky B. Proteases in autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, Vol. 1824, no. 1, pp. 44-50.

29. Kim I., Rodriguez-Enriquez S., Lemasters J.J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, Vol. 462, no. 2, pp. 245-253.

30. Kochman J., Jakubczyk K., Bargiel P., Janda-Milczarek K. The influence of oxidative stress on thyroid diseases. *Antioxidants*, 2021, Vol. 10, no. 9, 1442. doi: 10.3390/antiox10091442.

31. Kroemer G., Reed J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.*, 2000, Vol. 6, no. 5, pp. 513-519.

32. Kumar A.V., Mills J., Lapierre L.R. Selective autophagy receptor p62/SQSTM1, a pivotal player in stress and aging. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2022, Vol. 10, 793328. doi: 10.3389/fcell.2022.793328.

33. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010, Vol. 22, no. 2, pp. 132-139.

34. Ornatowski W., Lu Q., Yegambaram M., Garcia A.E., Zemskov E.A., Maltepe E., Fineman J.R., Wang T., Black S.M. Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease. *Redox Biol.*, 2020, Vol. 36, 101679. doi: 10.1016/j.redox.2020.101679.

35. Palazzo F.F., Hammond L.J., Goode A.W., Mirakian R. Death of the autoimmune thyrocyte: is it pushed or does it jump? *Thyroid*, 2000, Vol. 10, no. 7, pp. 561-572.

36. Peter C., Wesselborg S., Herrmann M., Lauber K. Dangerous attraction: phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells. *Apoptosis*, 2010, Vol. 15, no. 9, pp. 1007-1028.

37. Pohl S.Ö., Agostino M., Dharmarajan A., Pervaiz S. Cross talk between cellular redox state and the anti-apoptotic protein Bcl-2. *Antioxid. Redox Signal.*, 2018, Vol. 29, no. 13, pp. 1215-1236.

38. Pua H.H., Guo J., Komatsu M., He Y.W. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 7, pp. 4046-4055.

39. Pyzik A., Grywalska E., Matyjaszek-Matuszek B., Roliński J. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, no. 1, 979167. doi: 10.1155/2015/979167.

40. Rambold A.S., Lippincott-Schwartz J. Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell Cycle*, 2011, Vol. 10, no. 23, pp. 4032-4038.

41. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.*, 2002, Vol. 3, no. 12, pp. 1129-1134.

42. Roth S., Dröge W. Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell. Immunol.*, 1987, Vol. 108, no. 2, pp. 417-424.

43. Ruggeri R.M., Campenni A., Giuffrida G., Casciaro M., Barbalace M.C., Hrelia S., Trimarchi F., Cannavò S., Gangemi S. Oxidative stress as a key feature of autoimmune thyroiditis: an update. *Minerva Endocrinol.*, 2020, Vol. 45, no. 4, pp. 326-344.

44. Rui Y.N., Le W. Selective role of autophagy in neuronal function and neurodegenerative diseases. *Neurosci. Bull.*, 2015, Vol. 31, no. 4, 379-381.
45. Saeki K., Yuo A., Okuma E., Yazaki Y., Susin S.A., Kroemer G., Takaku F. Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ.*, 2000, Vol. 7, no. 12, pp. 1263-1269.
46. Santaguida M.G., Gatto I., Mangino G., Virili C., Stramazzo I., Fallahi P., Antonelli A., Segni M., Romeo G., Centanni M. BREG cells in Hashimoto's thyroiditis isolated or associated to further organ-specific autoimmune diseases. *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 184, pp. 42-47.
47. Seong S.Y., Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, no. 6, pp. 469-478.
48. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, 1993, Vol. 215, no. 2, pp. 213-219.
49. Singh R., Letai A., Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2019, Vol. 20, no. 3, pp. 175-193.
50. Stone J.R., Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium*, 2002, Vol. 9, no. 4, pp. 231-238.
51. van Parijs L., Biuckians A., Abbas A.K. Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 160, no. 5, pp. 2065-2071.
52. Walsh C.M., Edinger A.L. The complex interplay between autophagy, apoptosis, and necrotic signals promotes T-cell homeostasis. *Immunol. Rev.*, 2010, Vol. 236, no. 1, pp. 95-109.
53. Weichhart T. mTOR as regulator of lifespan, aging, and cellular senescence: a mini-review. *Gerontology*, 2018, Vol. 64, no. 2, pp. 127-134.
54. Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell*, 2010, Vol. 140, no. 6, pp. 798-804.

---

**Авторы:**

Бурцева А.В. — магистрант, кафедра биохимии биотехнологии и фармакологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Тихонова А.Н. — бакалавр, кафедра биохимии биотехнологии и фармакологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Афанасьева З.А. — д.м.н., профессор, профессор кафедры онкологии, радиологии и паллиативной медицины, Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

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

---

**Authors:**

Burtseva A.V., Master's Student, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Tikhonova A.N., Bachelor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Afanasyeva Z.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Oncology, Radiology and Palliative Medicine, Kazan State Medical Academy, Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

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

---

Поступила 14.11.2024

Отправлена на доработку 19.11.2024

Принята к печати 23.03.2025

---

Received 14.11.2024

Revision received 19.11.2024

Accepted 23.03.2025

## **ЗНАЧЕНИЕ ОЦЕНКИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ ПРИ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ**

**Балацкая Н.В., Воробьева Е.П., Куликова И.Г., Андриюшин А.Е.**

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца»  
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

**Резюме.** Среди многочисленных факторов патогенеза возрастной макулярной дегенерации (ВМД) в последние годы особое внимание уделяют эндотелиальной дисфункции (ЭД), поскольку эндотелий сосудов является важнейшим элементом внутренней области гематоретинального барьера (ВГРБ), обеспечивающему иммунологический гомеостаз сетчатки. Изучение воспалительных маркеров активации эндотелия представляется актуальным с целью понимания механизмов развития заболевания, может способствовать разработке патогенетической терапии ранней и промежуточной стадий ВМД, мер вторичной профилактики ее осложнений. Цель – определение sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sP-selectin и MCP-1/CCL2 в сыворотке крови (СК) и слезной жидкости (СЖ) пациентов с начальной (AREDS2) и промежуточной (AREDS3) стадиями ВМД. Исследование проведено методом проточной цитометрии (СВА) (проточный цитометр BD FACS Canto II, США) с помощью панели, сконструированной из совместимых симплексных тест-систем FlowCytomix™ (Bender MedSystem GmbH, Германия) для определения sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sP-selectin и MCP-1/CCL2, позволяющей осуществлять их одновременную детекцию, с обработкой данных в пакете FlowCytomix Pro v. 6.0 (BenderMed Systems GmbH, Германия). Выявлена тенденция к повышению уровня sVCAM-1 в СК пациентов группы с промежуточной ВМД по сравнению с нормой. При анализе системной продукции остальных маркеров не установлено различий между основными группами и возрастным контролем. В ходе исследования СЖ в группе AREDS2 обнаружено достоверное увеличение концентрации MCP-1/CCL2, sE-selectin ( $p < 0,05$ ) с тенденцией к усилению локальной продукции растворимых ICAM-1 и P-selectin ( $p = 0,05$ ) относительно нормы. В группе AREDS3 значимые сдвиги касались 3 факторов sICAM-1, sE-selectin и sP-selectin, содержание которых в СЖ пациентов превышало таковое в контроле более чем в 2,5, почти в 5 и 2 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). Выявлено преимущественно усиление локальной и в меньшей мере системной продукции маркеров, отражающее активированное состояние эндотелия. Полученные данные представляются важными, поскольку доказывают уча-

### **Адрес для переписки:**

*Воробьева Елена Павловна  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр глазных болезней имени Гельмгольца»  
Министерства здравоохранения РФ  
101000, Россия, Москва,  
ул. Садовая-Черногрозская, 14/19.  
Тел.: 8 (909) 155-22-17.  
E-mail: helen1996@list.ru*

### **Address for correspondence:**

*Elena P. Vorobyova  
Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases  
14/19 Sadovaya-Chernogryazskaya St  
Moscow  
101000 Russian Federation  
Phone: +7 (909) 155-22-17.  
E-mail: helen1996@list.ru*

### **Образец цитирования:**

*Н.В. Балацкая, Е.П. Воробьева, И.Г. Куликова,  
А.Е. Андриюшин «Значение оценки воспалительных  
маркеров активации сосудистой стенки при  
возрастной макулярной дегенерации» // Медицинская  
иммунология, 2025. Т. 27, № 4. С. 863-872.  
doi: 10.15789/1563-0625-SOA-2930*

*© Балацкая Н.В. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0*

### **For citation:**

*N.V. Balatskaya, E.P. Vorobyova, I.G. Kulikova,  
A.E. Andryushin "Significance of assessing the inflammatory  
markers of vascular wall activation in age-related macular  
degeneration", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 4, pp. 863-872.  
doi: 10.15789/1563-0625-SOA-2930*

*© Balatskaya N.V. et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-SOA-2930*

стие sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sP-selectin, MCP-1/CCL2 в патогенезе заболевания и позволяют думать о компроментации гематоретинального барьера, необходимости дополнения курса терапии ВМД назначением препаратов ангиопротекторного, противовоспалительного действия и нуждается в дальнейшем изучении.

*Ключевые слова:* возрастная макулярная дегенерация, дисфункция эндотелия сосудов, воспаление, маркеры, молекулы адгезии, хемокины

## SIGNIFICANCE OF ASSESSING THE INFLAMMATORY MARKERS OF VASCULAR WALL ACTIVATION IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION

Balatskaya N.V., Vorobyova E.P., Kulikova I.G., Andryushin A.E.

*Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Among the numerous pathogenetic factors of age-related macular degeneration (AMD), special attention has been recently paid to endothelial dysfunction (ED), since the vascular endothelium is an important internal component of the the hematorretinal barrier (IBRB) providing immunological homeostasis of the retina. The study of inflammatory endothelial activation markers seems relevant in terms of understanding the mechanisms of disease development, potentially contributing to the development of pathogenetic therapy at early and intermediate stages of AMD as well as secondary prevention of its complications. The aim of the present: study was to determine sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sP-selectin and MCP-1/CCL2 in blood serum (BS) and tear fluid (TF) of patients with initial (AREDS2) and intermediate (AREDS3) stages of AMD. The study was performed by flow cytometry (CBA) with BD FACS Canto II flow cytometer, USA), using a diagnostic panel based on compatible simplex Flow Cytomix™ test systems (Bender Med System GmbH, Germany) to determine sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sP-selectin and MCP-1/CCL2 thus allowing their simultaneous detection followed by data processing in the FlowCytomix Pro v. 6.0 package (BenderMed Systems GmbH, Germany). We have revealed a tendency to increased serum sVCAM-1 in the AREDS3 group compared to the reference values. When studying tear fluid in the AREDS2 group, a significant increase in MCP-1, sE-selectin concentrations was found ( $p < 0.05$ ), along with a tendency to increased local production of sICAM-1 and sP-selectin ( $p = 0.05$ ) against normal levels. Significant shifts in the AREDS3 group concerned three 3 factors in tear fluid, i.e., sICAM-1, sE-selectin and sP-selectin, that exceeded control levels by 2.5, 5 and 2 times, respectively ( $p < 0.05$ ). The obtained data are important because they presume a role of sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sP-selectin, MCP-1/CCL2 in pathogenesis of the disorder and allows us to suggest a compromised state of blood retinal barrier, thus requiring supplementation of AMD therapy with angioprotectives, anti-inflammatory drugs, and needs further studies.

*Keywords:* age-related macular degeneration, vascular endothelial, dysfunction, inflammation, markers, adhesion molecules, chemokines

### Введение

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является одной из частых причин слепоты и слабовидения у старшей возрастной группы, характеризуется прогрессирующим поражением центральной фотоактивной области сетчатки, имеет тенденцию к неуклонному росту и распространению [23].

Патологический процесс при ВМД имеет, как правило, двусторонний характер: после появле-

ния заболевания вероятность вовлечения парного глаза составляет 10-15% в год [3].

Значительное снижение зрения вплоть до полной его потери наступает при развитии поздней стадии ВМД, варианты терапии которой очень ограничены и представлены антиангиогенными препаратами для борьбы с патологической неоваскуляризацией на глазном дне при влажной форме заболевания.

Лечение ингибиторами ангиогенеза является дорогостоящим, инвазивным (проводится в ре-

жиме повторных интравитреальных инъекций), и далеко не всегда приводит к положительным функциональным результатам [15].

В связи с этим в мире ведется активный поиск способов предотвращения прогрессирования ВМД на ранних этапах ее развития [13].

Возрастная макулодистрофия является мультифакторным заболеванием: помимо возраста, генетической предрасположенности, образа жизни, метаболических расстройств – главных факторов риска, в последнее время особое внимание уделяется тесной взаимосвязи ВМД с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) и ключевым механизмом их патогенеза – эндотелиальной дисфункцией (ЭД) [5, 9, 10].

В норме функционирование эндотелия осуществляются путем регуляции баланса противоположных процессов: тонуса сосудов (вазодилатации/вазоконстрикции), гемостаза (стимуляция/ингибирование факторов коагуляции и фибринолиза), местного воспаления (продукция анти- и провоспалительных молекул) [1].

При длительном действии гемодинамической перегрузки, окислительного стресса, цитокинемии происходит изменение ответа со стороны эндотелиоцитов с тенденцией к доминированию вазоспазма, гемокоагуляции и активации воспалительных механизмов [1, 22].

Основные факторы, отражающие нарушение противовоспалительной функции эндотелия сосудистой стенки, наиболее полно охарактеризованы при изучении патогенеза атеросклероза: в частности показано, что патологически измененный эндотелий продуцирует целый ряд эффекторных молекул, направленных на активацию и рекрутинг лейкоцитов, усиление их взаимодействия с эндотелиальной выстилкой и трансвазацию [22].

Значительное повышение концентраций макрофагального хемоаттрактантного протеина-1 (MCP-1/CCL2), растворимых молекул межклеточной, сосудистой адгезии (sICAM-1, sVCAM-1) и селектинов (sE-selectin, sP-selectin) обнаружены в крови пациентов с ССЗ, что, по данным имеющихся публикаций, отражает степень повреждения эндотелия и может рассматриваться в качестве маркеров прогрессирования патологического процесса в стенке сосуда [14, 24].

Проведение подобных исследований представляется также важным в аспекте сосудистой офтальмопатологии, поскольку эндотелий сосудов является важнейшим элементом нейроваскулярной единицы – структурно-функциональной основы внутренней области гематоретинального барьера (ВГРБ) (подобного гематоэнцефаличе-

скому), обеспечивающего изоляцию нейральной сетчатки от контактов с кровью [19].

Нарушение этого защитного механизма, по мнению Buschini E. и соавт., может привести к потере иммунной привилегии сетчатки, развитию воспалительного каскада и последующего повреждения нейронов [7].

Доказательства ослабления барьерных свойств ВГРБ уже на ранних стадиях ВМД представлены в работе Hudson N. и соавт. [18].

При патогистологическом исследовании *post mortem* глаз пациентов с сухой ВМД Schultz H. и соавт. обнаружено высокое содержание белков плазмы крови в сетчатке, что свидетельствовало о нарушении целостности ВГРБ и прямой связи с прогрессированием заболевания [20].

Изучение ЭД в патогенезе ВМД находится на начальном этапе: в доступной литературе найдена публикация, где приведены убедительные доказательства снижения активности эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), в сети ретинальных и хориоидальных сосудов глаз с ВМД [5].

В целом исследование продукции локальной (в слезной жидкости) и системной продукции (в крови) воспалительных факторов – маркеров дисфункции и хронического воспаления сосудистой стенки у пациентов с ВМД представляется перспективным и может оказать помощь в разработке патогенетической терапии ранней и промежуточной стадий заболевания, а также мер вторичной профилактики его осложнений.

**Цель работы** – исследование воспалительных маркеров активации эндотелия сосудистой стенки в сыворотке крови (СК) и слезной жидкости (СЖ) пациентов с начальной и промежуточной стадиями ВМД.

## Материалы и методы

Данное исследование одобрено положительно комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России (протокол № 53/3 от 8 апреля 2021 года).

На базе взрослого консультативно-поликлинического отделения и отдела иммунологии и вирусологии обследовано 58 человек в возрасте от 43 до 68 лет: среди них 19 мужчин (32,8%), 39 женщин (67,2%).

Согласно клинической классификации AREDS [4], пациенты были распределены на три группы.

I группу составили 26 человек с начальной ВМД (AREDS 2; средний возраст  $53,2 \pm 11,5$  года), II – 14 больных с промежуточной стадией ВМД (AREDS 3; средний возраст  $57,1 \pm 11,8$  года).

18 практически здоровых пожилых людей без офтальмопатологии вошли в группу возрастного контроля (AREDS1; группа риска, средний возраст  $55,7 \pm 12,7$  года).

Критерии включения в исследование: возраст старше 40 лет; отсутствие изменений на глазном дне, признаки начальной или промежуточной стадии ВМД (твердые и мягкие друзы, пигментные миграции, локальные аваскулярные отслойки пигментного эпителия, фокусы «географической атрофии» без захвата фовеа); максимально скорректированная острота зрения (МКОЗ) выше 0,6; внутриглазное давление (ВГД) ниже 21 мм рт. ст.; начальные помутнения хрусталика, не являющиеся причиной снижения зрительных функций.

Критерии исключения из исследования: признаки поздней ВМД (хориоидальная неоваскуляризация (ХНВ), неоваскулярная отслойка пигментного эпителия, рубцовые изменения, «географическая атрофия» с захватом фовеа), офтальмохирургические вмешательства, другие заболевания глаз, являющиеся причиной снижения зрения; тяжелая системная сердечно-сосудистая патология, сахарный диабет, системные воспалительные, в т. ч. аутоиммунные заболевания.

Забор биологических жидкостей и последующее иммунологическое исследование проводилось после получения письменного информированного добровольного согласия пациентов.

Материалом иммунологических исследований служили образцы сыворотки крови (СК;  $n = 58$ ) и слезной жидкости (СЖ;  $n = 63$ ).

Забор биологических жидкостей осуществляли до каких-либо манипуляций, с согласия пациента после разъяснения целей исследования.

СЖ забиралась без стимуляции слезопродукции сухой стерильной пипеткой из нижнего конъюнктивального свода в объеме не менее 40 мкл.

Забор крови выполняли в утренние часы, натощак, из локтевой вены при помощи вакуумных систем в пробирки Vacuette® без активатора свертывания; СК получали согласно стандартным методикам.

До проведения исследований образцы хранили при температуре  $-70^\circ\text{C}$ .

Определение sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sP-selectin и MCP-1/CCL2 в СК и СЖ выполнено методом проточной цитометрии (СВА) (проточный цитометр BD FACS Canto II, США) с помощью мультиплексной панели, сконструированной из совместимых симплексных тест-наборов Human FlowCytomix™ Simplex (Bender MedSystem GmbH, Германия), позволяющей осу-

ществлять одновременную детекцию аналитов, с обработкой данных в пакете FlowCytomix Pro v. 6.0 (BenderMed Systems GmbH, Германия).

Для конструкции мультиплексной панели растворимых молекул использованы наборы реагентов:

– Human VCAM-1 Flow Cytomix Simplex (BMS8232/2FF) (чувствительность 0,9 нг/мл; тип частиц B5).

– Human ICAM-1 Flow Cytomix Simplex (BMS8201FF) (чувствительность 5,3 нг/мл; тип частиц A11).

– Human MCP-1 Flow Cytomix Simplex (BMS8281FF) (чувствительность 2,2 пг/мл; тип частиц A7).

– Human E-selectin Flow Cytomix Simplex (BMS8205FF) (чувствительность 1,2 нг/мл; тип частиц A9).

– Human P-selectin Flow Cytomix Simplex (BMS8219/2FF) (чувствительность 1,2 нг/мл; тип частиц B4).

Оценку результатов выполняли с учетом пределов чувствительности теста. Всего обработано 58 тест-проб СК и 63 образца СЖ.

Статистический анализ проведен с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Сравнительный анализ параметров с распределением отличным от нормального выполнен параметрическими методами. Показатели концентраций изучаемых факторов в биологических жидкостях представлены в формате: Me (min; max), где Me – медиана, min – минимальное и max – максимальное значение в выборке. Для сравнения показателей двух независимых групп применялась Z-аппроксимация U-критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным  $p < 0,05$ .

Концентрации sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sP-selectin и MCP-1/CCL2 в тест-пробах СК и СЖ определяли методом мультиплексного анализа (СВА) на проточном цитометре BD FACS Canto II в программе BD FACS Diva (BD Biosciences, США) с обработкой данных в пакете FCAP Array (Soft Flow, США). Оценку результатов выполняли с учетом пределов чувствительности теста, для каждого определяемого аналита).

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Учитывая распределение части параметров, отличное от нормального, сравнительный анализ проводился непараметрическими методами. Показатели концентраций изучаемых факторов в биологических жидкостях представлены в формате: Me (min; max), где Me – медиана, min –

минимальное, и max – максимальное значение в выборке. Для сравнения показателей двух независимых групп применялась Z-аппроксимация U-критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным  $p < 0,05$ .

## Результаты

Содержание воспалительных факторов активации сосудистого эндотелия определялось в 58 тест-пробах СК и в 63 образцах СЖ у пациентов с ВМД и людей пожилого возраста без офтальмопатологии.

Результаты иммунологического исследования представлены в таблицах 1 и 2 и на рисунках 1, 2, 3.

Исследуемые факторы были выявлены в 100% образцов СК и СЖ.

При исследовании СЖ пациентов с ВМД обнаружено значительное увеличение содержания селектинов по сравнению с возрастным контро-

лем: так, в группе AREDS2 уровень локальной продукции sE-selectin составил 34,4 нг/мл (при минимуме 4,1 и максимуме 316 нг/мл) и практически в 4 раза превосходил значение нормы ( $p < 0,05$ ) (табл. 1). Также в СЖ пациентов с начальной ВМД обнаружена тенденция к повышению концентрации sP-selectin до 28,9 нг/мл против контроля – 14,1 нг/мл.

Аналогичные сдвиги данных показателей, более выраженные, со статистически значимым ростом уровня sP-selectin, отмечались и в группе AREDS 3 ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Статистически значимой разницы в локальной продукции селектинов между группами ВМД не обнаружено; вместе с тем, как видно из таблицы 1, пределы диапазонов изменений концентраций (от минимума к максимуму) отличались: так, в СЖ пациентов группы AREDS 2 (с начальной ВМД) размах значений sE- и sP-selectin был намного шире (табл. 1).

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ АКТИВАЦИИ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ВМД И ГРУППЫ РИСКА**

TABLE 1. CONCENTRATION OF INFLAMMATORY FACTORS OF VASCULAR ENDOTHELIAL ACTIVATION IN THE TEAR FLUID OF AMD PATIENTS AND RISK GROUPS

Показатель Parameter	Основные группы Main groups Me min-max		
	Контроль Control	ВМД AMD	
	AREDS1 (группа риска) AREDS1 (risk group) (n = 23)	I AREDS2 (ранняя стадия) I AREDS2 (early AMD) (n = 26)	II AREDS3 (промежуточная стадия) II AREDS3 (intermediate AMD) (n = 14)
sP-selectin, нг/мл sP-selectin, ng/mL	14,13 (9,8-21,3)	28,9# (6,5-104,0)	28,8* (23,4-29,7)
sE-selectin, нг/мл sE-selectin, ng/mL	8,64 (2,3-18,1)	34,4* 4,1-316,0	43,0* (42,4-43,8)
MCP-1/CCL2, пг/мл MCP-1/CCL2, pg/mL	157,2 (83,9-357,0)	491* (104,8-1127,0)	302 (219-384)
sVCAM-1, нг/мл sVCAM-1, ng/mL	5,43 (0,92-14,00)	6,0 (1,1-35,2)	1,04 (0,94-1,90)
sICAM-1, нг/мл sICAM-1, ng/mL	9,8 (6,3-24,5)	22 # (7,4-159,0)	28,3* (25,9-30,8)

Примечание. n – количество протестированных проб СЖ в группе; \* – достоверность различия в группах пациентов с ВМД по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); # – тенденция к различию в группах ВМД по сравнению с контролем.

Note. n, the number of tested TF samples in the group; \*, the significance of the difference in the groups of patients with AMD compared with the control ( $p < 0.05$ ); #, the tendency to the difference in the AMD groups compared to the control.

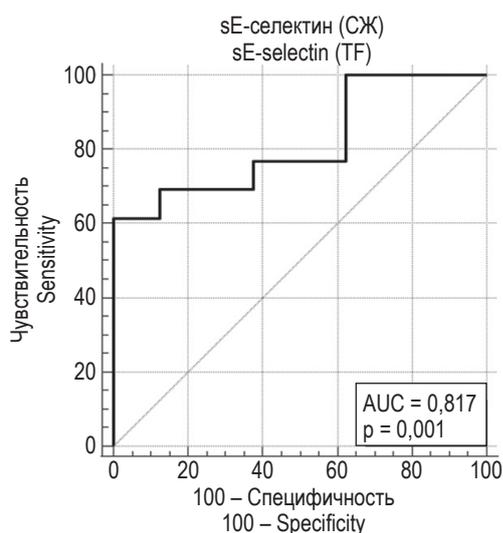
**ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ АКТИВАЦИИ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ВМД И ГРУППЫ РИСКА**

TABLE 2. THE CONTENT OF INFLAMMATORY FACTORS OF VASCULAR ENDOTHELIAL ACTIVATION IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH AMD AND RISK GROUPS

Показатель Parameter	Основные группы Main groups Me min-max		
	Контроль Control	ВМД AMD	
	AREDS1 (группа риска) AREDS1 (risk group) (n = 18)	I AREDS2 (ранняя стадия) I AREDS2 (early AMD) (n = 26)	II AREDS3 (промежуточная стадия) II AREDS3 (intermediate AMD) (n = 14)
sP-selectin, нг/мл sP-selectin, ng/mL	341 (242,0-454,8)	285 (242-397)	369,8 (352-388)
sE-selectin, нг/мл sE-selectin, ng/mL	65,7 (14,9-132,5)	89,6 (55-147)	97,6 (88,4-107,0)
MCP-1/CCL2, пг/мл MCP-1/CCL2, pg/mL	517 (228,0-853,7)	504 (142-698)	718 (541-895)
sVCAM-1, нг/мл sVCAM-1, ng/mL	640 (257,7-1460,0)	1461 (457-1468)	1243# (1026-1461)
sICAM-1, нг/мл sICAM-1, ng/mL	130 (37,4-280,0)	114,5 (114,5-258,5)	175,6 (53,8-297,0)

Примечание. n – количество протестированных проб СК в группе; # – тенденция к различию в группах ВМД по сравнению с контролем.

Note. n, the number of tested BS samples in the group; #, the tendency to the difference in the AMD groups compared to the control.



**Рисунок 1. Результаты анализа информативности определения sE-selectin в СЖ на ранней и промежуточной стадии ВМД**

Figure 1. The results of the analysis of the informative value of the determination of sE-selectin in TF at the early and intermediate stages of AMD

В ходе анализа содержания данных факторов в СК не выявлено достоверных сдвигов относительно возрастной нормы (табл. 2).

Как известно, молекулы селектинов представляют собой  $Ca^{2+}$ -зависимые гликопротеины и относятся к классу адгезивных белков, из которых P-selectine продуцируется и депонируется в мегакариоцитах (далее в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов) и эндотелии, а синтез E-selectine является индуцибельным и происходит исключительно в эндотелиальных клетках.

Эти белки могут функционировать не только в качестве мембраносвязанных молекул на поверхности активированных клеток, но и при их отщеплении в виде растворимых форм, называемых sP-selectin и sE-selectin – продуктов протеолиза – фрагментов, в которых отсутствует трансмембранный участок.

При активации сосудистой стенки или повреждении ткани селектины опосредуют начальный этап вовлечения лейкоцитов в воспалительный процесс и взаимодействие с эндотелием [6].

Показано, что Е- и Р-селектин появляются на поверхности эндотелиальных клеток при напряжении сдвига, воздействии активных форм кислорода, цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и других медиаторов воспаления [16, 17].

Повышенное содержание адгезивных белков выявлено в крови пациентов с субклинической ишемической болезнью сердца и атеросклерозом сонных артерий: эти данные, по мнению Zhang J., указывают на то, что E-selectin может быть вовлечен в ранние стадии атеросклеротического поражения сосудов [24].

В нашем исследовании значимо высокие концентрации Е- и Р-selectin, обнаруженные в СЖ пациентов, свидетельствуют о локальной активации сосудистого эндотелия на ранней и промежуточной стадиях заболевания, которая могла быть вызвана действием целого ряда провоспалительных медиаторов, которые активно секретируются интраокулярно при ВМД: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8/CXCL8, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  [2].

Нельзя исключить, что значимый рост уровня Р-selectin в СЖ пациентов с более выраженными патологическими изменениями на глазном дне, характерными для стадии AREDS 3, может быть связан с недостаточной активностью NO-синтазы [5] и косвенно согласуется с данными работы Chaitanya G.V. и соавт., показавших, что регуляция экспрессии этого селектина осуществляется оксидом азота, однако данное положение нуждается в дальнейших исследованиях [8].

МСР-1/ССL2-моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 является важнейшим регулятором активации, рекрутинга и трансвазации лейкоцитов, продуцируется клетками эпителиев, гладкой мускулатуры, моноцитами/макрофагами, фибробластами, астроцитами, микроглией и эндотелиальными клетками.

Данные многочисленных клинических и экспериментальных исследований свидетельствуют о его ключевом участии в поражении сосудистой стенки при атеросклерозе [11].

Усиление внутриглазной продукции МСР-1/ССL2 значительной степени связывают с влажной ВМД и проникающими в область неоваскуляризации лейкоцитами [12].

Статистически значимое повышение локальной концентрации МСР-1/ССL2 в группе AREDS 2 до 491 пг/мл ( $p < 0,05$ ), обнаруженное в нашем исследовании, скорее всего является результирующей вкладом множества клеток: в пользу этого заключения свидетельствует и широкий размах значений показателя (табл. 1); хотя нельзя исключить, что при начальных изменениях в макулярной зоне основным продуцентом ука-

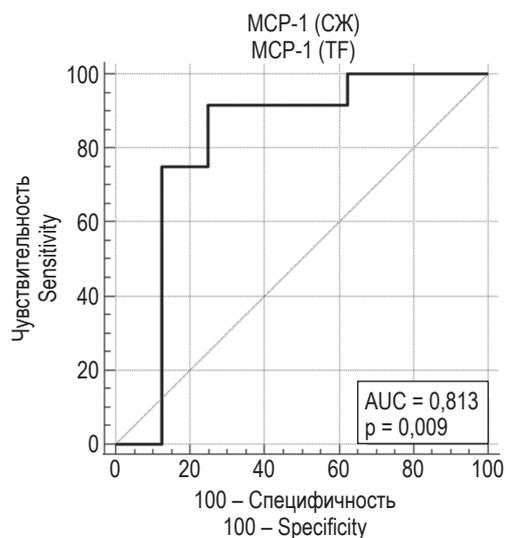


Рисунок 2. Результаты анализа информативности определения МСР-1/ССL2 в СЖ на ранней и промежуточной стадии ВМД

Figure 2. The results of the analysis of the informative value of the determination of MCP-1/CCL2 in TF at the early and intermediate stages of AMD

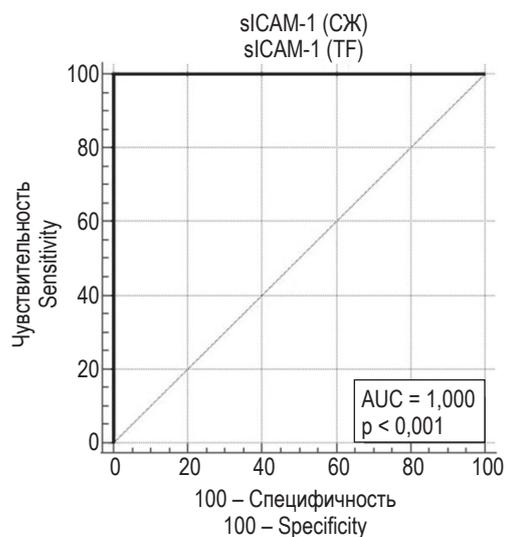


Рисунок 3. Результаты анализа информативности определения sICAM-1 в СЖ на ранней и промежуточной стадии ВМД

Figure 3. The results of the analysis of the informative value of the determination of sICAM-1 in TF at the early and intermediate stages of AMD

занного цитокина может быть активированный продуктами оксидативного стресса (ведущего патогенетического фактора ВМД) сосудистый эндотелий.

Содержание МСР-1/ССL2 в СК пациентов обеих клинических групп ВМД находилось в пределах установленной возрастной нормы (табл. 2).

Наряду с селектинами и медиаторами воспаления большое значение при ЭД и поражении сосудистой стенки имеют молекулы сосудистой и межклеточной адгезии – VCAM-1 и ICAM-1, посредством которых усиливается адгезия активированных лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и последующий трансвазальный выход.

В настоящее время sICAM-1 вместе с IL-6 (интерлейкин-6) и CRP (С-реактивный белок), признаны молекулярными маркерами, связанными с атеросклерозом и его прогрессированием [21].

## Обсуждение

При анализе данных нашей работы обнаружена тенденция к усилению локальной продукции sICAM-1 стадии AREDS2 относительно нормы и статистически значимое увеличение содержания этого белка в СЖ пациентов с промежуточной ВМД (AREDS3), в 3 раза превышающего таковое в группе возрастного контроля ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Усиление локальной продукции ICAM-1 можно объяснить воздействием многочисленных синтезируемых цитокинов, формирующих интраокулярную провоспалительную среду при ВМД и способных активировать сосудистый эндотелий: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, TNF $\alpha$  и пр. [2].

Сравнительный анализ результатов исследования основных групп с ВМД не выявил статистически значимых различий в локальных концентрациях sICAM-1, однако пределы диапазонов изменений продукции данного белка (от минимума к максимуму) отличались: так, в СЖ пациентов группы AREDS 2 (с начальной ВМД) размах значений sICAM-1 был намного шире (табл. 1).

Тенденция к повышению концентрации sVCAM-1 в СК пациентов, обнаруженная в группе AREDS 3, позволяет думать о подключении системных механизмов активации эндотелия на продвинутых стадиях заболевания (табл. 2).

Таким образом, в ходе исследования в СЖ пациентов со начальной и промежуточной ВМД были выявлены значимые изменения как ранних (sE- и sP-selectin, MCP-1/CCL2), так и поздних (sICAM-1) воспалительных маркеров активации эндотелия, свидетельствующие об участии локальных сосудистых механизмов в патогенезе заболевания.

Для определения возможной диагностической ценности определения sE-, sP-selectin, MCP-1/CCL2, и sICAM-1 в СЖ был проведен ROC-анализ построением операционных кривых и оценкой площади под ними, на основании которых были выявлены потенциальные локальные биомаркеры сосудистой активации при ранней ВМД (рис. 1, 2, 3).

Как видно из рисунков 1, 2, 3, площадь под кривой AUC для sE-selectin составила 0,817 ( $p = 0,001$ ), MCP-1/CCL2 – 0,813 ( $p = 0,009$ ), для sICAM-1 – 1,0 ( $p < 0,001$ ).

## Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования представлена характеристика изменений воспалительных факторов активации сосудистой стенки, связанных с изменениями на глазном дне при начальной и промежуточной стадиях ВМД.

Полученные данные представляют важными, так как доказывают участие sICAM-1, sVCAM-1, sE-selectin, sP-selectin, MCP-1/CCL2 в патогенезе заболевания, а повышение локальных концентраций этих белков позволяет думать о комприментации гематоретинального барьера, необходимости дополнения курса терапии ВМД назначением препаратов ангиопротекторного, противовоспалительного действия и нуждается в дальнейшем изучении.

## Список литературы / References

1. Васина Л.В., Петрищев Н.Н., Власов Т.Д. Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры // Регионарное кровообращение и микроциркуляция, 2017. Т. 16, № 1. С. 4-15. [Vasina L.V., Petrishchev N.N., Vlasov T.D. Endothelial dysfunction and its main markers. *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya = Regional Blood Circulation and Microcirculation*, 2017, Vol. 16, no. 1, pp. 4-15. (In Russ.)]
2. Нероев В.В., Балацкая Н.В., Нероева Н.В., Кармокова А.Г., Рябина М.В., Куликова И.Г. Скрининг цитокинов в сыворотке крови и слезной жидкости при влажной и атрофической формах возрастной макулярной дегенерации // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 1. С. 157-170. [Neroev V.V., Balatskaya N.V., Neroyeva N.V., Karmokova A.G., Ryabina M.V., Kulikova I.G. Screening of cytokines in blood serum and tear fluid in wet and atrophic forms of age-related macular degeneration. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 1, pp. 157-170. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-SOC-2351.

3. Пестрякова Я.Ф., Рыбченко А.А., Шабанов Г.А., Запорожец Т.С. Закономерности изменений биоэлектрической активности головного мозга при возрастной макулярной дегенерации // Тихоокеанский медицинский журнал, 2017. № 2. С. 26-29. [Pestryakova Ya.F., Rybchenko A.A., Shabanov G.A., Zaporozhets T.S. Patterns of changes in bioelectrical activity of the brain during age-related macular degeneration. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2017, no. 2, pp. 26-29. (In Russ.)] doi: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.2.26-29.
4. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, betacarotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS. *Arch. Ophthalmol.*, 2001, Vol. 119, pp. 1417-1436.
5. Bhutto I.A., Baba T., Merges C., McLeod D.S., Luttly G.A. Low nitric oxide synthases (NOSs) in eyes with age-related macular degeneration (AMD). *Exp. Eye Res.*, 2010, Vol. 90, no. 1, pp. 155-167.
6. Binder F.P.C., Ernst B. E- and P-selectin: differences, similarities and implications for the design of P-selectin antagonists. *Chimia (Aarau)*, 2011, Vol. 65, no. 4, pp. 210-213.
7. Buschini E., Piras A., Nuzzi R., Vercelli A. Age related macular degeneration and drusen: neuroinflammation in the retina. *Prog. Neurobiol.*, 2011, Vol. 95, no. 1, pp. 14-25.
8. Chaitanya G.V., Cromer W., Wells S., Jennings M., Mathis J.M., Minagar A., Alexander J.S. Metabolic modulation of cytokine-induced brain endothelial adhesion molecule expression. *Microcirculation*, 2012, Vol. 19, no. 2, pp. 155-165.
9. Chakravarthy U., Wong T.Y., Fletcher A., Piau E., Evans C., Zlateva G., Buggage R., Pleil A., Mitchell P. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.*, 2010, Vol. 10, 31. doi: 10.1186/1471-2415-10-31.
10. Clemons T.E., Milton R.C., Klein R., Seddon J.M., Ferris F.L. Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology*, 2005, Vol. 112, no. 4, pp. 533-539.
11. Combadiere C., Potteaux S., Rodero M., Simon T., Pezard A., Esposito B., Merval R., Proudfoot A., Tedgui A., Mallat Z. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 2008, Vol. 117, no. 13, pp. 1649-1657.
12. Du Z., Wu X., Song M., Li P., Wang L. Oxidative damage induces MCP-1 secretion and macrophage aggregation in age-related macular degeneration (AMD). *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2016, Vol. 254, no. 12, pp. 2469-2476.
13. Dunbar H.M.P., Behning C., Abdirahman A., Higgins B.E., Binns A.M., Terheyden J.H., Zakaria N., Poor S., Finger R.P., Leal S., Holz F.G., Schmid M., Crabb D.P., Rubin G.S., Luhmann U.F.O. Repeatability and discriminatory power of chart-based visual function tests in individuals with age-related macular degeneration: A MACUSTAR Study Report. *JAMA Ophthalmol.*, 2022, Vol. 140, no. 8, pp. 780-789.
14. Edlinger C., Lichtenauer M., Wernly B., Pistulli R., Paar V., Prodingler C., Krizanic F., Thieme M., Kammler J., Jung C., Hoppe U.C., Schulze P.C., Kretzschmar D. Disease-specific characteristics of vascular cell adhesion molecule-1 levels in patients with peripheral artery disease. *Heart Vessels*, 2019, Vol. 34, no. 6, pp. 976-983.
15. Horani M., Mahmood S., Aslam T.M. A review of macular atrophy of the retinal pigment epithelium in patients with neovascular age-related macular degeneration: What is the link? Part II. *Ophthalmol. Ther.*, 2020, Vol. 9, no. 1, pp. 35-75.
16. Hossain M., Qadri S.M., Liu L. Inhibition of nitric oxide synthesis enhances leukocyte rolling and adhesion in human microvasculature. *J. Inflamm. (Lond.)*, 2012, Vol. 9, 28. doi: 10.1186/1476-9255-9-28.
17. Huang R.B., Gonzalez A.L., Eniola-Adefeso O. Laminar shear stress elicit distinct endothelial cell E-selectin expression pattern via TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  activation. *Biotechnol. Bioeng.*, 2013, Vol. 110, no. 3, pp. 999-1003.
18. Hudson N., Celkova L., Hopkins A., Greene C., Storti F., Ozaki E., Fahey E., Theodoropoulou S., Kenna P.F., Humphries M.M., Curtis A.M., Demmons E., Browne A., Liddie S., Lawrence M.S., Grimm C., Cahill M.T., Humphries P., Doyle S.L., Campbell M. Dysregulated claudin-5 cycling in the inner retina causes retinal pigment epithelial cell atrophy. *JCI Insight*, 2019, Vol. 4, no. 15, e130273. doi: 10.1172/jci.insight.130273.
19. Nian S., Lo A.C.Y., Mi Y., Ren K., Yang D. Neurovascular unit in diabetic retinopathy: pathophysiological roles and potential therapeutical targets. *Eye Vis. (Lond.)*, 2021, Vol. 8, 15. doi: 10.1186/s40662-021-00239-1.
20. Schultz H., Song Y., Baumann B.H., Kappahn R.J., Montezuma S.R., Ferrington D.A., Dunaief J.L. Increased serum proteins in non-exudative AMD retinas. *Exp. Eye Res.*, 2019, 186, 107686. doi: 10.1016/j.exer.2019.05.026.
21. Tzoulaki I., Murray G.D., Lee A.J., Rumley A., Lowe G.D.O., Gerald F., Fowkes R. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation*, 2005, Vol. 112, no. 7, pp. 976-983.

22. Vasan R.S. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation*, 2006, Vol. 113, pp. 2335-2362.
23. Wong W.L., Su X., Li X., Cheung C.M., Klein R., Cheng C.Y., Wong T.Y. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health*, 2014, Vol. 2, no. 2, pp. e106-e116.
24. Zhang J. Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases. *Rev. Cardiovasc. Med.*, 2022, Vol. 23, no. 2, 73. doi: 10.31083/j.rcm2302073.

---

**Авторы:**

**Балацкая Н.В.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник, начальник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Воробьева Е.П.** — младший научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Куликова И.Г.** — биолог вирусологической-микробиологической лаборатории отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Андрюшин А.Е.** — научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Balatskaya N.V.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Head, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Vorobyova E.P.**, Junior Researcher, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Kulikova I.G.**, Biologist, Virology-Microbiology Laboratory, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Andryushin A.E.**, Researcher, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 16.11.2023  
Отправлена на доработку 13.02.2024  
Принята к печати 13.11.2024

---

Received 16.11.2023  
Revision received 13.02.2024  
Accepted 13.11.2024

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТКИ С ТРИЖДЫ НЕГАТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПОМОЩЬЮ АДОПТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

Абакушина Е.В.<sup>1,2</sup>, Журиков Р.В.<sup>2</sup>, Румянцев С.А.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>2</sup> ООО «Текон Медицинские Приборы», Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Резюме.** Рак молочной железы (РМЖ) является распространенным злокачественным новообразованием и второй причиной смертности от рака у женщин. Адоптивная иммунотерапия (АИТ) с использованием активированных лимфоцитов представляет собой перспективное направление лечения пациентов. Пациентка О., 63 года, в октябре 2021 года установлен диагноз «инfiltrативный протоковый рак левой молочной железы T3NxM0, Grade 2, тройной негативный подтип, СНЕК-2 ассоциированный». По данным ПЭТ/КТ размер опухоли 43 × 21 мм. Предложено проведение АИТ цитокин-индуцированными киллерами (ЦИК). Для получения ЦИК мононуклеарные клетки, выделенные из периферической крови, культивировали в присутствии цитокинов на протяжении 10-14 дней. АИТ проводилась внутривожно паравerteбрально 1 раз в неделю, без перерыва до настоящего времени. На фоне АИТ проводились ПЭТ/КТ, МРТ, УЗИ и иммунофенотипирование лимфоцитов крови. За время наблюдения с ноября 2021 года было проведено 7 курсов АИТ. Через 6 месяцев после начала АИТ по данным ПЭТ/КТ отмечалась положительная динамика: снижение активности образования ЛМЖ SUV<sub>max</sub> 16,76 (ранее SUV<sub>max</sub> 28,74) с сохранением размеров опухоли, ранее выявленных признаков остеобластических изменений в позвоночнике на уровне Th12 не выявлено. По результатам ПЭТ/КТ в ноябре 2022 года отмечалось некоторое увеличение размеров образования ЛМЖ до 49 × 35 мм (SUV<sub>max</sub> 16,82), при этом был обнаружен очаг фиксации радиофармпрепарата в теле L2 позвонка и сигмовидной кишке. В декабре 2022 года проведена радикальная мастэктомия. Установлен терапевтический патоморфоз 2-й степени, размер опухоли 5,3 см, край резекции без клеток опухоли, в 2 из 14 лимфатических узлах обнаружены метастазы. С целью профилактики рецидива была продолжена АИТ, за год с января 2023 года суммарно было введено 790 млн ЦИК. По данным МРТ в марте 2023 года данных за рецидив не получено. В августе 2024 года очаг в подвздошной кости

### Адрес для переписки:

Абакушина Елена Вячеславовна  
ООО «Текон Медицинские Приборы»  
123298, Россия, Москва, ул. 3-я Хорошевская, 16, корп. 2.  
Тел.: 8 (495) 730-41-12 (доб. 827).  
E-mail: abakushina@mail.ru

### Address for correspondence:

Elena V. Abakushina  
LLC "Tecon Medical Devices"  
16 3<sup>rd</sup> Khoroshevskaya St, Bldg 2  
Moscow  
123298 Russian Federation  
Phone: +7 (495) 730-41-12 (acc. 827).  
E-mail: abakushina@mail.ru

### Образец цитирования:

Е.В. Абакушина, Р.В. Журиков, С.А. Румянцев  
«Результаты лечения пациентки с трижды  
негативным раком молочной железы с помощью  
адоптивной иммунотерапии» // Медицинская  
иммунология, 2025. Т. 27, № 4. С. 873-880.  
doi: 10.15789/1563-0625-TOI-3125

© Абакушина Е.В. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

E.V. Abakushina, R.V. Zhurikov, S.A. Rumiantsev  
“Treatment outcome in a patient with triple-negative breast  
cancer using adoptive immunotherapy”, *Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 4,  
pp. 873-880.  
doi: 10.15789/1563-0625-TOI-3125

© Abakushina E.V. et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License  
DOI: 10.15789/1563-0625-TOI-3125

сохраняется. Пациентка направлена на лучевую терапию. Медиана общей выживаемости больных с ТНРМЖ составляет 10,2 месяца. Средняя продолжительность жизни больных с наличием метастазов составляет менее 1 года. В описанном клиническом случае с момента постановки диагноза прошло 34 месяца, что свидетельствует об эффективном сочетании АИТ с хирургическим методом лечения. Все это позволяет сделать вывод о высоком потенциале эффективности АИТ ЦИК у больных с ТНРМЖ. Применение АИТ ЦИК в сочетании с другими методами лечения увеличит эффективность терапии и общую выживаемость больных.

*Ключевые слова:* рак молочной железы, адоптивная иммунотерапия, цитокин-индуцированные клетки-киллеры, НК-клетки, клеточная терапия, комбинированная терапия

## TREATMENT OUTCOME IN A PATIENT WITH TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER USING ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY

Abakushina E.V.<sup>a,b</sup>, Zhurikov R.V.<sup>b</sup>, Rumiantsev S.A.<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> National Medical Research Center of Endocrinology, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> LLC "Tecon Medical Devices", Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Breast cancer (BC) is the most common malignant neoplasm in women. Adoptive immunotherapy (AIT) using activated lymphocytes is a promising approach to the treatment. Patient O., 63 years old, was diagnosed in October 2021 with infiltrating ductal carcinoma of left breast T3NxM0, Grade 2, triple negative subtype, CHEK-2 associated. According to PET/CT, the tumor size was 43 × 21 mm. AIT with cytokine-induced killers (CIK) was administered. In order to produce CIK, mononuclear cells were isolated from peripheral blood and cultured in presence of cytokines for 10-14 days. AIT was performed by intradermal injections paravertebrally once a week up to present date. In the course of AIT, PET/CT, MRI, ultrasound and immunophenotyping of blood lymphocytes were performed. 7 courses of AIT were administered since November 2021. Six months after starting AIT, positive dynamics was noted as proven by PET/CT data: a decreased activity of tumor in left mammary gland (LMG) with SUVmax of 16.76 (previously, SUVmax 28.74) while maintaining the size. Moreover, previously identified signs of osteoblastic changes in spine at Th12 level were not detected. According to PET/CT results in November 2022, a slight increase in size of LMG formation up to 49 × 35 mm (SUVmax, 16.82) was noted, while an area of the radiopharmaceutical accumulation was detected in the body of the L2 vertebra and sigmoid colon. Radical mastectomy was performed in early December 2022. The tumor size was 5.3 cm, the resection margin was free of tumor cells, metastases were found in 2 of 14 lymph nodes. In order to prevent relapse, AIT was continued: 790 million CIKs were administered during a year. According to MRI data in March 2023, there was no relapse. In August 2024, the lesion in the ileum still remains. The median overall survival of patients with TNBC is 10.2 months. The average life expectancy of patients with metastases is less than 1 year. In the presented clinical case, 34 months have passed since the diagnosis, thus indicating an effective combination of AIT with surgical treatment. We conclude that AIT CIKs has a high potential for treatment of patients with TNBC.

*Keywords:* breast cancer, adoptive immunotherapy, cytokine-induced killer cells, NK cells, cell therapy, combination therapy

Статья подготовлена на основании результатов, полученных в ходе реализации Соглашения о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня, выполняющих исследования и разработки по приоритетам на-

учно-технологического развития от 20 апреля 2022 года № 075-15-2022-310.

### Введение

Тройной негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) составляет от 15% до 20% всех случаев РМЖ [14]. Он имеет более высокую частоту

рецидивов, метастатический потенциал и более низкую общую выживаемость по сравнению с другими видами РМЖ [9].

Если говорить о молекулярных особенностях, то опухолевые клетки при ТНРМЖ не экспрессируют рецепторы эстрогена, прогестерона или рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>) [12]. В связи с этим эндокринное лечение и таргетные препараты являются неэффективными, а наиболее распространенным методом лечения является химиотерапия [5]. ТНРМЖ — это подтип с лучшим ответом на стандартные схемы химиотерапии, такие как таксаны или антрациклины. Однако менее 30% пациентов с ТНРМЖ достигают полного ответа, а показатели рецидивов и смертности остаются выше, чем у пациентов с другими подтипами РМЖ [7].

При этом предоперационная химиотерапия помогает проводить адьювантное лечение, позволяя более точно оценить прогноз и сократить объем хирургического вмешательства. В связи с этим выбор тактики ведения пациентов с ТНРМЖ является сложной клинической задачей и диктует необходимость поиска новых подходов к терапии. В последние десятилетия в терапии рака большое внимание уделяется иммунотерапии. Лечение тройного негативного РМЖ является сложной задачей; молекулярно-таргетная терапия в большинстве случаев неэффективна, а стандартное лечение отсутствует. Новые знания в области клеточной иммунологии и иммунных взаимодействий опухоль-хозяин привели к интересным разработкам эффективных иммунотерапевтических подходов, основанных на терапии и модуляции микроокружения опухоли, включая блокаду иммунных контрольных точек, индукцию активации цитотоксических Т-лимфоцитов, адоптивный перенос клеток [6].

Зарубежные авторы отмечают, что около половины зарегистрированных клинических исследований сосредоточены на терапии, связанной с блокировкой иммунных контрольных точек [7]. Из них более 100 клинических исследований уже вступили в фазу II или фазу III, что означает, что иммунотерапия является важной тенденцией в лечении ТНРМЖ.

Адоптивная клеточная иммунотерапия (АИТ) предлагает новый вариант лечения ТНРМЖ. АИТ в основном включает терапию опухолеинфильтрирующими лимфоцитами, дендритными клетками, Т-лимфоцитами, цитокин-индуцированными киллерами (ЦИК), а также CAR-T и NK-лимфоцитами, и все эти методологии имеют схожие принципы. В настоящее время

CAR-клетки широко исследуются при солидных опухолях, но они все еще находятся на I фазе клинических испытаний при ТНРМЖ.

Хотя эти методы лечения еще не достигли такой же степени клинической эффективности, как адоптивная Т-клеточная терапия, ранние доклинические и клинические успехи терапии активированными NK-клетками привели к увеличению энтузиазма в развитии их потенциала — гипотеза, лежащая в основе этой новой области, уходит корнями в наблюдения в клинике трансплантологии примерно 20 лет назад [11]. Ведется большое количество клинических испытаний иммунотерапии NK-клетками для лечения солидных опухолей [1, 8]. Способность NK-клеток воздействовать на опухолевые клетки делает их привлекательными эффекторами для иммунотерапии рака. На сегодняшний день существует несколько направлений в использовании NK-клеток: аутологичные, аллогенные, геномодифицированные или CAR [2, 13]. При всех плюсах и минусах каждого из направлений делается ставка на перспективы использования аллогенных NK-клеток.

**Целью** данного исследования была оценка эффективности лечения пациентки с ТНРМЖ с помощью АИТ.

## Материалы и методы

Пациентка О.Н., 63 года, в октябре 2021 года установлен диагноз «инфильтративный протоковый рак левой молочной железы T3NхM0, Grade 2, тройной негативный подтип, СНЕК-2 ассоциированный». В анамнезе базальноклеточный рак кожи параорбитальной области справа. Проведена ФДТ в 2023 году. Злокачественное новообразование (ЗНО) щитовидной железы, хирургическое лечение в 2009 году. Радиойодтерапия в 2010 году. Рак шейки матки. Экстирпация матки с предатками в 2004 году. II клиническая группа. От полихимиотерапии пациентка отказалась. Была предложена АИТ ЦИК, которая продолжается до настоящего времени.

Для получения ЦИК периферические мононуклеарные клетки культивировались в присутствии цитокинов (IL-2 и IL-15 по 250 МЕ/мл) на протяжении 10-14 дней [3]. АИТ проводилась внутривенно паравerteбрально 1 раз в неделю, без длительного перерыва в лечении. На фоне АИТ проводились ПЭТ/КТ, МРТ, УЗИ и иммунофенотипирование лимфоцитов крови. Фенотип лимфоцитов оценивали с помощью проточного цитометра Amnis ImageStream X Mk II (Luminex, США) на этапах лечения. Окрашивание прово-

дили при 25 °С в темноте в течение 15 минут. После этого клетки промывали двукратно в 1хPBS. Для стандартизации процессов сбора и анализа данных была подобрана оптимальная концентрация клеток в образце – 500 000 событий. С каждого образца собирали не менее 15 000 событий (изображений). Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения IDEAS v6.3 (Luminex, США). Для изучения фенотипа использовалась панель антител для проточной цитометрии, включающую такие маркеры, как 7AAD и анти CD45, CD3, CD56, CD16 (BioLegend, США).

Исследование проводилось согласно протоколу локального этического комитета ФГАО ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России № 218 от 16 мая 2022 года.

## Результаты и обсуждение

Осенью 2021 года пациентка самостоятельно выявила у себя образование в левой молочной железе, по поводу чего обратилась к онкологу. По результатам маммографии от 13.10.2021 года в левой молочной железе на границе верхних квадрантов было выявлено образование, размерами 3,8 × 2,8 см и 2,6 × 2,8 см с включениями

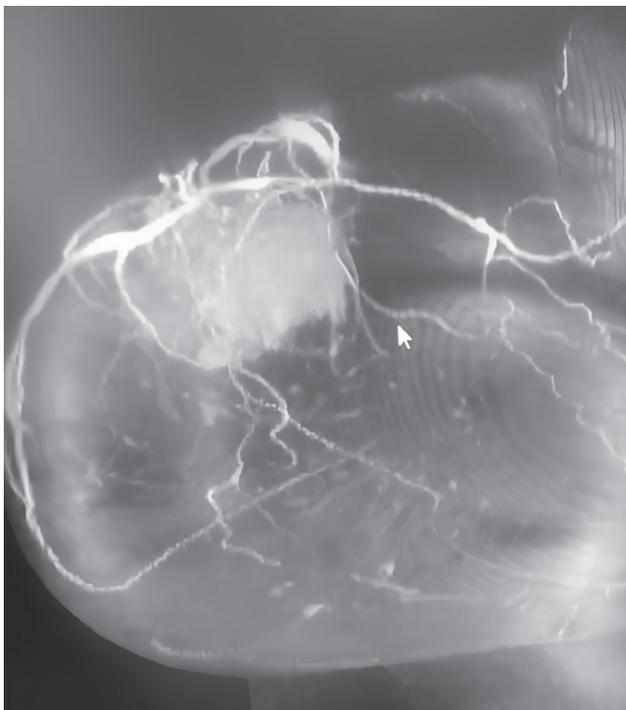


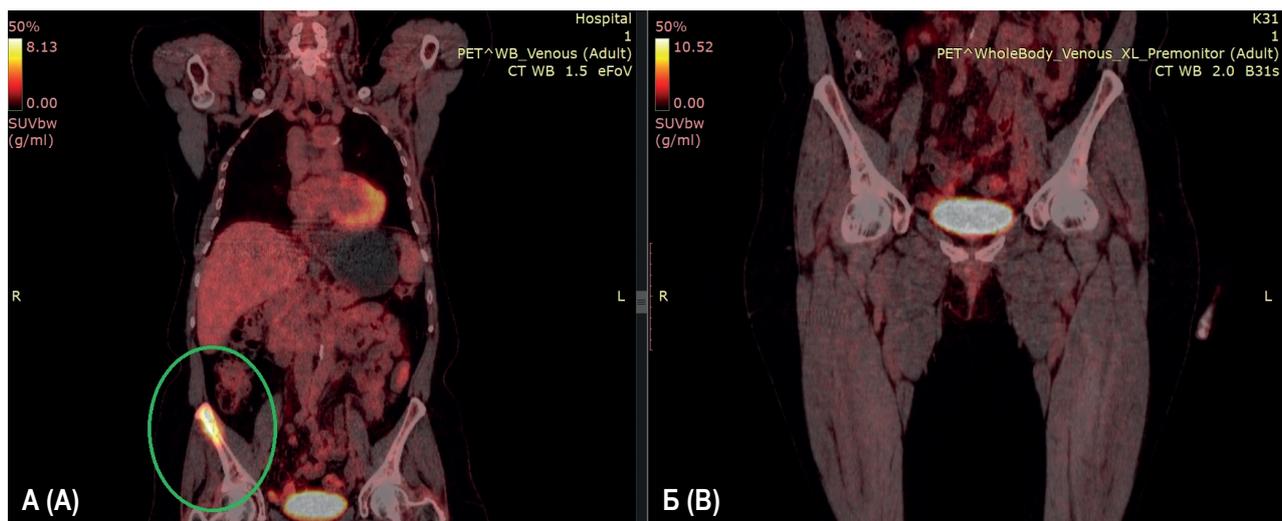
Рисунок 1. МРТ-картина молочной железы с сосудистым режимом от 27.06.2022

Figure 1. MR angiography of a mammary gland 27.06.2022

микрокальцинатов. Аксиллярные лимфоузлы определялись частично до 1 см. По данным УЗИ слева на границе верхних квадрантов выявлялось образование с неровными контурами с включением микрокальцинатов, размерами 4,6 × 2 см, гиперваскулярное, под ЦДК. Аксиллярные лимфоузлы справа не были изменены, слева – с увеличенным корковым слоем 1,6 × 0,5 см. По результатам CORE биопсии от 14.10.2021 было обнаружено ЗНО молочной железы инфильтративный протоковый рак NOS, G2 (Nottingham Grading Score – 7), по ИГХ исследованию реакции с антителами к рецепторам эстрогенов, прогестерона и HER2neu не обнаружено (0 баллов), Ki67 положительна в 27% ядер опухолевых клеток. Выявлена мутация СНЕК-2. От проведения химиотерапии больная отказалась. В ноябре 2021 года была начата АИТ в режиме 1 раз в неделю. За год проведено 3 курса АИТ, суммарно введено 225 млн ЦИК. На фоне АИТ отмечалась местная гиперемия и гриппоподобный синдром, иных побочных эффектов не выявлялось.

По данным ПЭТ/КТ от 06.12.2021 выявлено образование ЛМЖ до 43 × 21 мм (SUVmax 28,74), в легких определялись единичные узелки до 7,5 мм, в печени – гиподенсивные образования до 2 мм, вероятно доброкачественной природы, в T12 – диффузная активность, вероятно, реактивного характера. Через 6 месяцев после начала АИТ по данным ПЭТ/КТ от 14.06.2022 отмечалась положительная динамика: снижение активности образования ЛМЖ SUVmax 16,76 (ранее SUVmax 28,74) с сохранением прежних размеров, ранее выявленных признаков остеобластических изменений в позвоночнике на уровне Th12 не выявлено. В октябре 2022 года перенесла COVID-19. Уровень антител превышал верхнюю границу в 2 раза. На МРТ образование сохранялось (рис. 1).

По результатам ПЭТ/КТ в ноябре 2022 года отмечалось некоторое увеличение размеров образования ЛМЖ до 49 × 35 мм (SUVmax 16,82), при этом был обнаружен очаг фиксации радиофармпрепарата в теле L2-позвонка и сигмовидной кишке. В начале декабря 2022 года проведено хирургическое лечение в объеме радикальной мастэктомии слева. Из протокола патологоанатомического исследования от 15.12.2022 подтвержден инвазивный протоковый РМЖ 3-й степени злокачественности по Nottingham Grading System (Grade 3), терапевтический патоморфоз 2-й степени по Е.Ф. Лушникову. Хотя пациентке не проводилась химиотерапия, а только АИТ цитокин-индуцированными клетками-киллерами, что, вероятно, тоже приводит к развитию те-



**Рисунок 2.** Изображения, полученные после проведения ПЭТ (А) / КТ (Б) от 21.11.2023

**Примечание.** Слева видно накопление РФП в проекции крыла правой подвздошной кости. На КТ данный участок не визуализируется.

Figure 2. PET (A) / CT (B) images 21.11.2023

Note. On the left side of the picture there is accumulation of a radiopharmaceutical agent in projection of a wing of ilium. CT scan doesn't visualize this area.

рапевтического патоморфоза. Класс остаточной опухоли: RCB III (выраженная остаточная опухоль). Максимальный размер опухоли 5,3 см. Инвазии эпидермиса нет, имеется периневральная и сосудистая инвазия. Край резекции ткани молочной железы без опухоли. Вне опухоли в ткани железы липоматоз, очаговый фиброз, скопления микрокальцинатов. В 2 из 14 лимфатических узлах обнаружены метастазы РМЖ.

Через 2 недели после хирургического вмешательства была возобновлена АИТ. Проводилось введение аутологичных ЦИК-клеток в режиме 1 раз в неделю на протяжении трех месяцев.

На УЗИ от 03.03.2023 данных за местный рецидив и метастазы не получено. С целью профилактики рецидива начат 4 курс АИТ. За период с января 2023 года по октябрь 2023 года суммарно было введено 303 млн ЦИК. Терапию пациентка переносила удовлетворительно, побочных эффектов не наблюдалось. По данным МРТ в марте 2023 года данных за рецидив не получено. При проведении ПЭТ выявлено накопление РФП в проекции крыла правой подвздошной кости (рис. 2).

До начала АИТ и на этапах лечения проводилось фенотипирование лимфоцитов периферической крови. Основной акцент был сделан на популяции НК-клеток и долю  $CD56^+CD16^+$  лимфоцитов. Охарактеризованы две наиболее распространенные субпопуляции:  $CD56^{bright}CD16^-$  — цитокинпродуцирующие

и  $CD56^{dim}CD16^+$  — цитотоксические клетки. Клетки с фенотипом  $CD56^{bright}$  обнаруживаются в меньшем количестве в периферической крови (90% НК-клеток в кровообращении имеют  $CD56^{dim}$ ) [10].

У пациентки до АИТ количество НК-клеток — 7,5%,  $CD56^+CD16^+$  — 4,2%. В июне 2022 года НК-клеток было 8%, а  $CD56^+CD16^+$  увеличились до 7,5%, в ноябре чуть снизились до 5,4%, а в декабре 2023 года восстановились до 7,7%, доля  $CD56^+CD16^+$  от всех  $CD56^+$  составила 90,8%. Таким образом, в процессе АИТ иммунологические показатели численности НК-клеток были стабильны (рис. 3).

На МРТ от 12.01.2024 картина метастатического поражения правой подвздошной кости с признаками кортикальной деструкции сохраняется. По данным остеосцинтиграфии от 17.01.2024 визуализируется очаг патологической гиперфиксации РФП в проекции крыла правой подвздошной кости (КДН = 350%). В других отделах скелета патологических очагов, характерных для специфического поражения, не определяется.

С целью поддерживающей терапии АИТ ЦИК была продолжена.

На МРТ от 13.06.2024 картина метастатического поражения правой подвздошной кости с признаками кортикальной деструкции сохраняется (увеличение размеров в сравнении с данными от 12.01.2024), появились метастатические

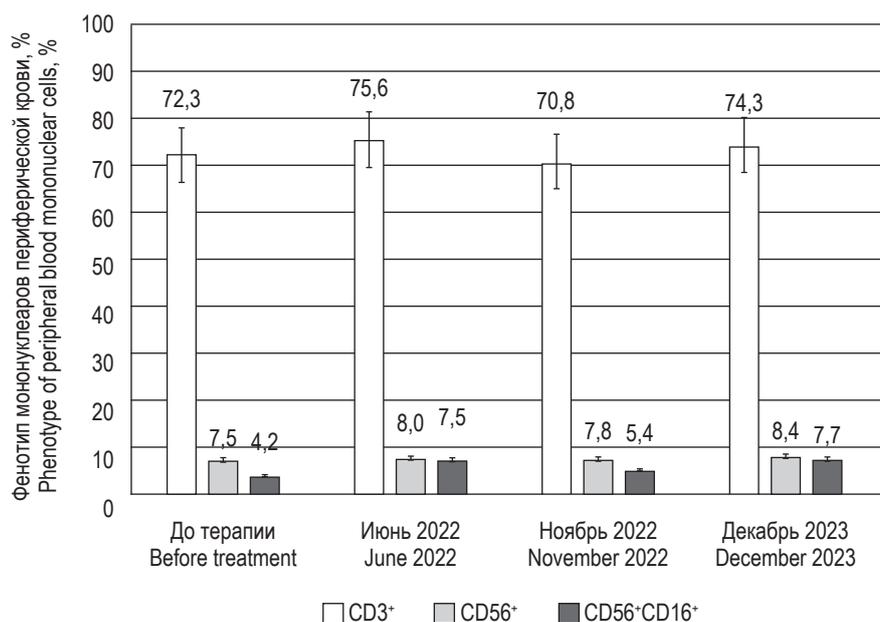


Рисунок 3. Фенотип периферических мононуклеаров во время проведения лечения

Figure 3. Phenotype of peripheral blood mononuclear cells

очаги в крыше вертлужной впадины и седалищной кости справа (ранее не выявлялись).

Больной была рекомендована лучевая терапия. С 04.09.2024 по 06.09.2024 пациентке проведен курс стереотаксической дистанционной лучевой терапии на область метастаза в правой подвздошной кости на ЛУЭ Varian TrueBeam STX с использованием фиксирующих устройств (подголовник F, подставка под ноги), контроля положения пациента с помощью СВСТ в РОД 8 Гр до СОД 24 Гр. Лечение перенесла удовлетворительно.

На октябрь 2024 года больная чувствует себя хорошо, особых жалоб не предъявляет. Ведется динамическое наблюдение.

## Заключение

Медиана общей выживаемости больных с ТНРМЖ при современных методах лечения составляет 10,2 месяца [4]. Средняя продолжительность жизни больных с наличием метастазов составляет менее 1 года. В описанном клиническом случае на момент написания статьи с момента постановки диагноза прошло 34 месяца, что свидетельствует об эффективном сочетании АИТ с хирургическим методом лечения трижды негативного РМЖ. За период наблюдения удалось

сдерживать опухолевый рост в первичном очаге на протяжении года. Исследования этого подхода показали, что лечение с использованием аутологичных ЦИК-клеток в монорежиме позволяет длительно локализовать онкологический процесс, учитывая наличие в анамнезе других злокачественных новообразований делает данный случай уникальным. К сожалению, аутологичные лимфоциты не способны обеспечить мощную реакцию против достаточно агрессивной формы рака и отдаленных метастазов в кости, возможно, отчасти из-за ингибирующих эффектов клеток опухоли, взаимодействия между аутологичными ЦИК-клетками и собственными молекулами МНС класса I [15]. Проблема заключается в том, что не существует достоверных показателей, позволяющих предсказать эффект данного вида иммунотерапии. Ответ на иммунотерапию зависит от множества факторов иммунного микроокружения опухоли, а не только от количества мишеней и величины опухоли. Вероятно, в дальнейшей лечебной тактике надо использовать аллогенные ЦИК-клетки или НК-клетки для усиления противоопухолевой иммунной защиты организма.

Данный клинический случай подтверждает эффективность проведенной терапии даже в монорежиме, что позволило провести радикаль-

ную операцию и обеспечить длительный безрецидивный период на протяжении более двух лет. Это дает возможность и надежду пациентам с агрессивными формами рака получать дополнительное лечение в виде адоптивной иммунотерапии аутологичными или аллогенными ЦИК-клетками.

## Благодарности

Выражаем благодарность ООО «Клиника № 1» за проведение хирургического лечения и динамические наблюдения за больной и ООО «Клиника вашего здоровья» за оказанную консультативную помощь.

## Список литературы / References

1. Абакушина Е.В., Гельм Ю.В., Пасова И.А., Бажин А.В. Иммунотерапевтические подходы к лечению больных колоректальным раком // Биохимия, 2019. Т. 84, № 7. С. 923-933. [Abakushina E.V., Gel'm Yu.V., Pasova I.A., Bazhin A.V. Immunotherapeutic Approaches for the Treatment of Colorectal Cancer. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2019, Vol. 84, no. 7, pp. 720-728. (In Russ.)]
2. Абакушина Е.В., Пасова И.А., Маризина Ю.В., Кудрявцев Д.В., Кудрявцева Г.Т., Фомина Е.С. Клиническая эффективность сопроводительной иммунотерапии активированными лимфоцитами больной меланомой (случай из практики) // Сибирский онкологический журнал, 2016. Т. 15, № 5. С. 89-94. [Abakushina E.V., Pasova I.A., Marizina Yu.V., Kudryavtsev D.V., Kudryavtseva G.T., Fomina E.S. Efficiency of adoptive immunotherapy for melanoma: a case report. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology*. 2016, Vol. 15, no. 5, pp. 89-94. (In Russ.)]
3. Гельм Ю.В., Кузьмина Е.Г., Абакушина Е.В. Функциональная активность лимфоцитов здоровых доноров и онкологических больных при культивировании в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2019. Т. 167, № 4. С. 471-477. [Gel'm Yu.V., Kuz'mina E.G., Abakushina E.V. Functional activity of lymphocytes of healthy donors and cancer patients after culturing with IL-2 and IL-15. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2019, Vol. 167, no. 4, pp. 486-491. (In Russ.)]
4. Bonotto M., Gerratana L., Poletto E., Driol P., Giangreco M., Russo S., Minisini A.M., Andretta C., Mansutti M., Pisa F.E., Fasola G., Puglisi F. Measures of outcome in metastatic breast cancer: insights from a real-world scenario. *Oncologist*, 2014, Vol. 19, no. 6, pp. 608-615.
5. Dass S.A., Tan K.L., Selva Rajan R., Mokhtar N.F., Mohd Adzmi E.R., Wan Abdul Rahman W.F., Tengku Din TADA, Balakrishnan V. Triple negative breast cancer: a review of present and future diagnostic modalities. *Medicina (Kaunas)*, 2021, Vol. 57, no. 1, 62. doi: 10.3390/medicina57010062.
6. Jia H., Truica C.I., Wang B., Wang Y., Ren X., Harvey H.A., Song J., Yang J.M. Immunotherapy for triple-negative breast cancer: Existing challenges and exciting prospects. *Drug Resist. Updat.*, 2017, Vol. 32, pp. 1-15.
7. Li Y., Zhang H., Merkher Y., Chen L., Liu N., Leonov S., Chen Y. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *J. Hematol. Oncol.*, 2022, Vol. 15, no. 1, 121. doi: 10.1186/s13045-022-01341-0.
8. Liu S., Galat V., Galat Y., Lee Y.K.A., Wainwright D., Wu J. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *J. Hematol. Oncol.*, 2021, Vol. 14, no. 1, 7. doi: 10.1186/s13045-020-01014-w.
9. Lu B., Natarajan E., Balaji Raghavendran H.R., Markandan U.D. Molecular classification, treatment, and genetic biomarkers in triple-negative breast cancer: a review. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 2023, Vol. 22, 15330338221145246. doi: 10.1177/15330338221145246.
10. Melsen J.E., Lugthart G., Lankester A.C., Schilham M.W. Human circulating and tissue-resident CD56(bright) Natural Killer cell populations. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 30, no. 7, 262. doi: 10.3389/fimmu.2016.00262.
11. Myers J.A., Miller J.S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2021, Vol. 18, no. 2, pp. 85-100.
12. Sakach E., O'Regan R., Meisel J., Li X. Molecular classification of triple negative breast cancer and the emergence of targeted therapies. *Clin. Breast Cancer*, 2021, Vol. 2, no. 6, pp. 509-520.
13. Sanchez C.E., Dowlati E.P., Geiger A.E., Chaudhry K., Tovar M.A., Bollard C.M., Cruz C.R.Y. NK cell adoptive immunotherapy of cancer: evaluating recognition strategies and overcoming limitations. *Transplant. Cell. Ther.*, 2021, Vol. 2, no. 1, pp. 21-35.

14. Shen M., Pan H., Chen Y., Xu Y.H., Yang W., Wu Z. A review of current progress in triple-negative breast cancer therapy. *Open Med. (Wars.)*, 2020, Vol. 15, no. 1, pp. 1143-1149.
15. Veluchamy J.P., Kok N., van der Vliet H.J., Verheul H.M.W., de Gruijl T.D., Spanholtz J. The rise of allogeneic natural killer cells as a platform for cancer immunotherapy: recent innovations and future developments. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 631. doi: 10.3389/fimmu.2017.00631.

---

**Авторы:**

**Абакушина Е.В.** — д.м.н., руководитель отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии, заместитель генерального директора ООО «Текон Медицинские Приборы»; заведующая лабораторией иммунологии и аутоиммунных заболеваний отдела молекулярной онкологии и иммунологии ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Журиков Р.В.** — научный сотрудник отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии ООО «Текон Медицинские Приборы», Москва, Россия

**Румянцев С.А.** — д.м.н., профессор, заведующий отделом молекулярной онкологии и иммунологии ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ; заведующий кафедрой онкологии, гематологии и лучевой терапии института материнства и детства ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Abakushina E.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department for Development and Research in Immunology, Deputy General Director, LLC “Tecon Medical Devices”; Head, Laboratory of Immunology and Autoimmune Diseases, Department of Molecular Oncology and Immunology, National Medical Research Center of Endocrinology, Moscow, Russian Federation

**Zhurikov R.V.**, Researcher, Department for Development and Research in Immunology, LLC “Tecon Medical Devices”, Moscow, Russian Federation

**Rumiantsev S.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Molecular Oncology and Immunology, National Medical Research Center of Endocrinology; Head, Department of Oncology, Hematology and Radiotherapy, Institute of Motherhood and Childhood, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 01.11.2024  
Отправлена на доработку 06.11.2024  
Принята к печати 22.03.2025

Received 01.11.2024  
Revision received 06.11.2024  
Accepted 22.03.2025

## **РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ У МЫШЕЙ ПРИ МЕЛАНОМЕ В16**

**Егоров А.Н., Гольдерова А.С., Готовцев Р.А., Троев И.П.,  
Николаева И.Э.**

*ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия*

**Резюме.** Роль цитокинов в регуляции иммунного ответа и прогрессировании опухолей является важным аспектом исследований в области онкологии. Меланома В16 характеризуется агрессивным течением и высоким уровнем метастазирования, что требует глубокого понимания механизмов, участвующих в развитии заболевания. Целью данного исследования было изучение уровня цитокинов в плазме крови мышей при меланоме В16. В эксперименте использовались мыши линии С57BL/6, которым были введены клетки меланомы В16-F10. Животные были разделены на две группы: контрольную и экспериментальную. В течение 21 дня проводился мониторинг уровней ключевых цитокинов, таких как IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 и IL-10, с помощью метода иммуноферментного анализа (ELISA). Результаты исследования показали значительное повышение уровня цитокинов IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  в плазме крови мышей экспериментальной группы по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что как IFN $\gamma$ , так и TNF $\alpha$  играют ключевую роль в стимуляции макрофагов и нейтрофилов к более эффективному уничтожению опухолевых клеток. Этот цитотоксический ответ способствует подавлению опухолевого роста и метастазированию. Повышенный уровень IL-6 указывает на развитие воспалительного ответа. Несмотря на то, что этот цитокин обладает свойствами, способствующими уменьшению воспаления, переизбыток IL-6 может способствовать росту и более агрессивному поведению опухолей. Сниженный уровень IL-10 может усиливать воспалительные процессы и ослаблять иммунный ответ организма против опухолей. Таким образом, баланс между различными цитокинами играет решающую роль в регуляции иммунного ответа на раковые клетки и определяет характер прогрессии опухолей. В то же время уровень IL-10, цитокина с противовоспалительными свойствами, был понижен в экспериментальной группе, что указывает на дисбаланс в регуляции иммунного ответа. Таким образом, полученные данные демонстрируют, что при меланоме В16 наблюдается значительное изменение профиля цитокинов в плазме крови, что может играть ключевую роль в патогенезе заболевания. Эти результаты подчеркивают важность дальнейших исследований для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на модуляцию цитокинового ответа при меланоме.

*Ключевые слова:* меланома, цитокины, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10

### **Адрес для переписки:**

*Егоров Андрей Николаевич  
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный  
университет имени М.К. Аммосова»  
677000, Россия, Республика Саха (Якутия),  
г. Якутск, ул. Белинского, 58.  
Тел.: 8 (914) 826-27-23.  
E-mail: 291219942014@mail.ru*

### **Address for correspondence:**

*Andrei N. Egorov  
M. Ammosov North-Eastern Federal University  
58 Belinsky St  
Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia)  
677000 Russian Federation  
Phone: +7 (914) 826-27-23.  
E-mail: 291219942014@mail.ru*

### **Образец цитирования:**

*А.Н. Егоров, А.С. Гольдерова, Р.А. Готовцев,  
И.П. Троев, И.Э. Николаева «Роль цитокинов в плазме  
крови у мышей при меланоме В16» // Медицинская  
иммунология, 2025. Т. 27, № 4. С. 881-888.  
doi: 10.15789/1563-0625-ARO-3028*

© Егоров А.Н. и соавт., 2025

*Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0*

### **For citation:**

*A.N. Egorov, A.S. Golderova, R.A. Gotovtsev, I.P. Troev,  
I.E. Nikolaeva "A role of blood plasma cytokines in mice  
with B16 melanoma", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 4,  
pp. 881-888.  
doi: 10.15789/1563-0625-ARO-3028*

© Egorov A.N. et al., 2025

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

**DOI:** 10.15789/1563-0625-ARO-3028

## A ROLE OF BLOOD PLASMA CYTOKINES IN MICE WITH B16 MELANOMA

Egorov A.N., Golderova A.S., Gotovtsev R.A., Troev I.P., Nikolaeva I.E.

M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

**Abstract.** The role of cytokines in regulating the immune response and tumor progression is an important aspect of studies in oncology. B16 melanoma is characterized by an aggressive course and a high level of metastasis, which requires a deep understanding of the mechanisms involved. The purpose of this study was to study the level of cytokines in the blood plasma of mice with B16 melanoma. The experiment used C57BL/6 mice injected with B16-F10 melanoma cells. The animals were divided into two groups: control and experimental. Levels of key cytokines such as IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-10 were monitored for 21 days using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results of the study showed a significant increase in the level of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  cytokines in the blood plasma of mice from the experimental group compared to the control group. It should be noted that both IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  play a key role in stimulating macrophages and neutrophils for more effective killing of tumor cells. This cytotoxic response helps suppress tumor growth and metastasis. Elevated levels of IL-6 indicate the development of an inflammatory response. Although this cytokine at certain doses may reduce inflammation, excessive IL-6 can promote the growth and more aggressive behavior of tumors. Reduced levels of IL-10 can increase inflammation and weaken the body's immune response against tumors. Thus, the balance between various cytokines plays a crucial role in regulating the immune response to cancer cells and determines the nature of tumor progression. At the same time, the level of IL-10, a cytokine with anti-inflammatory properties, was reduced in the experimental group, thus indicating an imbalanced regulation of immune response. Thus, the data obtained demonstrate that development of B16 melanoma is associated with significant changes in the blood plasma cytokine profile which may play a key role in the pathogenesis of the disease. These results highlight the importance of further research to develop new therapeutic strategies aimed at modulating the cytokine response in melanoma.

*Keywords:* melanoma, cytokines, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10

Исследование и публикация выполнены в рамках федерального проекта «Развитие человеческого капитала в интересах регионов, отраслей и сектора исследований и разработок» национального проекта «Наука и университеты», шифр тематики FSRG-2022-0009 «Разработка и испытание новых биомедицинских клеточных продуктов, композиционных медицинских изделий».

### Введение

Меланома является одной из наиболее агрессивных форм рака кожи, характеризующейся высоким уровнем метастазирования и значительной гетерогенностью. Ежегодно в мире диагностируется более 230 000 новых случаев меланомы, что приводит к более чем 50 000 смертей. Основным источником меланомы являются меланоциты — клетки, продуцирующие меланин и расположенные преимущественно в эпидермисе кожи. Патогенез меланомы включает в себя сложные генетические и эпигенетические изменения,

способствующие неконтролируемому росту клеток и их инвазивным свойствам.

Современные методы лечения меланомы включают хирургическое вмешательство, иммунотерапию, таргетную терапию и химиотерапию. Однако, несмотря на значительные успехи в лечении, прогноз для пациентов с метастатической меланомой остается неблагоприятным. Это подчеркивает необходимость поиска новых терапевтических стратегий и глубокого понимания молекулярных и клеточных механизмов, участвующих в прогрессировании заболевания.

Цитокины играют ключевую роль в регуляции иммунного ответа и прогрессировании опухолей. Они представляют собой небольшие белковые молекулы, которые модулируют взаимодействие между клетками иммунной системы и опухолевыми клетками. В частности, цитокины могут как способствовать уничтожению опухолевых клеток, так и поддерживать их выживание и рост, создавая иммуносупрессивную микросреду. Поэтому изучение уровня цитокинов в плазме крови при меланоме является важным аспектом для

понимания патогенеза заболевания и разработки новых терапевтических подходов.

**Целью** данного исследования было изучение уровня ключевых цитокинов, таких как  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-6 и IL-10, в плазме крови мышей линии C57BL/6 при меланоме B16. Эти цитокины были выбраны из-за их известных ролей в регуляции воспалительного ответа и противоопухолевого иммунитета.  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$  известны своими провоспалительными и антиопухолевыми свойствами, тогда как IL-6 участвует в хроническом воспалении и прогрессировании опухолей, а IL-10 обладает противовоспалительными свойствами и может способствовать иммуносупрессии.

Исследование проводилось с использованием мышей, которым были введены клетки меланомы B16-F10, что позволило имитировать прогрессирование заболевания и анализировать изменения в профиле цитокинов. Результаты данного исследования позволят лучше понять роль цитокинов в патогенезе меланомы и могут способствовать разработке новых терапевтических стратегий, направленных на модуляцию иммунного ответа при этом заболевании.

Цитокины играют ключевую роль в регуляции иммунного ответа, что делает их важными мишенями в терапии различных заболеваний, включая злокачественные новообразования. Они представляют собой небольшие белковые молекулы, участвующие в передаче сигналов между клетками, что позволяет им модулировать иммунные реакции организма. В контексте онкологии цитокины могут как усиливать противоопухолевый иммунитет, так и способствовать росту и метастазированию опухолей.

Исследования показывают, что цитокины, такие как интерферон- $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ) и фактор некроза опухолей- $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ), играют важную роль в активации противоопухолевого иммунитета.  $IFN\gamma$ , производимый Т-лимфоцитами и натуральными киллерами (NK-клетками), обладает мощными антипролиферативными и проапоптотическими свойствами. Он стимулирует экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС), улучшая антигенпрезентацию и активацию цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) [2].  $TNF\alpha$ , секретируемый макрофагами и другими иммунными клетками, также способствует апоптозу опухолевых клеток и ингибирует ангиогенез, что ограничивает рост и распространение опухоли [1].

Кроме того, цитокины, такие как интерлейкин-6 (IL-6), играют двойную роль в опухолевом процессе. IL-6 участвует в регуляции воспалительного ответа и может способствовать прогрессированию опухолей через активацию сигнальных путей, таких как JAK/STAT3, кото-

рые стимулируют пролиферацию и выживание опухолевых клеток [4]. Исследования показывают, что высокий уровень IL-6 ассоциируется с неблагоприятным прогнозом при различных видах рака, включая меланому [8].

В то же время интерлейкин-10 (IL-10) известен своими противовоспалительными свойствами. Он подавляет продукцию провоспалительных цитокинов и ингибирует функции антигенпрезентирующих клеток (АПС), что может способствовать иммуносупрессии в опухолевой среде и предотвращать эффективный противоопухолевый ответ [7]. Высокий уровень IL-10 в плазме крови часто ассоциируется с прогрессированием заболевания и плохим прогнозом у пациентов с меланомой [6].

Исследования на модели меланомы B16 у мышей линии C57BL/6 предоставляют важные данные о роли цитокинов в патогенезе заболевания. Эта модель широко используется для изучения механизма прогрессирования меланомы и оценки эффективности различных терапевтических стратегий. Введение клеток меланомы B16-F10 вызывает развитие опухоли и метастазов, что позволяет анализировать изменения в профиле цитокинов и их влияние на иммунный ответ [3].

Иммунотерапия, основанная на модуляции цитокинового профиля, показала значительные успехи в лечении меланомы. Например, использование рекомбинантного  $IFN\alpha$  в клинической практике улучшило показатели выживаемости у пациентов с меланомой за счет усиления противоопухолевого иммунитета [5]. Аналогично, ингибиторы контрольных точек, такие как анти-PD-1 и анти-CTLA-4, способствуют восстановлению активности Т-лимфоцитов и увеличению продукции провоспалительных цитокинов, что приводит к уменьшению размеров опухоли и улучшению выживаемости [9].

Таким образом, цитокины играют важную роль в регуляции иммунного ответа при меланоме, и их модуляция представляет перспективное направление в разработке новых терапевтических стратегий. Понимание механизмов действия ключевых цитокинов, таких как  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-6 и IL-10, является критически важным для разработки эффективных методов лечения и улучшения прогноза пациентов с меланомой.

## Материалы и методы

### Выбор и характеристика экспериментальных животных

Для проведения исследования использовались самцы мышей линии C57BL/6 в возрасте 6-8 недель и весом 20-25 г. Данная линия была выбрана из-за ее высокой восприимчивости к ин-

дукции меланомы клетками B16-F10, что делает ее стандартной моделью для изучения меланомы. Мыши содержались в условиях стандартного вивария при температуре  $22 \pm 2$  °С и относительной влажности 50-60%, с циклом свет/темнота 12/12 часов. Животные имели свободный доступ к воде и стандартному гранулированному корму.

#### Индукция меланомы и лечение

Мышам вводили клетки меланомы B16-F10 в количестве  $1 \times 10^6$  клеток подкожно в правую боковую область на 7-й день эксперимента. Животные были случайным образом разделены на две группы: экспериментальную и контрольную. Экспериментальная группа ( $n = 15$ ) получала инъекции физиологического раствора с меланомными клетками, а контрольная группа ( $n = 15$ ) получала только физиологический раствор.

#### Оценка уровней цитокинов

Оценка уровней цитокинов в плазме крови проводилась на 21-й день эксперимента. Образцы крови были собраны из орбитального синуса в микропробирки с ЭДТА и центрифугированы при 3000 об/мин в течение 10 минут для получения плазмы. Уровни цитокинов IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 и IL-10 определялись методом иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерческих наборов (BioLegend, США). Все процедуры проводились в соответствии с инструкциями производителя.

#### Методы статистической обработки

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, LLC, США). Количественные показатели представлены в виде медианы и межквартильно интервала – Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Для анализа значений между группами использовались методы Краскала–Уоллиса для нескольких групп и критерий Манна–Уитни для двух групп. Статистическая обработка качественных признаков проводилась с применением критерия  $\chi^2$  Пирсона. Критерием значимости статистических различий принимали 95%-ный уровень значимости ( $p < 0,05$ ).

## Результаты

Анализ уровня цитокинов в плазме крови мышей после 21-дневного эксперимента выявил значительные различия между экспериментальной и контрольной группами. В экспериментальной группе, которой были введены клетки меланомы B16-F10, наблюдалось значительное изменение профиля цитокинов по сравнению с контрольной группой.

Концентрация IFN $\gamma$  в плазме крови экспериментальной группы составила  $112,5 \pm 8,7$  пг/мл,

что значительно превышало показатели контрольной группы, где уровень IFN $\gamma$  составил  $64,3 \pm 6,1$  пг/мл ( $p < 0,01$ ). Повышенный уровень IFN $\gamma$  указывает на усиленную активацию Th1-ответа и цитотоксической активности CD8 $^+$ Т-лимфоцитов, что способствует эффективной противоопухолевой реакции.

Уровень TNF $\alpha$  также был значительно выше в экспериментальной группе. В среднем, концентрация TNF $\alpha$  в экспериментальной группе составила  $96,2 \pm 7,4$  пг/мл, тогда как в контрольной группе этот показатель был  $53,8 \pm 5,7$  пг/мл ( $p < 0,01$ ). Повышенная секреция TNF $\alpha$  свидетельствует о более активной воспалительной реакции, что может способствовать разрушению опухолевых клеток и ингибированию их роста.

Концентрация IL-6 в плазме крови также показала значительные различия между группами. В экспериментальной группе уровень IL-6 составил  $75,4 \pm 6,3$  пг/мл, в то время как в контрольной группе этот показатель был  $34,9 \pm 4,8$  пг/мл ( $p < 0,01$ ). Повышенный уровень IL-6 может указывать на хроническое воспаление и стимулировать пролиферацию опухолевых клеток.

Уровень IL-10 в экспериментальной группе был снижен по сравнению с контрольной группой. В экспериментальной группе концентрация IL-10 составила  $22,7 \pm 3,5$  пг/мл, тогда как в контрольной группе этот показатель был  $45,1 \pm 4,3$  пг/мл ( $p < 0,01$ ). Снижение уровня IL-10, обладающего противовоспалительными свойствами, может свидетельствовать о дисбалансе в регуляции иммунного ответа, что способствует развитию воспалительной реакции и поддержанию противоопухолевого иммунитета.

Функциональная активность Т-лимфоцитов также показала различия между группами. В экспериментальной группе уровень экспрессии IFN $\gamma$  среди CD8 $^+$ Т-лимфоцитов составил 54,8% (95% ДИ: 49,3-60,3%), что значительно превышало аналогичный показатель в контрольной группе, где он составлял 32,7% (95% ДИ: 28,1-37,3%) ( $p < 0,05$ ). Это свидетельствует о повышенной цитотоксической активности и способности CD8 $^+$ Т-лимфоцитов в экспериментальной группе уничтожать опухолевые клетки.

Количество CD4 $^+$ Т-лимфоцитов также показало значительные различия. В экспериментальной группе среднее количество CD4 $^+$ Т-лимфоцитов составило 41,5% (95% ДИ: 37,2-45,8%), тогда как в контрольной группе этот показатель был на уровне 29,8% (95% ДИ: 26,3-33,3%) ( $p < 0,01$ ). Экспрессия IFN $\gamma$  среди CD4 $^+$ Т-лимфоцитов в экспериментальной группе составила 37,2% (95% ДИ: 33,1-41,3%), в то время как в контрольной группе этот показатель был 24,3% (95% ДИ: 21,0-27,6%) ( $p < 0,05$ ). Это указывает на

усиленную Th1-ответственность и потенциал активации других иммунных клеток.

Анализ уровня секреции TNF $\alpha$  среди CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов показал, что в экспериментальной группе эти показатели были значительно выше. Для CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов уровень экспрессии TNF $\alpha$  составил 43,7% (95% ДИ: 39,2-48,2%) в экспериментальной группе против 28,9% (95% ДИ: 24,7-33,1%) в контрольной группе ( $p < 0,01$ ). Для CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов аналогичные показатели составили 31,4% (95% ДИ: 27,3-35,5%) и 20,3% (95% ДИ: 16,7-23,9%) соответственно ( $p < 0,05$ ). Эти данные подтверждают гипотезу о том, что экспериментальная группа обладает более активным воспалительным и цитотоксическим ответом.

Количество метастатических узлов в легких у мышей экспериментальной группы было значительно ниже по сравнению с контрольной группой. В среднем, количество метастатических узлов в легких у мышей экспериментальной группы составило  $4,1 \pm 1,3$ , тогда как в контрольной группе этот показатель был  $9,7 \pm 2,1$  ( $p < 0,01$ ). Эти данные подчеркивают эффективность активации иммунного ответа в снижении метастатической активности меланомы.

Сравнительный анализ между экспериментальной и контрольной группами выявил значительные различия в различных параметрах иммунного ответа и прогрессирования меланомы. Повышенный уровень цитокинов IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-6 в экспериментальной группе коррелировал с увеличением количества и активности CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, что свидетельствует о более активной иммунной реакции. Снижение уровня IL-10 указывает на уменьшение иммуносупрессии и поддержку провоспалительного ответа.

Таким образом, введение клеток меланомы B16-F10 в экспериментальной группе привело к значительным изменениям в профиле цитокинов, что сопровождалось усилением противоопухолевого иммунного ответа и снижением уровня метастазирования. Эти результаты подчеркивают важность цитокинов в регуляции иммунного ответа при меланоме и открывают перспективы для дальнейших исследований в области разработки новых терапевтических стратегий, направленных на модуляцию цитокинового профиля для улучшения прогноза при меланоме.

## Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии цитокинов на иммунный ответ и прогрессирование меланомы B16 у мышей линии C57BL/6. Увеличение уровней IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  в плазме крови экспериментальной груп-

пы по сравнению с контрольной группой подтверждает гипотезу о том, что меланомы B16-F10 активирует цитотоксические Т-лимфоциты и усиливает воспалительный ответ. Эти изменения играют ключевую роль в элиминации опухолевых клеток и сдерживании их роста.

Повышенный уровень IFN $\gamma$  ( $112,5 \pm 8,7$  пг/мл против  $64,3 \pm 6,1$  пг/мл в контрольной группе,  $p < 0,01$ ) указывает на усиленную активацию Th1-ответа. IFN $\gamma$  является основным цитокином, способствующим активации макрофагов и повышению их способности уничтожать опухолевые клетки. Он также усиливает антиген-презентирующую функцию дендритных клеток, что важно для активации адаптивного иммунного ответа. Аналогично, повышение уровня TNF $\alpha$  ( $96,2 \pm 7,4$  пг/мл против  $53,8 \pm 5,7$  пг/мл в контрольной группе,  $p < 0,01$ ) свидетельствует о более активном воспалительном ответе. TNF $\alpha$  известен своими способностями индуцировать апоптоз через активацию каспазного пути и усиливать экспрессию молекул адгезии, что способствует инфильтрации опухоли иммунными клетками.

Интересным является также повышение уровня IL-6 ( $75,4 \pm 6,3$  пг/мл в экспериментальной группе против  $34,9 \pm 4,8$  пг/мл в контрольной группе,  $p < 0,01$ ). IL-6 участвует в регуляции воспалительного ответа и может способствовать пролиферации опухолевых клеток через активацию сигнальных путей JAK/STAT3. Этот цитокин может играть двойную роль, усиливая как противоопухолевый иммунитет, так и рост опухоли в зависимости от контекста. В данном исследовании высокий уровень IL-6 мог способствовать поддержанию хронического воспаления и стимуляции противоопухолевого ответа.

Снижение уровня IL-10 ( $22,7 \pm 3,5$  пг/мл в экспериментальной группе против  $45,1 \pm 4,3$  пг/мл в контрольной группе,  $p < 0,01$ ) указывает на уменьшение иммуносупрессивного состояния. IL-10 обладает противовоспалительными свойствами и подавляет функции антигенпрезентирующих клеток, что может способствовать иммуносупрессии в опухолевой среде. Снижение уровня IL-10 в экспериментальной группе может свидетельствовать о более активном провоспалительном и противоопухолевом ответе.

Увеличение количества CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов в экспериментальной группе, по сравнению с контрольной группой, демонстрирует усиление адаптивного иммунного ответа, что является ключевым фактором в борьбе с опухолевыми клетками. Существенное увеличение уровня IFN $\gamma$  среди CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов (54,8% против 32,7%,  $p < 0,05$ ) и TNF $\alpha$  (43,7% против 28,9%,

$p < 0,01$ ) подтверждает их повышенную цитотоксическую активность и способность уничтожать опухолевые клетки. Количество  $CD4^+$ T-лимфоцитов также показало значительные различия (41,5% против 29,8%,  $p < 0,01$ ), что указывает на усиленную Th1-ответственность и потенциал активации других иммунных клеток, включая макрофаги и натуральные киллеры.

Снижение уровня метастазирования в легкие у мышей экспериментальной группы является еще одним значимым результатом. В среднем количество метастатических узлов в легких составило  $4,1 \pm 1,3$  в экспериментальной группе против  $9,7 \pm 2,1$  в контрольной группе ( $p < 0,01$ ). Это свидетельствует о потенциале активированных цитокинов в снижении метастатической активности меланомы, что критически важно для улучшения прогноза заболевания.

Потенциальные механизмы действия цитокинов в контексте модуляции иммунного ответа и противоопухолевой активности могут быть объяснены несколькими ключевыми биологическими процессами. В основе этих механизмов лежит взаимодействие цитокинов с клетками иммунной системы на молекулярном уровне.  $IFN\gamma$ , например, может усиливать антигенпрезентирующую функцию дендритных клеток, увеличивая экспрессию молекул МНС II класса и ко-стимулирующих молекул, таких как CD80 и CD86, что улучшает их способность представлять антигены T-лимфоцитам, способствуя их активации и пролиферации. Это подтверждается увеличением количества  $CD8^+$ T-лимфоцитов до 54,8% по сравнению с 32,7% в контрольной группе ( $p < 0,05$ ).

$TNF\alpha$ , в свою очередь, известен своими способностями индуцировать апоптоз через активацию каспазного пути и усиливать экспрессию молекул адгезии, что способствует инфильтрации опухоли иммунными клетками. Повышенная продукция  $TNF\alpha$  способствует привлечению макрофагов и NK-клеток в опухолевую ткань, что усиливает противоопухолевый иммунный ответ. Это коррелирует с результатами исследования, где уровень  $TNF\alpha$  в экспериментальной группе был значительно выше, чем в контрольной (43,7% против 28,9%,  $p < 0,01$ ).

$IL-6$  может играть двойную роль, усиливая как противоопухолевый иммунитет, так и рост опухоли в зависимости от контекста. В данном исследовании высокий уровень  $IL-6$  мог способствовать поддержанию хронического воспаления и стимуляции противоопухолевого ответа. Снижение уровня  $IL-10$ , обладающего противовоспалительными свойствами, может свидетельствовать

о более активном провоспалительном и противоопухолевом ответе.

Эти данные подчеркивают, что модуляция уровней цитокинов может существенно влиять на иммунный ответ и прогрессирование меланомы. Повышение уровня провоспалительных цитокинов, таких как  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$ , вместе со снижением уровня противовоспалительного  $IL-10$  способствует усилению противоопухолевого иммунного ответа и снижению метастатической активности. Эти результаты открывают перспективы для дальнейшего изучения роли цитокинов в патогенезе меланомы и разработки новых терапевтических стратегий, направленных на модуляцию иммунного ответа для улучшения прогноза при этом заболевании.

## Заключение

Результаты проведенного исследования продемонстрировали значительное влияние уровней цитокинов в плазме крови на иммунный ответ и прогрессирование меланомы B16 у мышей линии C57BL/6. Изучение профиля цитокинов показало, что развитие меланомы сопровождается существенными изменениями в уровне ключевых иммуномодулирующих молекул, таких как  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL-6$  и  $IL-10$ .

Концентрация  $IFN\gamma$  в плазме крови мышей экспериментальной группы составила  $112,5 \pm 8,7$  пг/мл, что значительно превышало показатели контрольной группы ( $64,3 \pm 6,1$  пг/мл,  $p < 0,01$ ). Этот цитокин играет важную роль в активации макрофагов и повышении их способности уничтожать опухолевые клетки, что способствует усилению противоопухолевого иммунного ответа. Повышенный уровень  $TNF\alpha$  ( $96,2 \pm 7,4$  пг/мл в экспериментальной группе против  $53,8 \pm 5,7$  пг/мл в контрольной группе,  $p < 0,01$ ) свидетельствует о более активном воспалительном ответе, способствующем апоптозу опухолевых клеток и ингибированию их пролиферации.

Снижение уровня  $IL-10$  ( $22,7 \pm 3,5$  пг/мл в экспериментальной группе против  $45,1 \pm 4,3$  пг/мл в контрольной группе,  $p < 0,01$ ) указывает на уменьшение иммуносупрессивного состояния и поддержку провоспалительного ответа, что критически важно для эффективного противоопухолевого иммунитета. Повышенный уровень  $IL-6$  ( $75,4 \pm 6,3$  пг/мл в экспериментальной группе против  $34,9 \pm 4,8$  пг/мл в контрольной группе,  $p < 0,01$ ) может способствовать поддержанию хронического воспаления и стимуляции противоопухолевого ответа.

Количество CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов в периферической крови экспериментальной группы достигло 54,8% по сравнению с 32,7% в контрольной группе ( $p < 0,05$ ), а количество CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов составило 41,5% против 29,8% в контрольной группе ( $p < 0,01$ ). Повышенная функциональная активность этих клеток, выраженная через экспрессию IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , указывает на усиление клеточного иммунного ответа, что критично для уничтожения опухолевых клеток.

Снижение уровня метастазирования в легкие у мышей экспериментальной группы также является важным результатом исследования. Количество метастатических узлов в легких составило  $4,1 \pm 1,3$  в экспериментальной группе против  $9,7 \pm 2,1$  в контрольной группе ( $p < 0,01$ ), что подтверждает эффективность активации цитокинов

в снижении метастатической активности меланомы.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что уровни ключевых цитокинов, таких как IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 и IL-10, играют важную роль в регуляции иммунного ответа при меланоме B16. Повышение уровней провоспалительных цитокинов и снижение уровней противовоспалительного IL-10 способствует усилению противоопухолевого иммунитета и снижению метастазирования. Эти результаты открывают перспективы для дальнейших исследований, направленных на разработку новых терапевтических стратегий, модулирующих цитокиновый профиль для улучшения прогноза при меланоме и других злокачественных новообразованиях.

## Список литературы / References

1. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, Vol. 9, no. 5, pp. 361-371.
2. Darnell J.E.Jr., Kerr I.M., Stark G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 1994, Vol. 264, no. 5164, pp. 1415-1421.
3. Fidler I.J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.*, 1975, Vol. 35, no. 1, pp. 218-224.
4. Hunter C.A., Jones S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 5, pp. 448-457.
5. Kirkwood J.M., Ernstoff M.S. Interferons in the treatment of human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1984, Vol. 2, no. 4, pp. 336-352.
6. Mocellin S., Marincola F.M., Young H.A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, Vol. 78, no. 5, pp. 1043-1051.
7. Saraiva M., O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 3, pp. 170-181.
8. Schafer Z.T., Brugge J.S. IL-6 involvement in epithelial cancers. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, no. 12, pp. 3660-3663.
9. Sharma P., Wagner K., Wolchok J.D., Allison J.P. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat. Rev. Cancer*, 2011, Vol. 11, no. 11, pp. 805-812.

---

### Авторы:

**Егоров А.Н.** — младший научный сотрудник лаборатории медицинских биотехнологий Медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

**Гольдерова А.С.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории медицинских биотехнологий Медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

### Authors:

**Egorov A.N.**, Junior Researcher, Laboratory of Medical Biotechnology, Medical Institute, M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

**Golderova A.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Medical Biotechnology, Medical Institute, M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

**Готовцев Р.А.** – лаборант-исследователь лаборатории медицинских биотехнологий Медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

**Gotovtsev R.A.**, Research Assistant, Laboratory of Medical Biotechnology, Medical Institute, M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

**Троев И.П.** – старший научный сотрудник лаборатории медицинских биотехнологий Медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

**Troev I.P.**, Senior Researcher, Laboratory of Medical Biotechnology, Medical Institute, M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

**Николаева И.Э.** – инженер-исследователь лаборатории медицинских биотехнологий Медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия

**Nikolaeva I.E.**, Research Engineer, Laboratory of Medical Biotechnology, Medical Institute, M. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation

---

Поступила 15.07.2024  
Отправлена на доработку 18.07.2024  
Принята к печати 22.03.2025

---

Received 15.07.2024  
Revision received 18.07.2024  
Accepted 22.03.2025

# ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

**С 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.**

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

## Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

## Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

## Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

## Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

### Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 $\beta$  на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64-69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 $\beta$  in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

### Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

### Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

## Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

### Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

### Размеры иллюстраций:

- максимальная высота – 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца – 82 мм, для 2 столбцов – 170 мм

**Таблицы.** Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (\*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (\*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

**Рисунки (графики и фотографии).** В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

### Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

### Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
  - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
    - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
    - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
  - Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
  - Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
  - Полное название статьи, направляемой в редакцию.
  - Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
  - Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
  - Дата отправления работы.
- 2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)
- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
  - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
  - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
  - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
  - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
  - адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представится также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы <a href="http://www.e-library.ru">www.e-library.ru</a>

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

**Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «УРАЛ-ПРЕСС» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**

## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

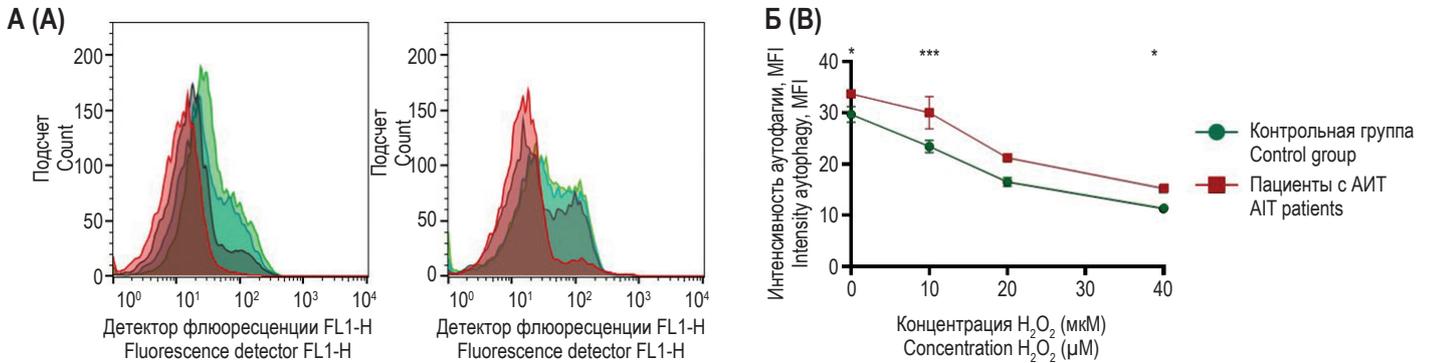
Абакушина Е.В. ....	873	Давыдова А.А. ....	789	Миняйлова Н.Н. ....	831	Соколов Д.И. ....	789, 803
Абрамова З.И. ....	847	Давыдов С.О. ....	713	Михайлова В.А. ....	789	Студеникина А.А. ....	739
Андрюшин А.Е. ....	863	Дадонов В.В. ....	831	Михайлова Е.С. ....	739	Султанбаев А.В. ....	749
Антонов А.В. ....	761	Дружинина Ю.Г. ....	739	Мкртчян Э.Р. ....	789	Султанбаева Н.И. ....	749
Анчикова Т.А. ....	831	Егоров А.Н. ....	881	Морозов Д.В. ....	739	Султанбаев М.В. ....	749
Аутеншлюс А.И. ....	739	Жгулева А.С. ....	789	Мудров В.А. ....	713	Таскина Е.С. ....	713
Афанасьева З.А. ....	847	Журиков Р.В. ....	873	Мусин Ш.И. ....	749	Тимошкина Н.Н. ....	775
Бабаков В.Н. ....	803	Загайнова В.А. ....	789	Мухамадияров Р.А. ....	831	Тихонова А.Н. ....	847
Байрамов П.В. ....	761	Захаров В.Н. ....	761	Насретдинов А.Ф. ....	749	Торгунакова А.В. ....	831
Бакулина О.А. ....	789	Измайлов А.А. ....	749	Николаева И.Э. ....	881	Троев И.П. ....	881
Балацкая Н.В. ....	863	Катаныхова М.В. ....	831	Новикова И.А. ....	775	Тузанкина И.А. ....	749
Беспалова О.Н. ....	789, 803	Кобякина И.В. ....	713	Орлова Е.С. ....	803	Филипенко М.Л. ....	831
Богачук А.П. ....	739	Кит О.И. ....	775	Отставнов Г.А. ....	831	Халивопуло И.К. ....	831
Бурцева А.В. ....	847	Козлов В.А. ....	703	Поленок Е.Г. ....	761	Чепанов С.В. ....	803
Бухтоярова О.С. ....	831	Колпинский Г.И. ....	761	Проскура А.В. ....	739	Шабалдин А.В. ....	831
Вакулова Т.М. ....	831	Колядина И.В. ....	749	Рахматуллаева М.М. ....	823	Шмакова О.В. ....	831
Ведерникова А.В. ....	831	Костянко М.В. ....	761	Ровда Ю.И. ....	831	Fatemeh Kazemi ....	723
Вержбицкая Н.Е. ....	761	Краснова Н.В. ....	831	Роговская Н.Ю. ....	803	Mohammad Reza Atashzar ..	723
Воробьева Е.П. ....	863	Кудлай Д.А. ....	749	Румянцев С.А. ....	873	Parisa Doroudgar ....	723
Гвалдин Д.Ю. ....	775	Куликова И.Г. ....	863	Рыжикова С.Л. ....	739	Sahar Shomeil Shushtari ...	723
Глушков А.Н. ....	761	Липкин В.М. ....	739	Савченко Д.А. ....	775	Shekoufeh Hatami ....	723
Гольдерова А.С. ....	881	Мангазеева Е.Д. ....	739	Сельков С.А. ....	789, 803		
Гордеева Л.А. ....	761	Марко О.Б. ....	789	Сиротская А.А. ....	803		
Готовцев Р.А. ....	881	Меньшиков К.В. ....	749				

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адоптивная иммунотерапия.....	874	преэклампсия.....	714
антитела.....	762	привычное невынашивание беременности.....	804
антифосфолипидные антитела.....	804	прогестерон.....	762
аутоантигены.....	703	противоопухолевый иммунитет.....	750
аутоиммунном тиреоидит.....	847	рак.....	723
бактериальный вагиноз.....	823	рак молочной железы.....	740, 762, 874
бесплодие.....	790	синтетический пептид HLDF-6.....	740
биоптаты.....	740	таргетная терапия.....	776
возрастная макулярная дегенерация.....	864	тимус.....	703, 832
воспаление.....	864	транскриптом.....	776
гипертензивные расстройства во время беременности.....	714	хемокины.....	864
дисфункция эндотелия сосудов.....	864	церебральные биомаркеры.....	714
иммунное микроокружение.....	776	цитокин-индуцированные клетки-киллеры.....	874
иммунодефицитные состояния.....	832	цитокины.....	740, 804, 823, 881
иммунопатология.....	703	эклампсия.....	714
инволюция тимуса.....	832	эндокринотерапия мРМЖ.....	750
интерлейкины.....	762	эндотелиальная дисфункция.....	804
кальцилаты в тимусе.....	832	эстрадиол.....	762
клеточная дифференцировка.....	740	С-реактивный белок.....	823
клеточная терапия.....	874	С3-компонент комплемента.....	823
колоректальный рак.....	776	CAR-T-клетки.....	723
комбинированная терапия.....	874	CD4 <sup>+</sup> T-лимфоцит.....	847
лактоферрин.....	823	CD16.....	790
маркеры.....	864	CDK1.....	776
меланома.....	881	CDK4/6-ингибиторы.....	750
метаболизм Т-лимфоцитов.....	723	HR <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup> рак молочной железы.....	750
метаболическое репрограммирование.....	723	IFN $\gamma$ .....	881
миграция Т-клеток.....	703	IL-6.....	881
микробиоценоз влагалища.....	823	IL-10.....	881
микроРНК.....	776	Ki-67.....	762
митофагия.....	847	KREC.....	750
молекулы адгезии.....	864	mTOR.....	847
молекулярно-биологические подтипы.....	740	NGS.....	776
нейровоспаление.....	714	NK-клетки.....	790, 874
нейродегенерация.....	714	NKG2D.....	790
носительство антифосфолипидных антител.....	804	NKT-клетки.....	790
облигатные анаэробы.....	823	Т-лимфоциты.....	790
окислительный стресс.....	847	Т-регуляторные клетки.....	703
онкогенез.....	703	TNF $\alpha$ .....	881
опухолегенез.....	703	TREC.....	750
периферическая кровь.....	790		

**ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ КИНАЗЫ mTOR В CD4<sup>+</sup>Т-ЛИМФОЦИТАХ ПРИ АУТОИММУННОМ ТИРЕОИДИТЕ» (АВТОРЫ: БУРЦЕВА А.В., ТИХОНОВА А.Н., АФАНАСЬЕВА З.А., АБРАМОВА З.И. [с. 847-862])**

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE «INFLUENCE OF OXIDATIVE STRESS ON THE ACTIVITY OF mTOR KINASE IN CD4<sup>+</sup>T LYMPHOCYTES IN AUTOIMMUNE THYROIDITIS» (AUTHORS: BURTSEVA A.V., TIKHONOVA A.N., AFANASYEVA Z.A., ABRAMOVA Z.I. [pp. 847-862])

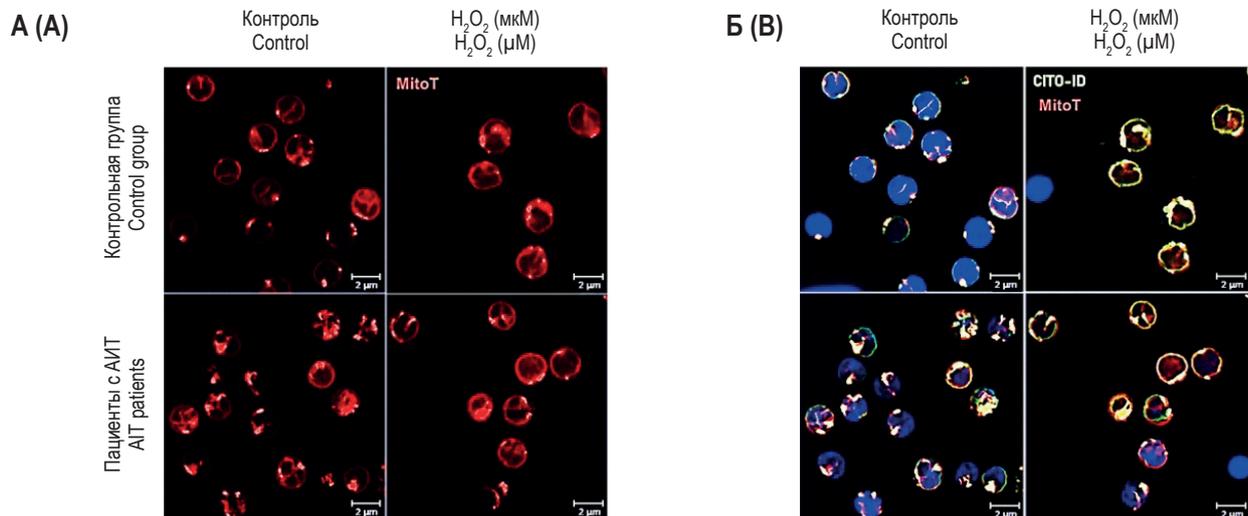


**Рисунок 3. Оценка количества аутофагосом в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах при возрастающей концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Примечание. А – методом проточной цитометрии. Клетки окрашены красителем Cyto-ID, содержащим флуоресцеин-5-изотиоцианат. А (а) – образцы здоровых доноров, А (б) – образцы пациентов с АИТ. Краситель селективно связывается с аутофагосомами. Зеленым, голубым, серым и красным цветом показаны количества внесенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 10 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ соответственно. Б – относительное количество аутофагосом у здоровых доноров (—●—) и пациентов с АИТ (—■—); \* – p < 0,05, \*\*\* – p < 0,0005.

Figure 3. Evaluation of the number of autophagosomes in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes with increasing concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Note. A, by flow cytometry. Cells are stained with Cyto-ID dye containing fluorescein-5-isothiocyanate. A (a), samples of healthy donors; A (b) samples of patients with AIT. The dye selectively binds to autophagosomes. Green, blue, gray and red show the amounts of added H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 10 μM, 20 μM, 30 μM, 40 μM, respectively. B, relative number of autophagosomes in healthy donors (—●—) and patients with AIT (—■—); \*, p < 0.05; \*\*\*, p < 0.0005.



**Рисунок 8. Оценка развития митофагии в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах пациентов с АИТ и здоровых доноров: сравнение количества митохондрий (А) и уровня митофагосом (Б) при индукции окислительного стресса экзогенной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Примечание. Красным цветом окрашены митохондрии. Зеленым – аутофагосомы. Желтым – митохондрии в аутофагосомах (митофагосомах). Показаны репрезентативные данные.

Figure 8. Evaluation of mitophagy development in CD4<sup>+</sup>T lymphocytes of AIT patients and healthy donors: comparison of the number of mitochondria (A) and the level of mitophagosomes (B) during the induction of oxidative stress by exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Note. Mitochondria are colored red. Autophagosomes are colored green. Mitochondria in autophagosomes (mitophagosomes) are colored yellow. Representative data are shown.

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:  
УРАЛ-ПРЕСС – 42311**

