

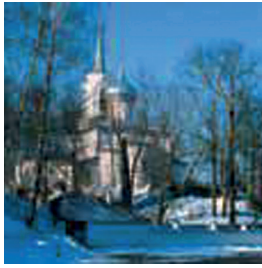
ISSN 1563-0625 (print)
ISSN 2313-741X (online)

Том 27, № 5. С. 893-1152

2025

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



XVI Всероссийская школа по клинической иммунологии

«ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

25 – 31 января 2026 года

Пушкинские Горы, Псковская область

Организаторы:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Российская Академия Наук

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

Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга
Администрация Псковской области

ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России
Институт экспериментальной медицины

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора

Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Российское научное общество иммунологов

Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов

Российское цитокиновое общество

Ассоциация специалистов и организаций
лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»

Санкт-Петербургское региональное отделение Всероссийской Общественной
Организации – Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов

В программе школы:

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

Пакет слушателя включает:

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

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

Координатор проекта:

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

Заявки подавать **до 31 декабря 2025 года.**

Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна
Тел./факс: (812) 644-63-12, e-mail: shkola@spb-raaki.ru
Адрес для корреспонденции:
197101, Санкт-Петербург, а/я 130, СПб РО РААКИ

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

сентябрь-октябрь

2025, том 27

№ 5

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Исполняющий обязанности главного редактора

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 последиplomного образования Минздрава России, Москва, Россия

Кашкин Кирилл Павлович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последиplomного 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 26.09.2025 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 32,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 068

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

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

Тел.: (812) 950-10-99.

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

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

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

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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH

(SPb RAACI)

**MEDICAL
IMMUNOLOGY/
MEDITSINSKAYA
IMMUNOLOGIYA**

September-October

2025, volume 27

No. 5

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Acting Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlovin, PhD, MD

Online version editorial manager:

Erofeeva V.S.

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

Address for correspondence:

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

Electronic version: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

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

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

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

Chelovek Publishing House

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 26.09.2025. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 32.5. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Соколов Д.И.

ГАММА-ДЕЛЬТА ($\gamma\delta$) Т-КЛЕТКИ: ПРОИСХОЖДЕНИЕ, ФЕНОТИП, ФУНКЦИИ..... 899

Акрамова Э.Р., Шарифьянова Ю.В., Гайнуллина Д.Х., Шмелькова П.Н., Калимуллина Л.И., Павлов В.Н., Еникеева К.И.

ТРАНСКРИПТОМИКА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК В ИССЛЕДОВАНИИ РАКА ПРОСТАТЫ 935

Горшков Г.С., Быков А.С., Свитич О.А.

РОЛЬ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ Т-КЛЕТОК В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА 945

Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Тимохина Т.Х., Костоломова Е.Г., Паромова Я.И., Иванова Е.В., Полянских Е.Д., Марков А.А.

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ
БАКТЕРИЙ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ ИММУННОЙ РЕГУЛЯЦИИ, ОПОСРЕДОВАННОЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТОЙ ПРИ COVID-19..... 961

Оригинальные статьи

Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новикова Е.Г., Селятицкая В.Г., Троицкий А.В., Быстрова Т.Н.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОКИСЛЕННОГО ДЕКСТРАНА
ПРИ НАРУШЕНИЯХ СПЕРМАТОГЕНЕЗА ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ГЕНЕЗА 973

Дуплик Н.В., Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Богатырева К.П., Гупалова Т.В., Бормотова Е.А., Королева И.В., Суворов А.Н.

ТАРГЕТНАЯ ВАКЦИНАЦИЯ ПРОТИВ СТРЕПТОКОККА ГРУППЫ А: РЕКОМБИНАНТНАЯ ВАКЦИНА С ФРАГМЕНТАМИ ScpA И SpeA..... 985

Луцкович Д.В., Керезь М.А., Клыч А.В., Луцкович Е.С., Мелешко А.Н.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ANTI-GD2 CAR-T-КЛЕТОК С РАЗЛИЧНЫМ ANTIГЕН-РАСПОЗНАЮЩИМ МОДУЛЕМ 1001

Некрасова Е.В., Орлов С.В.

НЕТРИН-1 АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ СОБСТВЕННОГО ГЕНА И ГЕНА СВОЕГО РЕЦЕПТОРА *unc5b*, НО ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ
ГЕНА *cc1f9* В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ THP-1..... 1013

Павлов О.В., Корнюшина Е.А., Сельков С.А.

ОСОБЕННОСТИ ANTIГЕННОГО ФЕНОТИПА МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ
БЕРЕМЕННОСТИ..... 1021

Шатилов А.А., Шатилова А.В., Асанбаева А.А., Копылова А.Д., Черченко Н.Г., Миславский О.В., Андреев С.М., Смирнов В.В., Хаитов М.Р.

ИЗУЧЕНИЕ АДЪЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНО-ПРОНИКАЮЩИХ КАТИОННЫХ ДЕНДРИМЕРНЫХ ПЕПТИДОВ 1033

Садеж Моради, Мохаммад Рашино, Мохсен Саркарян, Голам Аббас Кайдани, Ладан Фатахи, Мариам Сейедтабид, Муса Шариффат, Али Хоодадади

ОЦЕНКА ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МЕЖДУ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И УРОВНЯМИ IL-12 1043

Минасова А.А., Савочкина А.Ю., Федорова К.С., Нохрин Д.Ю., Саматова А.И., Абрамовских О.С.

ДНКза I L3 и ДНКза II КАК ИНДИКАТОРЫ КАЧЕСТВА ЭЯКУЛЯТА 1053

Путков С.Б., Давыдова Н.В., Казаков С.П.

ИССЛЕДОВАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ОЦЕНКЕ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ COVID-19
И В УСЛОВИЯХ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА..... 1063

Несмеянова В.С., Меркульева Ю.А., Исаева А.А., Волкова Н.В., Беленькая С.В., Борзоякова М.Б., Волосникова Е.А., Есина Т.И.,

Даниленко Е.Д., Зайковская А.В., Олькин С.Е., Пьянков О.В., Ильичев А.А., Щербаков Д.Н.

СУБЪЕДИНИЧНАЯ ВАКЦИНА «ДЕЛЬТА-ВАК» ИНДУЦИРУЕТ СИЛЬНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ
ПРОТИВ SARS-CoV-2..... 1077

Пашинин С.Л., Давыдова Е.В., Альтман Д.Ш., Зурочка В.А., Журавлев И.Ю., Жакупова Я.Т.

ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО КОМПАРТМЕНТА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ УЧАСТНИКОВ
СОВРЕМЕННЫХ БОЕВЫХ КОНФЛИКТОВ 1087

Тышук Е.В., Денисова Е.А., Марко О.Б., Коган И.Ю., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ДЕПРИВАЦИЯ VEGF ВЛИЯЕТ НА ЭКСПРЕССИЮ ЭНДОГЛИНА В КЛЕТКАХ ТРОФОБЛАСТА И ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРАХ..... 1099

Павлов О.В., Челанов С.В., Корнюшина Е.А., Шенгелия М.О., Тхай Д.В., Сельков С.А.

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ТРОМБОЦИТАРНО-МОНОЦИТАРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ 1111

Ольховская А.Ю., Останкова Ю.В., Сайталина М.А., Егорова С.А., Щемелев А.Н., Дрозд И.В., Жимбаева О.Б., Данилова Е.М., Милочкина А.М.,

Башкетова Н.С., Буц Л.В., Толоян Арег А.

АНАЛИЗ РОСТА ДОЛИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗНАЧЕНИЙ УРОВНЕЙ ТРЕС/КРЕС СРЕДИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ
В ПОСТПАНДЕМИЧЕСКИЙ ПЕРИОД 1127

Юбилей..... 1145

Правила для авторов..... 1148

Авторский указатель..... 1151

Предметный указатель..... 1152

CONTENTS

Reviews

Sokolov D.I.

GAMMA DELTA ($\gamma\delta$) T CELLS: ORIGIN, PHENOTYPE, FUNCTIONS 899

Akramova E.R., Sharifyanova Yu.V., Gainullina D.Kh., Shmelkova P.N., Kalimullina L.I., Pavlov V.N., Enikeeva K.I.

SINGLE CELL TRANSCRIPTOMICS IN PROSTATE CANCER RESEARCH 935

Gorshkov G.S., Bykov A.S., Svitich O.A.

ROLE OF MECHANICAL PROPERTIES OF T CELLS IN SHAPING THE IMMUNE RESPONSE 945

Bukharin O.V., Perunova N.B., Timokhina T.K., Kostolomova E.G., Paramova Ya.I., Ivanova E.V., Polyanskiy E.D., Markov A.A.

PROSPECTIVES OF NOVEL THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC MEDICATIONS BASED ON SYMBIOTIC BACTERIAL STRAINS FOR CORRECTION OF IMMUNE DISORDERS MEDIATED BY INTESTINAL MICROBIOTA IN COVID-19 961

Original articles

Churina E.G., Urazova O.I., Novikova E.G., Selyatitskaya V.G., Troitsky A.V., Bystrova T.N.

IMMUNOLOGICAL MECHANISMS OF THERAPEUTIC EFFICACY OF OXIDIZED DEXTRAN IN SPERMATOGENESIS DISORDERS OF INFECTIOUS AND INFLAMMATORY GENESIS 973

Duplik N.V., Leontieva G.F., Kramskaya T.A., Bogatireva K.P., Gupalova T.V., Bormotova E.A., Koroleva I.V., Suvorov A.N.

TARGETING GROUP A STREPTOCOCCUS WITH A RECOMBINANT CHIMERIC VACCINE: INTEGRATING ScpA AND SpeA FRAGMENTS 985

Lutskovich D.V., Keraz M.A., Klych H.V., Lutskovich E.S., Meleshko A.N.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF ANTI-GD2 CAR-T CELLS WITH DIFFERENT ANTIGEN-RECOGNITION MODULE 1001

Nekrasova E.V., Orlov S.V.

NETRIN-1 UPREGULATES THE ITS OWN GENE EXPRESSION AND *unc5b* GENE EXPRESSION, BUT DOWNREGULATES *cc19* GENE EXPRESSION IN HUMAN MACROPHAGES THP-1 CELL LINE 1013

Pavlov O.V., Korniyushina E.A., Selkov S.A.

CHARACTERISTICS OF THE ANTIGENIC PHENOTYPE OF MONOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS 1021

Shatilov A.A., Shatilova A.V., Asanbaeva A.A., Kopylova A.D., Cherchenko N.G., Mislavskii O.V., Andreev S.M., Smirnov V.V., Khaitov M.R.

STUDYING ADJUVANT PROPERTIES OF CELL-PENETRATING CATIONIC DENDRIMERIC PEPTIDES 1033

Sadegh Moradi, Mohammad Rashno, Mohsen Sarkarian, Gholam Abbas Kaydani, Ladan Fatahi, Maryam Seyedtabib, Moosa Shariffat, Ali Khodadadi

EVALUATING THE RELATIONSHIP BETWEEN HUMAN PAPILLOMA VIRUS INFECTIONS, PROSTATE CANCER AND INTERLEUKIN-12 LEVELS 1043

Minasova A.A., Savochkina A.Yu., Fedorova K.S., Nokhrin D.Yu., Samatova A.I., Abramovskikh O.S.

DNase 1L3 AND DNase II AS INDICATORS OF EJACULATE QUALITY 1053

Putkov S.B., Davydova N.V., Kazakov S.P.

SUBPOPULATION PROFILE OF BLOOD LEUKOCYTES IN ASSESSING SEVERITY OF COVID-19 AND IN CONDITIONS ASSOCIATED WITH CYTOKINE STORMS 1063

Nesmeyanova V.S., Merkulyeva Yu.A., Isaeva A.A., Volkova N.V., Belenkaya S.V., Borgoyakova M.B., Volosnikova E.A., Esina T.I., Danilenko E.D., Zaikovskaya A.V., Olkin S.E., Pyankov O.V., Illichev A.A., Shcherbakov D.N.

"DELTA-VAC" SUBUNIT VACCINE INDUCES STRONG HUMORAL IMMUNE RESPONSE AGAINST SARS-CoV-2 1077

Pashnin S.L., Davydova E.V., Altman D.Sh., Zurochka V.A., Zhuravlev I.Yu., Zhakupova Ya.T.

CYTOMETRIC FEATURES OF CELLULAR IMMUNE COMPARTMENT IN PARTICIPANTS OF CURRENT MILITARY CONFLICTS 1087

Tyshchuk E.V., Denisova E.A., Marko O.B., Kogan I.Yu., Selkov S.A., Sokolov D.I.

VEGF DEPRIVATION AFFECTS ENDOGLIN EXPRESSION IN TROPHOBLAST CELLS AND NATURAL KILLERS 1099

Pavlov O.V., Chepanov S.V., Korniyushina E.A., Shengellia M.O., Tkhai D.V., Selkov S.A.

POSSIBLE ROLE OF PLATELET-MONOCYTE COMPLEXES IN THE PATHOGENESIS OF RECURRENT PREGNANCY LOSS 1111

Olkhovskaya A.Yu., Ostankova Yu.V., Saitgalina M.A., Egorova S.A., Shchemelev A.N., Drozd I.V., Zhimbaeva O.B., Danilova E.M., Milichkina A.M., Bashketova N.S., Buts L.V., Totolian Areg A.

INCREASED INCIDENCE OF ABNORMAL TREC/KREC LEVELS IS REVEALED IN VIRTUALLY HEALTHY INDIVIDUALS OVER THE POST-PANDEMIC PERIOD 1127

Anniversary 1145

Instructions to Authors 1148

Author index 1151

Subject index 1152

ГАММА-ДЕЛЬТА ($\gamma\delta$) Т-КЛЕТКИ: ПРОИСХОЖДЕНИЕ, ФЕНОТИП, ФУНКЦИИ

Соколов Д.И.

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

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Важнейшей функцией $\gamma\delta$ Т-клеток является контроль за реакциями врожденного и адаптивного иммунитета. Эти клетки также участвуют в противобактериальном, противовирусном, противоопухолевом иммунитете, регулируют воспаление, определяют гомеостаз барьерных тканей, регулируют взаимодействие клеток в зоне маточно-плацентарного контакта и осуществляют надзор за течением беременности, участвуют в патогенезе аутоиммунных заболеваний, участвуют в ранозаживлении, поддерживают целостность эпителия. За последние годы в литературе появилось большое количество данных о многообразии субпопуляций $\gamma\delta$ Т-клеток, порой противоположных, или даже антагонистических, роли этих субпопуляций в физиологических и патологических процессах. Поэтому целью настоящего обзора явилась систематизация данных о биологии $\gamma\delta$ Т-клеток, их происхождении, фенотипе, функциях и способах применения в клинике. В обзоре изложены современные представления о происхождении $\gamma\delta$ Т-клеток, стадиях их внутритимической дифференцировки, возможностях внетимической трансдифференцировки одних субпопуляций в другие. В обзоре приведена современная классификация субпопуляций $\gamma\delta$ Т-клеток человека, основанная на экспрессии γ - и δ -цепей Т-клеточного рецептора, описаны фенотип и свойства наиболее распространенных популяций V δ 1, V δ 2, V δ 3 Т-клеток. Приведена классификация $\gamma\delta$ Т-клеток человека, основанная на продукции ими цитокинов и экспрессии внутриклеточных мессенджеров, подробно описаны свойства и функции наиболее изученных субпопуляций: $\gamma\delta$ T1, $\gamma\delta$ T17, $\gamma\delta$ NKT, $\gamma\delta$ Treg, $\gamma\delta$ T_{APC}, $\gamma\delta$ Tfh. В обзоре особое внимание уделяется фенотипу различных популяций, секреции ими цитокинов, приводятся данные об экспрессии поверхностных рецепторов $\gamma\delta$ Т-клеток человека и их функциях. В частности, рассмотрены особенности строения и лиганды $\gamma\delta$ Т-клеточного рецептора, а также рецепторы, контролирующие их активность (LIRB1/ILT2, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR3DL2, KLRD1, NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2F, NKp30, NKp44, NKp46, KLRC3, DNAM1, KLRG1/MAFA, Fc γ RIII, BTLA, PD1, TIGIT, VISTA, LAG3, TIM3, CTLA-4, 2B4, NK1 (NK28), KLRB1, TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8), цитотоксичность в отношении клеток-мишеней, хемокиновые CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3,

Адрес для переписки:

Соколов Дмитрий Игоревич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (911) 243-69-50.
E-mail: falcojigger@yandex.ru

Address for correspondence:

Dmitry I. Sokolov
D. Ott Research Institute of Obstetrics,
Gynecology and Reproductology
3 Mendeleevskaya Line
St. Petersburg
199034 Russian Federation
Phone: +7 (911) 243-69-50.
E-mail: falcojigger@yandex.ru

Образец цитирования:

Д.И. Соколов «Гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетки: происхождение, фенотип, функции» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 899-934.
doi: 10.15789/1563-0625-GDT-3160

© Соколов Д.И., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.I. Sokolov "Gamma delta ($\gamma\delta$) T cells: origin, phenotype, functions", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 5, pp. 899-934.
doi: 10.15789/1563-0625-GDT-3160

© Sokolov D.I., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-GDT-3160

CXCR4, CXCR5, цитокиновые и адгезионные рецепторы. В обзоре приведена информация об участии субпопуляций $\gamma\delta$ T-клеток человека в различных физиологических и патологических процессах, отмечена их неоднозначная роль в надзоре за опухолевым ростом. На основании описанных данных приводятся сведения о возможных перспективах применения $\gamma\delta$ T-клеток в терапии некоторых заболеваний.

Ключевые слова: $\gamma\delta$ T-клетки, лимфоциты, фенотип, цитотоксичность, цитокины, дифференцировка

GAMMA DELTA ($\gamma\delta$) T CELLS: ORIGIN, PHENOTYPE, FUNCTIONS

Sokolov D.I.

*D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation
Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. The primary function of $\gamma\delta$ T cells is to regulate the responses of innate and adaptive immune systems. These cells also play a role in antibacterial, antiviral and antitumor immune responses, regulate inflammation, maintain homeostasis in barrier tissues, control cell interactions in the uteroplacental interface, monitor pregnancy progression, contribute to the pathogenesis of autoimmune disorders, participate in wound repair, and maintain epithelial integrity. Over recent years, numerous data were presented on the diversity of $\gamma\delta$ T cell subpopulations and its role in physiological and pathological processes, sometimes being controversial, or even antagonistic. Hence, the purpose of this review was to systematize data on the biology of $\gamma\delta$ T cells, including their origin, phenotype, functions, and approaches to their clinical application. The article presents modern concepts regarding the origin of $\gamma\delta$ T cells, stages of their intrathymic differentiation, and extra-thymic potential for trans-differentiation of some subpopulations. The review presents a modern classification of human $\gamma\delta$ T cells based on expression of γ - and δ -chains of the T cell receptor, their phenotype and describes the properties of the most common populations of V δ 1, V δ 2, V δ 3 T cells. Classification of human $\gamma\delta$ T cells based on their cytokine production and expression of intracellular messengers is proposed, the properties and functions of the most studied subpopulations are described in details: $\gamma\delta$ T1, $\gamma\delta$ T17, $\gamma\delta$ NKT, $\gamma\delta$ Treg, $\gamma\delta$ TAPC, $\gamma\delta$ Tfh. The review pays special attention to the phenotype of various populations, their ability for cytokine secretion, and provides data on expression of surface receptors of human $\gamma\delta$ T cells and their functions. In particular, the structural features and ligands of the $\gamma\delta$ T cell receptor, are addressed as well as specific receptors controlling their activity (LIRB1/ILT2, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR2DL4, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR3DL2, KLRD1, NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2F, NKp30, NKp44, NKp46, KLRC3, DNAM1, KLRG1/MAFA, Fc γ RIII, BTLA, PD1, TIGIT, VISTA, LAG3, TIM3, CTLA-4, 2B4, NK1 (NK28), KLRB1, TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8), cytotoxicity against target cells, chemokines CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, cytokine and adhesion receptors. The review provides information on the participation of human $\gamma\delta$ T cell subpopulations under various physiological and pathological conditions, and their role in the tumor surveillance. On this basis, possible prospects for usage of $\gamma\delta$ T cells in the treatment of distinct diseases are also discussed.

Keywords: $\gamma\delta$ T cells, lymphocytes, phenotype, cytotoxicity, cytokines, differentiation

Работа поддержана грантом РФФ 25-24-00028.

Введение

Среди Т-лимфоцитов выделяют две субпопуляции: 1) классические Т-лимфоциты, экспрессирующие Т-клеточный рецептор (TCR) из α - и β -цепей ($\alpha\beta$ T); 2) $\gamma\delta$ T-клетки экспрессиру-

ющие $\gamma\delta$ TCR, общее количество которых по разным оценкам составляет от 0,5% до 5,0% от всех Т-лимфоцитов [298]. Несмотря на такую немногочисленность, представительство в определенных тканях и органах $\gamma\delta$ T-клеток выглядит довольно значительным. Установлено, что их доля от всех Т-лимфоцитов в децидуальной оболочке

и в слизистой кишечника составляет около 60%, в *lamina propria* – превышает 40%, в коже – от 15% до 30% [50, 165, 249]. По разным данным в крови доля $\gamma\delta$ Т-клеток может составлять от 5% до 15% от всех Т-лимфоцитов, увеличиваясь при различных инфекциях до 50% [263]. $\gamma\delta$ Т-клетки также располагаются в селезенке, печени, в слизистой оболочке дыхательного и репродуктивного тракта [62, 196]. Важнейшей функцией $\gamma\delta$ Т-клеток является контроль за реакциями врожденного и адаптивного иммунитета [31, 146]. Эти клетки также участвуют в противобактериальном, противовирусном, противоопухолевом иммунитете [95, 142, 196], регулируют воспаление, определяют гомеостаз барьерных тканей [187, 196], регулируют взаимодействие клеток в зоне маточно-плацентарного контакта и осуществляют надзор за течением беременности [86, 234], участвуют в патогенезе аутоиммунных заболеваний [173, 174], участвуют в ранозаживлении, поддерживают целостность эпителия [238].

Распознавание антигена $\gamma\delta$ Т-клетками не зависит от презентации антигена в составе молекул МНС, что расширяет их возможности в реализации различных реакций иммунного ответа [10, 264]. Благодаря этому $\gamma\delta$ Т-клетки воспринимают более широкий спектр антигенов, включая экзогенные и эндогенные, аутоантигены и чужеродные вещества [147, 212, 219], стресс-индуцированные антигены, фосфоантигены и другие непептидные молекулы. При этом, в отличие от $\alpha\beta$ Т-клеток, для участия в регуляции иммунного ответа $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть активированы единственным сигналом [48]. $\gamma\delta$ Т-клетки могут распознавать микроорганизмы и инфицированные или трансформированные клетки хозяина [79] и проявлять прямую цитотоксическую активность за счет высвобождения гранзимов и перфоринов, вовлечения Fas/FasL или TRAIL рецепторов, продукции TNF α [106]. Более того, они также могут генерировать клетки памяти, действуя как адаптивные иммунные Т-клетки [141].

С другой стороны, $\gamma\delta$ Т-клетки имеют рецепторы врожденного иммунитета, обеспечивая раннюю иммунную защиту даже при отсутствии предварительного воздействия антигена [147, 212]. Они реализуют неспецифическую цитотоксичность в отношении мишеней, опосредованную рецепторами естественных киллеров (NKR – natural killer cell receptor) [140, 301], антителозависимую зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) [90]. Установлено, что $\gamma\delta$ Т-клетки могут фагоцитировать частицы и действовать как профессиональные антигенпрезентирующие клетки [7]. Эти клетки секрети-

руют множество цитокинов [298] и определяют активность множества клеток микроокружения, в том числе макрофагов, естественных киллеров, дендритных клеток и $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов [29, 135].

За последние годы в литературе появилось большое количество данных о многообразии субпопуляций $\gamma\delta$ Т-клеток, порой противоположных, или даже антагонистических, роли этих субпопуляций в физиологических и патологических процессах; появились сведения о применении этих клеток в терапии в основном опухолевых заболеваний. Поэтому целью настоящего обзора явилась систематизация данных о биологии $\gamma\delta$ Т-клеток, их происхождении, фенотипе, функциях и способах применения в клинике.

1. Происхождение $\gamma\delta$ Т-клеток

Наиболее полно происхождение и дифференцировка $\gamma\delta$ Т-клеток изучены на мышинной модели [83]. Сопределенными допущениями полагают, что этапы их дифференцировки в тимусе человека имеют сходный характер. $\gamma\delta$ Т-клетки развиваются в тимусе из Т-клеток-предшественников, происходящих из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга [204]. Механизмы рекомбинации $\gamma\delta$ TCR V(D)J подробно описаны в различных работах [51, 97, 235, 296]. Большинство $\gamma\delta$ Т-клеток покидают тимус на стадии двойной негативной (DN) клетки (DN2-DN3). Некоторые $\gamma\delta$ Т-клетки проходят стадии DN и двойной позитивной (DP) клетки или DN, DP и однопозитивной (SP: CD4⁺ или CD8⁺) клетки [12, 159, 179]. В периферической крови человека обнаруживают DP и SP $\gamma\delta$ Т-клетки, при этом среди перечисленных фенотипов наиболее распространенным у человека являются CD8⁺ $\gamma\delta$ Т-клетки [214, 251]. На мышинной модели показано, что в условиях дифференцировки в тимусе передача сигналов TCR без сигнала Notch способствует образованию $\gamma\delta$ Т-клеток. Наоборот, низкий сигнал TCR при одновременно сильном сигналинге через Notch способствует образованию $\alpha\beta$ Т-клеток [294]. Дифференцировка $\gamma\delta$ Т-клеток человека может идти по Notch-независимому DN-пути, результатом которого будет образование зрелых DN и SP (CD8⁺) $\gamma\delta$ Т-клеток. Напротив, дифференцировка $\gamma\delta$ Т-клеток человека по Notch-зависимому DP-пути приводит к образованию сначала незрелых CD4⁺SP-клеток, а затем зрелых DP $\gamma\delta$ Т-клеток [214, 250]. Следует отметить, что роль CD4 или CD8 в распознавании антигена $\gamma\delta$ Т-клетками до сих пор не ясна.

Первоначально среди $\gamma\delta$ Т-клеток выделяли две субпопуляции: V δ 1 и V δ 2 [4]. $\gamma\delta$ Т-клетки впервые обнаруживаются на 5-6-й неделе беременности в печени плода и через 8 недель в тимусе [143,

145]. В середине беременности продуцирующие $IFN\gamma$ V δ 2 Т-клетки являются преобладающей популяцией [54, 282]. При рождении в тимусе и в пуповинной крови доминирующей популяцией является V δ 1 Т-клетки [265, 282]. Полагают, что V δ 2 Т-клетки подвергаются фенотипическому созреванию вскоре после рождения [265]. По мере взросления преобладающей субпопуляцией в периферической крови становятся V γ 9V δ 2 Т-клетки [144].

Особенности развития V γ 9V δ 2 Т-клеток в тимусе к настоящему времени изучены недостаточно. Развитие V γ 9V δ 2 Т-клеток сопровождается изменением экспрессии поверхностных рецепторов, секреции хемокинов и внутриклеточной экспрессии факторов транскрипции. Выделяют следующие этапы дифференцировки $\gamma\delta$ Т-клеток в постнатальном тимусе: 1) клетки с фенотипом CD4⁺CD161^{-low}; 2) клетки с фенотипом CD4⁺CD161⁻; 3) клетки с фенотипом CD4⁺CD161⁺ [144].

В периферической крови человека после 45 лет снова происходит инверсия содержания субпопуляций $\gamma\delta$ Т-клеток: количество V δ 1 Т-клеток увеличивается, а количество V δ 2 Т-клеток падает [92]. Причины такого физиологического феномена инверсии субпопуляций $\gamma\delta$ Т-клеток в течение жизни до сих пор не установлены. Следует отметить, что при различных патологических состояниях также наблюдается инверсия субпопуляций $\gamma\delta$ Т-клеток в сторону преобладания V δ 1 Т-клеток, например при системной красной волчанке [292], раковых заболеваниях и инфекциях (гепатит С, CMV-инфекция, ВИЧ-инфекция [60, 189]), и ее связывают с преимущественным размножением одной из двух популяций при патологическом процессе. Следует отметить, что инверсия в сторону преобладания V δ 1 обеспечивает физиологическое течение беременности, напротив – преобладание у матери V δ 2 ведет к невынашиванию беременности [86].

После окончания дифференцировки $\gamma\delta$ Т-клетки выходят из тимуса в периферическую кровь. В настоящее время среди циркулирующих $\gamma\delta$ Т-клеток выделяют несколько субпопуляций: 1) наивные $\gamma\delta$ Т-клетки; 2) $\gamma\delta$ Т-клетки, продуцирующие $IFN\gamma$ ($\gamma\delta$ T1) [260]; 3) $\gamma\delta$ Т-клетки, продуцирующие IL-17 ($\gamma\delta$ T17); 4) $\gamma\delta$ Т-клетки, продуцирующие $IFN\gamma$ /IL-4 ($\gamma\delta$ NKT или CD56⁺ $\gamma\delta$ T); 5) очень редкие CD4⁺ $\gamma\delta$ Т-клетки; 6) очень редкие CD8⁺ $\gamma\delta$ Т-клетки. Также выделяют (7) $\gamma\delta$ Treg-клетки, которые имеют фенотип CD73⁺FoxP3⁺V δ 1⁺ либо CD39⁺FoxP3⁺V δ 1⁺ и обнаружены в периферической крови, а также в ткани опухоли пациентов с раком молочной железы [163, 182] и раком толстой кишки;

8) $\gamma\delta$ T_{APC} – антигенпрезентирующие клетки [16]; 9) $\gamma\delta$ T2 (продуцирующие IL-4, у человека описаны только при дифференцировке *in vitro*) [260]; 10) $\gamma\delta$ T1/ $\gamma\delta$ T17 (продуцирующие как $IFN\gamma$, так и IL-17); 11) $\gamma\delta$ Tfh-клетки [6]; 12) $\gamma\delta$ T9 (продуцирующие IL-9, у человека описаны только при дифференцировке *in vitro*) [180].

2. Фенотип $\gamma\delta$ Т-клеток

Различные субпопуляции $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют на своей поверхности множество различных рецепторов (табл. 1, 2 и 3), определяющих их функциональную активность. Судьба циркулирующих в кровотоке $\gamma\delta$ Т-клеток определяется комбинацией хемокинов в микроокружении, экспрессируемых этими клетками, и молекул адгезии и хемокиновых рецепторов, которые контролируют миграцию в кожу, слизистую оболочку и кишечник, а также определяют, останутся ли эти клетки в качестве резидентных клеток или вернуться в циркуляцию.

У человека на основании расположения, экспрессии δ -цепей, экспрессии определенных генов, фенотипа и функций выделяют следующие популяции $\gamma\delta$ Т-клеток: 1) V δ 1 – эти клетки обнаружены в небольших количествах в кровотоке, а также составляют внушительную долю среди Т-лимфоцитов в печени, селезенке, кишечнике, дерме и экспрессируют различные варианты γ -цепей: V γ 2; V γ 3; V γ 4; V γ 5; V γ 8; V γ 9; 2) V δ 2 – у взрослого человека до 45 лет это мажорная субпопуляция в периферической крови, клетки которой экспрессируют V γ 9-цепь; 3) V δ 3 – эти $\gamma\delta$ Т-клетки находятся в печени и в кишечнике, а также в незначительных количествах обнаружены в периферической крови, экспрессируют V γ 2- и V γ 3-цепи [103, 261] и распознают те же лиганды, что и V δ 1 [198]; 4) V δ 4, V δ 6, V δ 7 – эти клетки обнаружены в периферической крови пациентов с лимфомой и экспрессируют V γ 1-цепь [257]. Полагают, что для V δ 1 в большей степени характерны функции клеток адаптивного иммунитета и способность образовывать клетки «подобные памяти», тогда как для V δ 2 более характерны признаки клеток врожденного иммунитета [40, 190].

Так же как и среди $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов, среди $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов выделяют следующие субпопуляции: 1) T_{naive} – наивные клетки с фенотипом CD45RA⁺CD27⁺; 2) T_{CM} – клетки центральной памяти с фенотипом CD45RA⁻CD27⁺, не обладающие эффекторными свойствами и экспрессирующие рецепторы для миграции в лимфатические узлы; 3) T_{EM} – клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45RA⁻CD27⁻; 4) T_{EMRA} – терминально дифференцированные клетки с феноти-

ТАБЛИЦА 1. ПОВЕРХНОСТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ γδT-КЛЕТОК

TABLE 1. RECEPTORS ON THE CYTOPLASMIC MEMBRANE OF γδT CELLS

| Рецептор Receptor | Популяция γδT γδT population | Лиганд Ligand | Функция Function |
|----------------------|--|---|---|
| γδTCR | <p>Указанные лиганды описаны преимущественно для Vδ1 и Vδ2, редко для других популяций γδT-клеток These ligands are described mainly for Vδ1 and Vδ2, rarely for other populations of γδT cells</p> | <p>Annexin A2 [98, 138], CD1a [258], CD1d [134], CD1c [206]; BTN3A1 [171, 210], BTN2A1 [100, 200], BTNL3 [100, 268]; EPCR [267]; EphA2; HLA-A24 [34], HLA-B27-ci [46], HLA-A2 [225], HLA-A*24:2 [105], HLA-A2/MART-1 [10]; hMSH2 [220]; MR-1; bacillus Calmette-Guérin Protein Antigen [279]; MICA/B, ULBP4 [75] staphylococcal enterotoxin A [207]; mycobacterium tuberculosis Superantigen [278]; listeriolysin O peptide [76] peptide from Tetanus toxin [82, 111]</p> | <p>При связывании с лигандом инициирует пролиферацию, секрецию цитокинов (IL-2, IFNγ, IL-17), цитотоксичность [224] Upon binding to the ligand, it initiates proliferation, cytokine secretion (IL-2, IFNγ, IL-17), cytotoxicity [224]</p> |
| CD2 (LFA-2) | Vγ9Vδ2 [139] | CD58, CD48 [156] | Адгезия Adhesion |
| CD3 | γδT | T-лимфоцитарный маркер T lymphocytic marker | Проведение сигнала в случае соединения γδTCR с лигандом Conducting a signal in the case of binding of γδTCR with a ligand |
| CD4 | Vδ3 [41, 134] | Нет данных No data | Нет данных No data |
| CD8 | Vδ3 [41, 134] | Нет данных No data | Нет данных No data |
| CD11a/CD18 (LFA-1) | Vγ9Vδ2 [139] | ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 [23, 24, 156] | Адгезия Adhesion |
| CD16 (FcγRIII) | Vδ1, Vδ2, Vδ3 [60, 123, 244] | IgG | Антителозависимая клеточная клеточная цитотоксичность Antibody-dependent cellular cytotoxicity |
| CD25 (IL-2Rα) | <p>γδT в составе PBMC [226], Vδ1, Vδ2 [127], γδT в составе PBMC [226] γδT as part of PBMC [226], Vδ1, Vδ2 [127], γδT as part of PBMC [226]</p> | IL-2 | Пролиферация Proliferation |
| CD27 | Vδ2 [42] | CD70 | Дифференцировка, клональная экспансия Differentiation, clonal expansion |
| CD28 | Vδ2Vγ9 [256] | CD80, CD86 | Дифференцировка, пролиферация Differentiation, proliferation |

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

| Рецептор Receptor | Популяция $\gamma\delta$ T $\gamma\delta$ T population | Лиганд Ligand | Функция Function |
|----------------------|--|--|--|
| CD30 | $\gamma\delta$ T-клеточная лимфома [74] $\gamma\delta$ T cell lymphoma [74] | TRAF2, TRAF5 | Активирует в клетке-мишени NF-κB Activates NF- κ B in the target cell |
| CD38 | V δ 1 [109], V δ 3 [41] | CD31 | Производство цитокинов Cytokine production |
| CD39 | V δ 1, V δ 3 [41, 128] | АТФ, АДФ, УТФ и UDP ATP, ADP, UTP and UDP | Эктонуклеотидаза, которая катализирует гидролиз γ- и β-фосфатных остатков трифосфо- и дифосфонуклеозидов до производного монофосфонуклеозида Ectonucleotidase, catalyzes the hydrolysis of γ - and β -phosphate residues of triphospho- and diphosphonucleosides to a monophosphonucleoside derivative |
| CD45 | $\gamma\delta$ T | | Панлейкоцитарный маркер Panleukocytic marker |
| CD52 | V δ 1 [109] | ITIM (ингибирующий мотив иммунорецепторов на основе тирозина), несущий лектин, связывающий сиаловую кислоту SIGLEC10 ITIM (tyrosine-based immunoreceptor inhibitory motif), carrying lectin binding sialic acid SIGLEC10 | Маркер зрелых лимфоцитов, снижает вероятность адгезии Marker of mature lymphocytes, reduces adhesion |
| CD70 | V δ 2 [42] | CD27 | Дифференцировка, клональная экспансия Differentiation, clonal expansion |
| CD71 | V δ 1 [109] | Трансферрин Transferrin | Транспорт трансферрина в клетку путем эндоцитоза Transferrin transport into the cell by endocytosis |
| CD73 | V δ 1, V δ 2 [8, 27] | АМФ AMP | Преобразования АМФ в аденозин Conversion of AMP to adenosine |
| CD56 | V δ 1 [60], V δ 3 [134] | | Neural cell adhesion molecule (NCAM), маркер принадлежности к субпопуляции $\gamma\delta$NKT Neural cell adhesion molecule (NCAM), a marker of belonging to the $\gamma\delta$ NKT subpopulation |
| CD57 | V δ 1 [60] | | Маркер терминальной дифференцировки [164] A marker of terminal differentiation [164] |

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

| Рецептор Receptor | Популяция γδT γδT population | Лиганд Ligand | Функция Function |
|------------------------|--|--|--|
| CD69 | γδT в составе PBMC [60, 226], Vδ1, Vδ2 [127] γδT as part of PBMC [60, 226], Vδ1, Vδ2 [127]. | Gal-1 | Маркер ранней активации лимфоцитов, регулирует секрецию IFNγ, IL-17 и IL-22 [33] A marker of early activation of lymphocytes, regulates the secretion of IFN γ , IL-17 and IL-22 [33] |
| CD80/CD86 | Vδ1, Vδ2 [127] | CTLA-4, CD28 | Модулирование активности клетки-мишени Modulating the activity of the target cell |
| CD95 (Fas) | Vδ1 [221] | CD95L | Маркер готовности клетки к апоптозу A marker of cell readiness for apoptosis |
| CD95L (FasL) | Vδ1 [221] | CD95 | Апоптоз Apoptosis |
| CD103 | Vδ1, Vδ3 (mRNA) [41], Vδ1 [109] | Е-кадгерин E-cadherin | Адгезия к эпителию Adhesion to the epithelium |
| CD107a | Vδ1 [60] Vδ1 Vδ2, Vδ3 (mRNA) [41] | | Маркер дегрануляции в результате активации клетки A marker of degranulation as a result of cell activation |
| CD122 (IL-2R β) | Vδ1 [109] (mRNA) | IL-2 | Пролиферация Proliferation |
| CD137 | Vδ1, Vδ2, Vδ3 [41] | CD137L | Маркер активации, костимуляторная молекула для активации макрофагов и дендритных клеток [169] An activation marker, a costimulatory molecule for the activation of macrophages and dendritic cells [169] |
| CD161 | Vδ1, Vδ2, Vδ3 [41] | LLT-1 | Ингибирование Inhibition |
| CD226 | Vδ1, Vδ2, Vδ3 [41] (mRNA) | CD112, CD155 | Адгезия, помогает в лизисе клеток гепатоцеллюлярной карциномы [239] Adhesion, helps in the lysis of hepatocellular carcinoma cells [239] |
| CD247 | Vδ1 [109] (mRNA) | γδTCR | CD ζ-цепь, образует с γδTCR гетеродимер [32] CD ζ is a chain that forms a heterodimer with γδTCR [32] |
| CD272 (BTLA) | Vδ2 [118] | CD160, вирус герпеса, LIGHT CD160, herpes virus, LIGHT | При связывании с CD160, вирус герпеса – ингибция, при связывании с LIGHT [166] When binding to CD160, herpes virus is inhibited when binding to LIGHT [166] |

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

| Рецептор Receptor | Популяция $\gamma\delta$ T $\gamma\delta$ T population | Лиганд Ligand | Функция Function |
|----------------------|--|--|---|
| CD357 | $\gamma\delta$ Treg [3] V δ 1, V δ 3 (mRNA) [41] | GITRL | Активация, пролиферация, выработка цитокинов, защита от апоптоза Activation, proliferation, cytokine production, protection from apoptosis |
| HLA-DR | V δ 1 [109], V δ 2 [81, 127], V δ 3 [134] | $\alpha\beta$ TCR | Презентация или кросспрезентация антигенов как CD4⁺, так и CD8⁺ $\alpha\beta$T-лимфоцитам [14, 151] Presentation or cross-presentation of antigens to both CD4 ⁺ and CD8 ⁺ $\alpha\beta$ T lymphocytes [14, 151] |
| CD85J (ILT2, LILRB1) | V γ 9V δ 2 [125] | Молекулы МНС класса I MHC Class I molecules | Ингибирование Inhibition |
| TRAIL | V δ 1, V δ 2 [262] | TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR5) | Связывание с DR4 или DR5 инициирует апоптоз мишени, связывание с DcR1 или DcR5 позволяет мишени избежать апоптоза Binding to DR4 or DR5 initiates apoptosis of the target, binding to Ddr1 or Ddr 5 allows the target to avoid apoptosis |
| Notch | V δ 2 [73] | Notch ligands (Delta-like-1, Delta-like-3, Delta-like-4; Jagged 1, Jagged 2) | Стимуляция пролиферации, стимуляция цитотоксичности в отношении опухолевой клетки Stimulation of proliferation, stimulation of cytotoxicity against a tumor cell |

пом CD45RA⁺CD27⁻, экспрессирующие рецепторы для возвращения в очаги воспаления: они слабо представлены в лимфатических узлах, хотя в избытке присутствуют в очагах воспаления, и проявляют эффекторные функции [52, 203]. Эти субпопуляции $\gamma\delta$ T-клеток обладают разной пролиферативной активностью, а T_{CM} обладают способностью дифференцироваться антигеннезависимым образом в T_{EM} и T_{EMRA} [19]. Например, установлено, что в некоторых опухолях находятся V δ 1 T-клетки с фенотипом T_{CM} или T_{EM} и V δ 2 T-клетки с фенотипом T_{EM} или T_{EMRA} [131, 132].

2.1. $\gamma\delta$ TCR и его лиганды

Рецептор $\gamma\delta$ TCR, экспрессируемый этими клетками и определяющий их принадлежность к отдельному подклассу T-лимфоцитов, не требует презентации антигена в составе МНС. Несмотря

на это некоторые субпопуляции $\gamma\delta$ T-клеток сохранили способность распознавания некоторых молекул локуса МНС (HLA) своими $\gamma\delta$ TCR (табл. 1) вне зависимости от наличия пептида в составе МНС [10, 46]. Полагают, что такие $\gamma\delta$ T-клетки являются аллореактивными [5, 291]. В литературе не удалось найти достаточно убедительной информации о возможных корецепторах, необходимых для распознавания по аналогии $\alpha\beta$ TCR. Одним из возможных кандидатов на функцию корецептора при распознавании антигена $\gamma\delta$ TCR считают бутирофилины и бутирофилиноподобные молекулы (Btl1/BTNL) [268], а также CD27 и NKG2D [195]. Полагают, что простого связывания $\gamma\delta$ TCR с родственником ему антигеном достаточно для активации $\gamma\delta$ T-клетки. Следует отметить, что аффинность большинства

ТАБЛИЦА 2. ХЕМОКИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ НА γδT-КЛЕТКАХ

TABLE 2. CHEMOKINE RECEPTORS ON γδT CELLS

| Рецептор Receptor | CD | Популяция γδT γδT population | Лиганд Ligand | Итог взаимодействия рецептора с лигандом Result of the interaction of the receptor with the ligand |
|----------------------|--------|---|--|---|
| CCR1 | CD191 | Vδ1, Vδ2 [71] | CCL3 (MIP-1α), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL23 (MPIF-1) | Миграция в зону воспаления [35] Migration to the inflammatory zone [35] |
| CCR2 | CD192 | Vδ1, Vδ2 | | Миграция в опухоли: поджелудочная железа [39], легкие [47], предстательная железа, печень, молочная железа [117] Migration to tumors: pancreas [39], lungs [47], prostate, liver, mammary gland [117] |
| CCR3 | CD193 | Vδ1, Vδ2 [71] | CCL11 (eotaxin), CCL26 (eotaxin-3), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4), CCL5 (RANTES) | Миграция в зону воспаления Migration to the area of inflammation |
| CCR4 | CD194 | Vδ1, Vδ2 [299] | CCL2 (MCP-1), CCL4 (MIP-1), CCL5 (RANTES), CCL17 (TARC), CCL22 | Миграция в лимфатические узлы Migration to the lymph nodes |
| CCR5 | CD195 | Vδ1 [47], Vδ2 [71] | CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β) и CCL5 (RANTES) [71] | Миграция в поджелудочную железу [39], в полость сустава при ревматоидном артрите [154], миграция в легкие при опухоли [47], миграция в зону воспаления [71] Migration to the pancreas [39], to the joint cavity in rheumatoid arthritis [154], migration to the lungs in tumors [47], migration to the inflammatory zone [71] |
| CCR6 | CD196 | Vδ1 (Tγδ17), Vδ1, Vδ2 [71] | CCL20 (MIP-3α) | Миграция в эпидермальный слой кожи [65], миграция в слизистые оболочки [61, 114], миграция в поджелудочную железу [39], миграция в легкие при опухоли [47] Migration to the epidermal layer of the skin [65], migration to the mucous membranes [61, 114], migration to the pancreas [39], migration to the lungs in case of a tumor [47] |
| CCR7 | CD197 | Vδ1, Vδ2 [71] | CCL19 и CCL21 | Миграция в лимфатические узлы [71] Migration to the lymph nodes [71] |
| CCR9 | CDw199 | Vδ2 | CCL25 | Тонкий кишечник, эпидермальный слой кожи [183, 248] The small intestine, the epidermal layer of the skin [183, 248] |
| CCR10 | | γδT мышь, Vδ1 человек γδT mouse, Vδ1 human | CCL27 (CTACK) [65, 85] | Миграция в эпидермальный слой кожи [94, 165] Migration into the epidermal layer of the skin [94, 165] |
| CXCR1 (IL8Rα) | CD128 | Vδ1 [71] | CXCL5, CXCL6, CXCL8 | Миграция в зону воспаления [96] Migration to the inflammatory zone [96] |
| CXCR2 (IL8Rβ) | CD182 | Vδ1, Vδ2 [71] | IL-8, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL1 | Миграция в зону воспаления Migration to the area of inflammation |

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

| Рецептор Receptor | CD | Популяция $\gamma\delta$ T $\gamma\delta$ T population | Лиганд Ligand | Итог взаимодействия рецептора с лигандом Result of the interaction of the receptor with the ligand |
|----------------------|-------|--|--|---|
| CXCR3 | CD183 | V δ 1, V δ 2 | CXCL10, CXCL11 | Миграция в полость сустава при ревматоидном артрите [154], трансэндотелиальная миграция [183], миграция в зону воспаления [71] Migration to the joint cavity in rheumatoid arthritis [154], transendothelial migration [183], migration to the inflammatory zone [71] |
| CXCR4 | CD184 | V δ 1, V δ 2 | SDF-1/CXCL12 | Трансэндотелиальная миграция [183] Transendothelial migration [183] |
| CXCR5 | CD185 | V δ 1, V δ 2 [71] | RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β | Миграция в фолликулы лимфатических узлов [15] Migration to the follicles of lymph nodes [15] |

$\gamma\delta$ TCR к антигенам низкая, но благодаря высокой плотности молекул $\gamma\delta$ TCR на поверхности клетки создается высокая avidность связывания с антигеном [31]. Исходя из этой концепции, для $\gamma\delta$ TCR антигенами могут быть практически любые молекулы, присутствующие на поверхности клеток или в окружающем внеклеточном пространстве. В этом смысле аналогии между мышью моделью и человеком несостоятельны, экспериментальные модели наподобие моделей с трансгенными мышами для подтверждения сродства антигена определенным рецепторам в человеческой модели невозможны.

Тем не менее на сегодняшний день известно несколько лигандов для человеческого $\gamma\delta$ TCR: молекулы локуса HLA – HLA-A24 [34], HLA-B27-ci [46], HLA-A2 [225], HLA-A 24:2 [105], HLA-A2/MART-1 [10]; структурные аналоги молекулы локуса HLA – CD1a [258], CD1d [134], CD1c [206], MICA/B, ULBP4; бутирофилины BTN3A1, BTN2A1, BTN1A1; суперантигены некоторых бактерий и другие молекулы (табл. 1).

T-лимфоциты, экспрессирующие $\alpha\beta$ TCR, распознают фрагменты антигена в составе комплекса антигенпредставляющих молекул главного комплекса гистосовместимости. Помимо молекул локуса HLA у человека функцию антигенпрезентации выполняют молекулы семейства CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и CD1d) и рецептор MR1 (MHC class I-related). Эти рецепторы необходимы для распознавания липидных антигенов T-клетками [205, 252] и экспрессируются на поверхности некоторых профессиональных антигенпрезентирующих клеток: В-лимфоциты, дендритные клетки [11] и клетки Лангерганса.

Рецептор MR1 экспрессируется клетками в условиях метаболического стресса, раковыми клетками, инфицированными бактериями клетками [107, 241, 284]. MR1 связывает метаболиты, полученные в результате бактериального биосинтеза рибофлавина или фолиевой кислоты [112, 124]. Поскольку млекопитающие не обладают способностью синтезировать витамины группы В, эти небольшие молекулы действуют как индикатор бактериальной инфекции [112]. MR1 презентует метаболиты витаминов группы В лимфоцитам MAIT (Mucosal-associated invariant T cells) – это T-клетки, экспрессирующие инвариантную α -цепь TCR и локализованные в слизистой оболочке [236]. Логика распознавания антигена в комплексах $\alpha\beta$ TCR-липид-CD1 и $\alpha\beta$ TCR-метаболит-MR1 такая же, как и для обычного взаимодействия $\alpha\beta$ TCR с молекулами локуса HLA [252]. Несмотря на это, установлено, что некоторые аутореактивные $\alpha\beta$ TCR, рестриктированные по молекулам CD1a и CD1c, могут напрямую контактировать с этими антигенпрезентирующими молекулами, не вступая в контакт с липидом, расположенным «внутри» этих молекул [11, 277]. Установлено, что V δ 1, V δ 2 и V δ 3 T-клетки связываются с тетрамерами MR1, так же не касаясь метаболита в составе этого рецептора [198].

Молекулы CD1a [258], CD1c [206], CD1d [134] являются лигандами $\gamma\delta$ TCR V δ 1 T-клеток. $\gamma\delta$ T-клетки амплифицируются в ответ на распознавание $\gamma\delta$ TCR-лигандов, поэтому $\gamma\delta$ T-клетки не только обладают характеристиками клеток врожденного иммунитета, но и участвуют в реакциях адаптивного иммунитета [266, 270]. В отличие от

ТАБЛИЦА 3. РЕЦЕПТОРЫ γδT-КЛЕТОК, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ИХ АКТИВНОСТЬ

TABLE 3. RECEPTORS OF γδT CELLS REGULATING THEIR ACTIVITY

| Рецептор Receptor | CD | Популяция γδT γδT population | Лиганд Ligand | Итог взаимодействия рецептора с лигандом Result of the interaction of the receptor with the ligand |
|----------------------|--------|--|---|---|
| LIRB1/ILT2 | CD85J | Vγ9Vδ2 [139] | HLA-G [139], HLA-I, UL-18 (CMV) [156] | Ингибирование [139] Inhibition [139] |
| KIR2DL1 | CD158a | γδT cell | HLA-C2 [280] | Ингибирование цитотоксичности Inhibition of cytotoxicity |
| KIR2DL2/3 | CD158b | γδ cell [167, 280], Vδ1 [41] | HLA-C1, HLA-C2 [167, 280] | Ингибирование цитотоксичности Inhibition of cytotoxicity |
| KIR2DL4 (mRNA) | CD158D | Vδ1, Vδ2, Vδ3 [41] | HLA-G | Ингибирование Inhibition |
| KIR2DS1 | CD158h | Vδ1, Vδ2 [184] | sHLA-I [184], HLA-C2 (C*02, C*04, C*05, C*06) [167] | Активация [156], при связывании с sHLA-Cw4 или sHLA-I – апоптоз [184] Activation [156], when binding to sHLA-Cw4 or sHLA-I – apoptosis [184] |
| KIR2DS2 | CD158j | Vδ1, Vδ2 [184] | sHLA-I [184], HLA-A*1101, HLA-C C1 [167] | Активация [156], при связывании с sHLA-Cw3 или sHLA-I – апоптоз [184] Activation [156], when binding to sHLA-Cw3 or sHLA-I – apoptosis [184] |
| KIR3DL2 (mRNA) | CD158K | Vδ1, Vδ2, Vδ3 [41] | Молекулы МНС класса I MHC class I | Ингибирование Inhibition |
| KLRD1 | CD94 | Vδ1 [60, 109] | HLA-E | Корецептор для NKG2A и NKG2C, в зависимости от этого проводит в клетку ингибирующий или активирующий сигнал The coreceptor for NKG2A and NKG2C, depending on the receptor, conducts an inhibitory or activating signal into the cell |
| NKG2A | CD159a | Vδ1 (mRNA) [41], Vδ2 [199] | HLA-E | Ингибирование Inhibition |
| NKG2C | CD159c | Vδ1, Vδ2 [60, 109], Vδ3 [41] | HLA-E | Активация Activation |
| NKG2D | CD314 | Vδ1 [60, 109], Vγ9Vδ2 [222], Vδ2 [292], Vδ3 (mRNA) [41] | MICA/B [272] ULBP4 [108] | Активация, цитотоксичность Activation, cytotoxicity |
| NKG2F (mRNA) | | Vδ1 [109] | Нет данных No data | Нет данных No data |
| NKp30 | | Vδ1 [109], Vδ2 [292], Vδ1, Vδ3 (mRNA) [41] | B7-H6 [156] | Активация Activation |
| NKp44 | | Vδ1 [109, 292] | B7-H6 [156] | Активация Activation |
| NKp46 | CD335 | Vδ1 [109], Vδ2 [292], Vδ3 (mRNA) [41] | B7-H6 [156] | Активация Activation |
| KLRC3 (mRNA) | | Vδ1 [109] | Нет данных No data | Ген семейства NKG2, влияет на экспрессию NKG2E [295] Gene of the NKG2 family affects the expression of NKG2E [295] |

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

| Рецептор Receptor | CD | Популяция $\gamma\delta$ T $\gamma\delta$ T population | Лиганд Ligand | Итог взаимодействия рецептора с лигандом Result of the interaction of the receptor with the ligand |
|---|-------|---|--|---|
| DNAM1 | CD226 | V δ 2 [199] | Nectin-2 (CD112), PVR (CD155) | Активация Activation |
| KLRG1/MAFA | | V δ 2 [199] | E-cadherin, N-cadherin | Ингибирование [295] Inhibition [295] |
| FcγRIII | CD16 | V δ 1, V δ 2, V δ 3 [60] | IgG | Антителозависимая клеточная цитотоксичность Antibody-dependent cellular cytotoxicity |
| BTLA | CD272 | V δ 2 [199] | CD270 (TNFRSF14, HVEM) [69] | Ингибирование Inhibition |
| PD1 | CD279 | V δ 2 [199], V δ 1, V δ 2 [292], V δ 3 [41] | PD-L1 (CD274), PD-L2 (CD273) [229] | Ингибирование Inhibition |
| TIGIT | | V δ 2 [199], V δ 1, V δ 2 [60] V δ 3 (mRNA) [41] | Nectin-2 (CD112), PVR (CD155) [209], Nectin-2 (CD113) [229] | Ингибирование Inhibition |
| VISTA | | V δ 2 [199] | PSGL-1 [271] | Ингибирование Inhibition |
| LAG3 | CD223 | V δ 2 [199], V δ 1 и V δ 3 (mRNA) [41] | LSEctin [209] | Ингибирование Inhibition |
| TIM3 | | V δ 2 [199], V δ 1, V δ 2 [60], V δ 1, V δ 3 (mRNA) [41] | Ceacam-1 [209] | Ингибирование Inhibition |
| CTLA-4 | CD152 | V δ 1, V δ 2 [127], V δ 1, V δ 3 (mRNA) [41] | CD80/CD86 | Ингибирование Inhibition |
| | CD28 | V δ 1, V δ 2 [127] | CD80/CD86 | Активация Activation |
| 2B4 | CD244 | V δ 1, V δ 2 [60] | CD48 | Активация/ингибирование Activation/inhibition |
| NK1 (NK28) | CD160 | V δ 1, V δ 2 [60] | CD270 (TNFRSF14, HVEM) | Ингибирование Inhibition |
| KLRB1 | CD161 | V δ 3 [134], V δ 1 [109] | LLT1 [101] | Ингибирование Inhibition |
| TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 | | V δ 1 [263], V δ 2 [44] | Молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью (DAMP), или молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами (PAMP) Danger-associated molecular patterns (DAMPs) or pathogen- associated molecular patterns (PAMPs) | Активация/ингибция Activation/inhibition |
| IL-2Rα | CD25 | | IL-2 | Пролиферация Proliferation |
| IL-2Rβ (mRNA) | CD122 | V δ 1 [109] | IL-2 | Пролиферация Proliferation |

αβTCR, который распознает чужеродный пептид в составе молекулы локуса МНС, рецептор γδTCR Vδ1 Т-клеток взаимодействует с рецептором CD1a, не касаясь антигена в составе этой молекулы [11]. В результате такого связывания инициируется пролиферация γδТ-клеток, продукция ими цитокинов IL-2, IFNγ, IL-17, клетка приобретает эффекторные свойства и способна лизировать клетку-мишень за счет перфорин- и Fas-опосредованной цитотоксичности [224].

Молекулы, родственные белкам семейства B7 – бутирофилины (VTN3A1 (CD277), VTN2A1, VTNL3). Этим молекулы экспрессируются клетками в различных тканях [206] и отвечают за стимуляцию γδТ-клеток фосфоантигенами – органическими молекулами, содержащими пирофосфат [72]. Фосфоантигены появляются в раковых клетках или в клетках, зараженных бактериями [210]. Внутриклеточные фосфоантигены связываются с цитозольным доменом B30.2 VTN3A1 [210]. После этого VTN3A1 взаимодействует с VTN2A1, который своим экстраклеточным доменом взаимодействует с Vγ9. Такой механизм распознавания внутриклеточного пирофосфата называется «изнутри наружу» и доказан для Vγ9Vδ2TCR [200]. Передача сигнала в этом случае зависит от параллельного взаимодействия γδTCR с рецептором CDR3 на поверхности клетки-мишени [100]. Установлено, что VTNL3 аналогично взаимодействует с Vγ4TCR [146, 268].

Таким образом, общей закономерностью для γδТ-клеток является отсутствие необходимости непосредственного контакта γδTCR с фрагментом антигена в составе антигенпредставляющих рецепторов, что в корне отличается от механизма распознавания в случае с αβTCR.

Аннексин А2 – индуцируемый стрессом фосфолипидсвязывающий белок, участвующий в онкогенезе, регуляции окислительно-восстановительного потенциала и заживлении ран. Экспрессия Аннексина А2 на мембране клеток является сигналом опасности для γδТ-клеток, которые защищают хозяина от рака и инфекций. В результате распознавания Аннексина А2 при помощи γδTCR γδТ-клетка активируется и пролиферирует [98, 138].

Установлено, что Vγ4Vδ5 и Vγ9Vδ1 Т-клеток распознают на некоторых раковых клетках, а также зараженных цитомегаловирусом эндотелиальных клетках, рецептор эфрина А2 (EphA2: ephrin receptor A2) и рецептор эндотелиального белка С (EPCR: endothelial protein C receptor) соответственно [220]. Результатом такого распознавания является активация γδТ-клетки.

Ядерный белок hMSH2 (human MutS homologue 2) является критическим элементом системы репарации несоответствий ДНК и может экспрессироваться на поверхности эпителиальных опухолевых клеток. Этот белок распознается γδTCR и NKG2D, что приводит к клеточной цитотоксичности в отношении опухолевых клеток [38]. Рецептор γδTCR напрямую также способен распознавать антигены различных бактерий (табл. 1). Более того, итогом такого распознавания может стать прямая цитотоксичность γδТ-клеток в отношении зараженных бактериями клеток [279].

2.2. Рецепторы, контролирующие цитотоксичность γδТ-клеток в отношении мишени

γδТ-клетки обладают выраженной цитотоксичностью в отношении инфицированных и трансформированных клеток независимым от МНС образом. Они могут напрямую распознавать опухолевые клетки через свои γδTCR или рецепторы группы NKR. γδТ-клетки способны секретировать IFNγ и TNFα, выполнять функции презентации антигена для активации αβТ-лимфоцитов (субпопуляция γδТ_{APC}), могут эффективно воздействовать на клетки-мишени благодаря АЗКЦ [219], реализуемой за счет экспрессии CD16 [60].

Рецепторы MICA и MICB (MHC class I chain-related proteins A and B) и ULBP (UL16-binding proteins) – поверхностные гликопротеины, относятся к белкам семейства МНС I класса. Эти рецепторы не связаны с β2-микроглобулином, не презентуют антиген, не проводят сигнал в клетку, начинают экспрессироваться клетками при стрессе, а также экспрессируются раковыми клетками [37, 232]. Взаимодействие рецепторов NKG2D естественных киллеров, цитотоксических Т-лимфоцитов [66, 188, 301] или γδТ-клеток [136] с клетками-мишенями, экспрессирующими MICA, MICB или ULBP, приводит к прямой цитотоксичности лимфоцитов в отношении мишени. Помимо NKG2D Т-клетки Vδ1 способны распознавать MICA/B также при помощи γδTCR [75]. Установлено, что γδTCR и NKG2D не конкурируют за связывание MICA/B, распознавая разные сайты связывания этих молекул. Результатом взаимодействия NKG2D с его лигандами будет являться цитотоксичность γδТ-клетки в отношении мишени за счет гранул с перфорином, гранзимом [217, 280], Fas/FasL-опосредованного механизма, продукции цитокинов [224] либо за счет механизмов взаимодействия рецепторов смерти TRAIL/TRAILR [253, 255]. Некоторые клетки, например трофобласт, способны избежать

цитотоксичности $\gamma\delta$ T-клеток путем интернализации их рецептора NKG2D [242].

При бактериальных инфекциях количество $\gamma\delta$ T-клеток в периферической крови может увеличиваться до 50% от общего количества циркулирующих T-клеток [263]. Помимо эндогенных антигенов $\gamma\delta$ T-клетки распознают экзогенные антигены на поверхности инфицированных бактериями или вирусами клеток, в составе простейших или бактерий [79]. Результатом такого распознавания будет уничтожение бактерии или инфицированных клеток за счет высвобождения гранул, содержащих перфорин, гранзим, гранулизин и дефензины [53, 57], сопровождающееся продукцией цитокинов [77] и иницией воспаления. Для распознавания экзогенных антигенов $\gamma\delta$ T-клетки используют как $\gamma\delta$ TCR, так и TLR, NOTCH, NKG2D [13, 263]. В зависимости от патогена $\gamma\delta$ T-клетки могут приобретать свойства одного из описанных выше и характерных для них подклассов и продуцировать $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ в ответ на внутриклеточные патогены либо продуцировать IL-4, IL-5, IL-13 во время иммунных реакций на паразитов, либо продуцировать IL-17 для защиты от внеклеточных бактерий и грибов [78].

Взаимодействие лигандов с $\gamma\delta$ TCR в комбинации с взаимодействием соответствующих лигандов с TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 или TLR6 приводит к активации $\gamma\delta$ T-клеток, продукции цитокинов, хемокинов, инициации ими адаптивного иммунного ответа при бактериальной или вирусной инфекции. Установлено, что лиганды TLR3 и TLR7 способны косвенным образом стимулировать лизис раковых клеток $\gamma\delta$ T-клетками. Более того, лиганды TLR8 устраняют подавляющую активность проникающих в опухоль V δ 1 T-клеток в отношении $\alpha\beta$ T-клеток и дендритных клеток [263].

Как V δ 1, так и V δ 2 T-клетки проникают в опухоли и участвуют в иммунологическом надзоре за трансформированными клетками и обладают цитотоксичностью в их отношении. Помимо описанных уже NKR в элиминации опухолей также принимают участие Notch-рецепторы, играющие роль в модуляции антигенспецифической пролиферации $\gamma\delta$ T-клеток, их способности лизировать опухолевые мишени и секретировать $IFN\gamma$ при стимуляции [73]. В свою очередь опухолевые клетки обладают различными способами реализации механизмов резистентности, в том числе подавляющими активность $\gamma\delta$ T-клеток за счет лигандов для контрольных точек BTLA, PD1, TIGIT, VISTA, LAG3, TIM3, CTLA-4, 2B4, NK1 (NK28), KLRB1, которые экспрессируют-

ся различными субпопуляциями $\gamma\delta$ T-клеток (табл. 3) [60, 130, 170, 223]. Связывание TRAIL $\gamma\delta$ T-клеток с его рецепторами на поверхности клетки-мишени, в том числе опухолевой клетки, такими как TRAIL-R1 (DR4) и TRAIL-R2 (DR5), индуцирует апоптоз мишени благодаря активации каскада каспаз [253, 255]. Шеддинг DR4 и DR5, а также экспрессия рецепторов-обманок TRAIL-R3 (DcR1) и TRAIL-R4 (DcR5) позволяет опухолевым клеткам избегать цитотоксичности со стороны $\gamma\delta$ T-клеток [45, 115, 150, 162, 172]. В отношении опухолевых клеток $\gamma\delta$ T-клетки способны реализовывать АЗКЦ. Это связано с экспрессией V δ 1, V δ 2, V δ 3 T-клетками Fc γ RIII (CD16) [90, 119]. Установлено, что в отношении инфицированных вирусом клеток АЗКЦ реализуется преимущественно V δ 2 T-клетками [123, 244], а в отношении раковых клеток – преимущественно V δ 1 T-клетками [119].

2.3. Рецепторы, контролирующая активность $\gamma\delta$ T-клеток

NKR – рецепторы, экспрессируемые естественными киллерами, которые по их функции разделяют на активирующие и ингибирующие [247]. На $\gamma\delta$ T-клетках обнаружена экспрессия некоторых из них (табл. 3). Для V δ 1-клеток кишечника в зависимости от наличия или отсутствия воспаления описана разная экспрессия мРНК и белков [60, 109]: 1) в физиологических условиях эти клетки экспрессируют мРНК активирующих NKR: NKG2D, NKG2C, NKG2F, KLRC3; мРНК NCR (natural cytotoxicity receptors): NKp46 и NKp44, а также мРНК CD122, CD247(CD3 ζ); 2) в условиях воспаления эти клетки содержат мРНК CD71, CD52, CD161, NKG2C и белков перфорин, NKG7 (natural killer cell granule protein 7), гранзим В. Ранее показано, что у здоровых доноров $\gamma\delta$ T-клетки (точнее их субпопуляции V δ 1 и V δ 2) не экспрессируют NKp44 и NKp46 [199]. По данным других исследователей, повышенная цитотоксичность $\gamma\delta$ T-клеток в отношении опухолей коррелирует с повышенной экспрессией NKp30 и NKp46 [153, 222]. Обнаружены субпопуляции V δ 1 и V δ 2 [254, 292], экспрессирующие рецепторы NKp30, NKp44, NKp46 на поверхности мембраны при системной красной волчанке [292], ишемической болезни сердца [127].

Помимо активирующих рецепторов, $\gamma\delta$ T-клетки, как и NK-клетки, экспрессируют на своей поверхности ингибирующие рецепторы, которые, взаимодействуя со своими лигандами на поверхности клеток-мишеней, снижают их цитотоксичность. К таким парам рецепторов относят KIR2DL1 ($\gamma\delta$ T) / HLA-C2 (мишень) и KIR2DL3 ($\gamma\delta$ T) / HLA-C1 (мишень) [242]. Так же как и у

НК-клеток, у $\gamma\delta$ Т-клеток растворимый sHLA-G ингибирует пролиферацию, а также ингибирует секрецию $IFN\gamma$, индуцированную фосфоантигеном. Этот эффект связан с экспрессией $V\gamma9V\delta2$ Т-клетками ILT2, так как ILT4 и KIR2DL4 они не экспрессируют [139]. Как и в случае с естественными киллерами для $V\delta1$ или $V\delta2$ Т-клеток установлено, что связывание KIR2DS1 или KIR2DS2 с растворимым sHLA-I приводит к апоптозу. Также установлено, что апоптоз $\gamma\delta$ Т-клеток может быть инициирован и другими парами лиганд-рецепторных взаимодействий с растворимыми формами молекул локуса HLA: sHLA-Cw3 – KIR2DS2, sHLA-Cw4 – KIR2DS [184].

$V\delta2$ Т-клетки экспрессируют несколько активирующих рецепторов, включая NKG2D, DNAM1, NKp30 [199], CD28 [127]. Т-клетки $V\delta2$ экспрессируют ингибирующие рецепторы и контрольные точки иммунитета NKG2A [199], CTLA-4 [127], KLRG1, BTLA, PD1, TIGIT, VISTA и на низком уровне экспрессируют LAG3 и TIM3 [199], CD160, 2B4 [60] (табл. 2). Контрольные точки играют важное значение в регуляции активности $\gamma\delta$ Т-клеток. Например неблагоприятный прогноз и снижение пятилетней выживаемости пациентов с меланомой коррелирует с увеличением количества LAG3⁺ $V\delta2$ Т-клеток [70].

$V\delta2$ Т-клетки в условиях *in vitro* после добавления антигена повышают экспрессию PD-1. Повышенная экспрессия этого рецептора $V\delta2$ Т-клетками обнаружена при различных раковых заболеваниях [26, 55, 84, 89]. Блокада PD1 способна усиливать цитотоксичность и продукцию $IFN\gamma$, хотя некоторые исследователи не подтвердили влияния блокады на функцию $\gamma\delta$ Т-клеток [88, 89, 237]. Соэкспрессия различных контрольных точек на одной и той же $\gamma\delta$ Т-клетке снижает секрецию ими $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ [273] и может влиять на успех терапии при помощи блокады контрольных точек [126, 273]. Вышеуказанные данные свидетельствуют в пользу многообразия пересечения путей внутриклеточных сигналов от различных активирующих и ингибирующих рецепторов, способных по-разному изменить поведение $\gamma\delta$ Т-клеток.

Таким образом, NKR и другие рецепторы, контролируемые активность $\gamma\delta$ Т-клеток, могут экспрессироваться в различных комбинациях в зависимости от типа субпопуляции и ее локализации, а также в зависимости от наличия или отсутствия патологического процесса. Это многократно увеличивает количество способов регуляции локального воспаления и системного иммунного ответа этими клетками.

3. Продукция цитокинов $\gamma\delta$ Т-клетками

Установлено, что, подобно $\alpha\beta$ Т-лимфоцитам, $\gamma\delta$ Т-клетки могут дифференцироваться в различные эффекторные клетки и продуцировать широкий спектр хемокинов и цитокинов, включая $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-17, IL-21 и IL-22 [230]. Продукция цитокинов $\gamma\delta$ Т-клетками обычно определяет их принадлежность к эффекторным (IL-8, IL-17, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$) или регуляторным (IL-4, IL-10, TGF- β) популяциям [178], о чем указано выше. В дополнение к этому следует отметить, что при активации эффекторные $\gamma\delta$ Т-клетки продуцируют провоспалительные цитокины в дополнение к своим цитотоксическим функциям [175]. Например, $\gamma\delta$ T17 способны секретировать IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-23, $TNF\alpha$, GM-CSF [178]. $\gamma\delta$ Т-клетки периферической крови играют защитную роль во время беременности, секретировав блокирующий фактор, индуцируемый прогестероном (PIBF) и IL-10 [185].

В свою очередь цитокины, продуцируемые клетками микроокружения могут влиять на фенотип, функции и дифференцировку $\gamma\delta$ Т-клеток. Установлено, что IL-2 и IL-15 являются индукторами цитотоксичности $\gamma\delta$ Т-клеток, а IL-2 и IL-7, необходимы для выживания и пролиферации Т-клеток. IL-2 и IL-15 активируют дифференцировку $\gamma\delta$ Т-клеток [197].

Установлена повышенная секреция $IFN\gamma$ $\gamma\delta$ Т-клетками в присутствии IL-18 и IL-12 [243]. Активация цитотоксичности и секреции $IFN\gamma$ $\gamma\delta$ Т-клетками происходит в присутствии IL-12, IL-18, IL-21 и IL-36 γ [219]. В присутствии IL-1 β , IL-23 [201], TGF- β [161] $\gamma\delta$ Т-клетки начинают секретировать IL-17. Другими исследователями установлено, что эффекторные свойства и цитотоксичность $\gamma\delta$ Т-клеток подавляются в присутствии IL-10 и TGF- β [290]. Микроокружение опухолевой ткани способствует приобретению $\gamma\delta$ Т-клетками проопухолевого фенотипа – этому могут способствовать цитокины TGF- β , IL-4, IL-21. Культивирование $V\gamma9V\delta2$ и $V\delta1$ Т-клеток в присутствии TGF- β , IL-2 индуцирует экспрессию FoxP3⁺ в этих клетках, что свидетельствует в пользу приобретения ими регуляторного фенотипа [28]. На дифференцировку $V\gamma9V\delta2$ и $V\delta1$ Т-клеток в сторону регуляторного фенотипа также влияет IL-21 [27]. Полученные в присутствии IL-21 $\gamma\delta$ Т-клетки секретировав IL-8, IL-10 и аденозин, привлекая тем самым MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) и нейтрофилы.

4. Основные популяции $\gamma\delta$ Т-клеток человека и их функции

Несмотря на множество работ, описывающих свойства и функции $\gamma\delta$ Т-клеток в настоя-

щее время отсутствует ясное понимание того, какие субпопуляции $\gamma\delta$ T-клеток вносят вклад в противоинфекционную или противоопухолевую защиту. Более того, отмечено, что некоторые субпопуляции могут способствовать росту опухолей или усугублению течения инфекционных заболеваний. Указанные выше известные на сегодняшний день субпопуляции $\gamma\delta$ T-клеток даже внутри одной опухоли могут принадлежать к огромному количеству кластеров внутри субпопуляций V δ 1, V δ 2 или V δ 3 T-клеток [203], что многократно усложняет понимание их роли в патогенезе того или иного заболевания. Тем не менее каждый из кластеров или субпопуляций $\gamma\delta$ T-клеток обладает определенным спектром экспрессии поверхностных молекул, продукцией цитокинов, которые будут определять их преимущественную роль в той или иной патологии. Поэтому далее мы будем рассматривать роль тех или иных популяций $\gamma\delta$ T-клеток через призму их фенотипа и отмеченных исследователями особенностей функциональной активности.

4.1. V δ 1, V δ 2, V δ 3 T-клетки

Как уже отмечено выше, наиболее изученными у человека являются V δ 1, V δ 2 и V δ 3 T-клетки. В настоящее время исследователи сходятся во мнении, что общим и устоявшимся признаком для всех популяций этих клеток является экспрессия γ - и δ -субъединиц T-клеточного рецептора. Все остальные параметры субпопуляций этих клеток могут быть различными в зависимости от множества параметров: особенности клеточного и цитокинового микроокружения, тип ткани, участие в физиологических или патологических процессах. Данные, которые будут приведены ниже в известной степени противоречивы, что связывают с трудностями выделения субпопуляций этих клеток из тканей, разнообразием механизмов избегания иммунной защиты инфекционными агентами и опухолевыми клетками, недостаточным количеством наблюдений.

$\gamma\delta$ T-клетки играют важную роль в выявлении и удалении опухолей, избегающих механизмы противоопухолевой защиты. Так, пациенты с дефицитом β 2-микроглобулина реагировали на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета за счет проникновения в опухоль V δ 1 и V δ 3 T-клеток с высоким цитотоксическим противоопухолевым потенциалом [41]. $\gamma\delta$ T-клетки, инфильтрирующие различные опухоли толстой кишки, экспрессируют V δ 1, V δ 2 или V δ 3 TCR и отличаются от циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток. Более того, пропорции этих клеток значительно варьируют в зависимости от типа опухоли и состоят из множества кластеров внутри одной субпопу-

ляции, выделенной из одной и той же опухоли. Среди клеток субпопуляции V δ 3 обнаружен кластер, обладающий сниженными противоопухолевыми эффекторными функциями и экспрессией несколько медиаторов, способствующих развитию опухоли [203].

Другие исследователи свидетельствуют о том, что проникающие в опухоль $\gamma\delta$ T-клетки положительно связаны с выживаемостью пациентов при всех видах рака. Присутствие T-клеток V δ 1 в нераковых тканях легких является предиктором устойчивой ремиссии, что связывают с их активностью даже после резекции опухоли [129]. V δ 1 T-клетки, выделенные из опухолевых образований при колоректальном раке, характеризуются эффекторной и цитотоксической активностью, экспрессией мРНК гранулина, перфорина, CD244 и NKp46 [203], повышенной по сравнению с V δ 2 и V δ 3 T-клетками экспрессией рецепторов TIGIT, PD-1, CD38, CD39, CD103. V δ 2 T-клетки из тех же образований экспрессировали мРНК перфорина, гранзима К, гранзима В, рецепторов KLRG1, KLRC1 (NKG2A) и KLRB1 (CD161) [203], а значит также обладали цитотоксическим потенциалом.

Несмотря на указанные выше факты, исследователи отмечают, что при некоторых опухолях перевес в сторону увеличения соотношения V δ 1:V δ 2 способствует опухолевому росту [269]. Некоторые исследователи считают, что складывающийся при раке перевес в сторону V δ 1 T-клеток связан с повышенным содержанием IL-4 в опухолевом окружении. IL-4 стимулирует секрецию IL-10 V δ 1-клетками, который, в свою очередь, ингибирует активность V δ 2 T-клеток [137].

Во время цитомегаловирусной (CMV) инфекции и в меньшей степени Эпштейна–Барр (EBV) инфекции, T-клетки V δ 1 являются медиаторами противовирусного иммунного ответа [104]. Установлено, что V γ 3V δ 1 TCR может напрямую взаимодействовать с комплексом HLA-DR во время CMV-инфекции [49].

$\gamma\delta$ T-клетки участвуют в противогрибковом иммунитете. Они могут избирательно реагировать на *Candida albicans*, продуцируя высокие уровни IL-17 [59]. Субгеномная репликация вируса гепатита С (HCV) подавляется V γ 9V δ 2 T-клетками за счет секреции IFN γ . Хронический гепатит В сопровождается снижением циркулирующих V δ 2 T-клеток, продукции ими IFN γ и цитотоксичности [1].

Установлено, что вакцинация БЦЖ индуцирует быструю пролиферацию V δ 2 T-клеток [1] и продукцию перфорина [226]. Стимуляция мононуклеаров периферической крови при помощи

M. tuberculosis ранее вакцинированных БЦЖ пациентов приводит к большей пролиферации Т-клеток Vδ2 и продукции мононуклеарами IFN γ по сравнению с невакцинированными контрольными группами [227].

Роль Т-клеток Vδ3 остается неясной из-за плохого понимания их происхождения и функциональной роли. Они могут экспрессировать CD4 или CD8, хотя большинство из них дважды отрицательные DN (CD4⁻CD8⁻) $\gamma\delta$ Т-клетки, которые заселяют эпителий кишечника и *lamina propria* (от 3% до 7%) в норме и при патологии (например, целиакия), печень. Vδ3 Т-клетки также обнаруживают в периферической крови, их количество составляет всего 0,2% от всех Т-лимфоцитов [134]. На основе экспрессии CD56, CD161, CD28, HLA-DR, NKG2D и способности распознавать CD1d-клетки Vδ3-субпопуляции, как правило, относят к клеткам неспецифической врожденной защиты [134]. Т-клетки Vδ3 экспрессируют CD16 и способны к реализации АЗКЦ [134]. Показано, что Vδ3 Т-клетки контролируют созревание дендритных клеток. Vδ3 Т-клетки в определенных условиях приобретают свойства Т-хелперов (Th) 1, Th2 и Th17; реализуют цитотоксичность в отношении CD1d⁺ клеток [134]. Количество Vδ3 Т-клеток в периферической крови увеличивается у пациентов с системной красной волчанкой [202] и при CMV-инфекции [43], ВИЧ-инфекции [233], HCV-инфекции и других вирусных инфекциях [189]. В печени Vδ3 Т-клетки цитотоксичны в отношении как инфицированных, так и неинфицированных вирусом клеток, являясь одним из мощных механизмов разрушения ткани [189].

4.2. $\gamma\delta$ Т1-клетки

Клетки $\gamma\delta$ Т1, продуцирующие IFN γ и TNF α , обнаруживают как в периферической крови, так и в различных тканях, включая опухоли [132, 149]. Продукция этими клетками IFN γ может способствовать ингибированию опухолевого роста, поэтому $\gamma\delta$ Т1 в литературе часто называют противоопухолевыми клетками, улучшающими прогноз течения заболевания. В основе противоопухолевой активности $\gamma\delta$ Т1 лежит способность к прямой или опосредованной описанными выше механизмами, или антителозависимой цитотоксичности. Противоопухолевую активность $\gamma\delta$ Т1 связывают с секрецией ими IFN γ и TNF α , которые ингибируют ангиогенез, способствуют активации Th1-клеток и дендритных клеток [149]. Секретия TNF α и IFN γ V γ 9V δ 2-клетками обеспечивает контроль созревания дендритных клеток. Такие дендритные клетки продуцируют цитокины IL-12, IL-1 β , TNF α и IFN γ [64].

Дифференцировка в тимусе $\gamma\delta$ Т-клеток в $\gamma\delta$ Т1- и $\gamma\delta$ Т17-клетки, связана с распознаванием антигена Т-клеточным рецептором. Клетки, распознающие антиген своим $\gamma\delta$ TCR, дифференцируются в $\gamma\delta$ Т1, а не распознающие – в $\gamma\delta$ Т17 [91]. В противоречие с этими данными получены свидетельства о том, что распознавание антигена $\gamma\delta$ TCR необходимо для дифференцировки как $\gamma\delta$ Т1, так и $\gamma\delta$ Т17 [158], а сильные сигналы через $\gamma\delta$ TCR подавляют дифференцировку в $\gamma\delta$ Т17 [228]. По данным других исследователей, CD27⁺ $\gamma\delta$ Т-клетки в тимусе дифференцируются в $\gamma\delta$ Т1, тогда как клетки CD27⁻ $\gamma\delta$ Т-клетки – в $\gamma\delta$ Т17 [194].

Вместе с тем, установлена возможность дифференцировки $\gamma\delta$ Т1 в $\gamma\delta$ Т17-клетки в ткани опухоли по мере ее прогрессирования благодаря цитокинам и клеткам микроокружения [148, 192]. Такое перепрограммирование клетками опухолей $\gamma\delta$ Т1 в $\gamma\delta$ Т17-клетки может быть одним из механизмов избегания опухолями иммунного надзора [274], что ставит под вопрос терапию опухолей при помощи V δ 1 Т-клеток. На мышинной модели показано, что в основе перепрограммирования опухолевым микроокружением $\gamma\delta$ Т1 в $\gamma\delta$ Т17-клетки может лежать изменение пути активации mTor. Установлено, что mTORC1 участвует в дифференцировке $\gamma\delta$ Т1 и $\gamma\delta$ Т17, тогда как mTORC2 был необходим для дифференцировки $\gamma\delta$ Т17, но не $\gamma\delta$ Т1. Истощение mTORC1 приводит к повышенной экспрессии SOCS1, который, в свою очередь, подавляет экспрессию фактора транскрипции Eomes, что снижает продукцию клетками IFN γ . Напротив, mTORC2 стимулирует дифференцировку $\gamma\delta$ Т17 за счет подавления продукции митохондриальных ROS (mitoROS) [285].

Полагают, что такая пластичность и способность приобретать свойства разных субпопуляций $\gamma\delta$ Т-клеток связана с возможностью их поляризации вне тимуса в зависимости от условий в микроокружении [113, 132]. Так, в присутствии разных цитокинов или их сочетаний V γ 9V δ 2-клетки поляризуются в $\gamma\delta$ Т17-клетки либо в продуцирующие как IFN γ , так и IL-17 $\gamma\delta$ Т1/ $\gamma\delta$ Т17-клетки, либо продуцирующие как IFN γ , так и TNF α в $\gamma\delta$ Т1-клетки, либо в продуцирующие только IL-4 $\gamma\delta$ Т2-клетки, причем для инициации и поддержания их поляризации требуются различные цитокины [18]. Для образования $\gamma\delta$ Т17 у новорожденных необходимы IL-6, IL-1 β и TGF- β , для образования $\gamma\delta$ Т1/ $\gamma\delta$ Т17 дополнительно необходим IL-23. Цитокины IL-23, IL-1 β и TGF- β необходимы для образования клеток памяти $\gamma\delta$ Т1/ $\gamma\delta$ Т17 и клеток $\gamma\delta$ Т17 [18]. В экспериментах *in vitro* стимуляция V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ Т-клеток

различными индукторами приводила к образованию разных фенотипов этих клеток: культивирование в присутствии изопентенилпирофосфата (IPP), IL-12 и анти-IL-4 антител приводило к формированию $\gamma\delta T1$ субпопуляции, а в присутствии IPP, IL-4 и анти-IL-12 антител приводило к формированию $\gamma\delta T2$ субпопуляции [260]. В условиях *in vitro* из популяции $V\gamma 9V\delta 2$ $\gamma\delta T$ -клеток периферической крови в присутствии TGF- β и IL-15 можно получить FoxP3⁺ $\gamma\delta Treg$ -клетки [25], а в присутствии IPP и IL-21 можно получить $\gamma\delta Tfh$ -клетки, которые, благодаря продукции IL-4, IL-10 и CXCL13, способствуют созреванию В-клеток для выработки антител против чужеродных антигенов [6]. Установлено, что в условиях опухолевого роста IL-4 индуцирует превращение противоопухолевых V $\delta 2$, секретирующих IFN γ в V $\delta 1$, продуцирующих IL-10 [137]. Такая же функциональная гетерогенность и пластичность $\gamma\delta T$ -клеток наблюдается при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях.

Такой широкий диапазон внетимической поляризации свидетельствует об отсутствии границ между субпопуляциями $\gamma\delta T$ -клеток и что цитокины микроокружения, определяя поляризацию $\gamma\delta T$ -клеток, в конечном итоге определяют роль $\gamma\delta T$ -клеток в физиологическом или патологическом процессе.

4.3. $\gamma\delta T17$ -клетки

Клетки $\gamma\delta T17$ относят к врожденному звену иммунитета, они продуцируют IL-17, обладают провоспалительными свойствами, обеспечивают защиту от внеклеточных бактериальных и грибковых инфекций [177, 191], участвуют в патогенезе множества аутоиммунных заболеваний и встречаются в периферической крови и в тканях у человека только при патологиях [283].

Человеческие $\gamma\delta T$ -клетки способны продуцировать IL-17 при определенных инфекциях [283], а также после поликлональной активации или после их культивирования с цитокинами IL-23 и IL-6 или IL-7 [18, 152, 155]. Некоторые исследователи полагают, что у человека не существует специфической субпопуляции $\gamma\delta T$ -клеток, секретирующей исключительно IL-17. Эту функцию в определенных условиях выполняют как $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клетки крови, так и V $\delta 1$ Т-клетки в тканях. При этом обе субпопуляции продуцируют IFN γ и обладают цитотоксичностью [18]. Большинство продуцирующих IL-17 $\gamma\delta T$ -клеток экспрессируют CD161. Продуцирующие IL-17 клетки с фенотипом CD28⁺CD27⁺CCR6⁺ и экспрессией генов *RORC* и *IL23R* обнаружены в популяции $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток периферической крови [208]. Отмечают также, что в печени здорового

человека содержится V $\delta 3$ популяция Т-клеток, продуцирующая IL-17 [134], а также ROR γ t⁺ $\gamma\delta T$ -клетки, которые в основном принадлежат к популяции $V\gamma 9V\delta 2$ [122].

При инфекциях $\gamma\delta T17$ -клетки секретируют IL-17, IFN γ и другие провоспалительные цитокины, активируют макрофаги и нейтрофилы [77, 215]. Полагают, что в очагах воспаления нейтрофилы не только проявляют свою бактерицидную активность, но и регулируют функции $\gamma\delta T$ -клеток [240].

Нарушенная активация клеток $\gamma\delta T17$ может привести к повреждению тканей [281], хроническому воспалению [287], аутоиммунным заболеваниям, например псориазу [22]. $\gamma\delta T17$ -клетки стимулируют рост опухолей и их метастазирование [36], что описано при раке печени, молочных желез, легких, колоректальном раке и раке желчного пузыря [36, 93, 176].

Одним из механизмов избегания опухолями иммунного надзора является экспрессия ими *VTNL2* [56], который стимулирует продукцию IL-17 $\gamma\delta T$ -клетками [218]. Это приводит к привлечению в микроокружение опухоли миелоидных клеток-супрессоров (MDSC) [298], которые, в свою очередь, снижают насыщение CD8⁺Т-клетками опухолевой ткани. Было показано, что $\gamma\delta T$ -клетки, секретирующие IL-17, стимулируют рост опухоли у мышей за счет рекрутирования MDSC моноцитарного и гранулоцитарного происхождения и индуцируют накопление и поляризацию нейтрофилов, приводящие к развитию предметастатического иммуносупрессивного микроокружения [168]. Исследования показывают, что клетки $\gamma\delta T17$ могут вносить значительный вклад в прогрессирование колоректального рака человека, вовлекая большее количество MDSC в микроокружение опухоли [56]. Установлено, что $\gamma\delta T$ -клетки активируют звездчатые клетки поджелудочной железы, приводя к секреции ими IL-6. Это, в свою очередь, способствует развитию и прогрессированию протоковой аденокарциномы поджелудочной железы [213]. Рак молочной железы, инфильтрированный CD73⁺ регуляторной субпопуляцией V $\delta 1$ $\gamma\delta T$ -клеток, проявляет свои иммуносупрессивные функции, продуцируя IL-10 [27]. IL-17 может способствовать росту опухоли, поддерживая ангиогенез при раке желчного пузыря, раке желудка, немелкоклеточном раке легких, а также при других видах рака [176, 275]. Клетки $\gamma\delta T17$ стимулируют ангиогенез и рост опухоли, индуцируя продукцию VEGF и Ang-2 клетками микроокружения [211]. Следует отметить, что $\gamma\delta T17$ устойчивы к терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета PD-1 и

ТМ-3 [58], что в очередной раз свидетельствует в пользу неопределенных перспектив использования $\gamma\delta$ Т-клеток для терапии опухолей. Повышенное количество $\gamma\delta$ Т17 Т-клеток в опухоли коррелирует с плохим прогнозом, включая метастазирование [58].

Нарушение продукции ИЛ-17 связывают с патогенезом грибковых инфекций у человека [58]. Полагают, что нарушение продукции ИЛ-17, в том числе $\gamma\delta$ Т17, лежит в основе патогенеза кандидозных инфекций. Установлено, что $\gamma\delta$ Т-клетки крови человека, особенно V δ 1 от здоровых доноров, отвечают на культивирование с *S. albicans* пролиферацией, продукцией ИЛ-17 и IFN γ и повышением экспрессии *RORC* и *TBX21* [58].

Преимущественная локализация $\gamma\delta$ Т17 в тканях накладывает определенные ограничения на исследования свойств этих клеток. Поэтому участие $\gamma\delta$ Т17 в аутоиммунных заболеваниях человека обсуждается как экстраполяция результатов, полученных на мышинных моделях с одновременным сравнением локализации этих клеток в тканях в случае доступности человеческого материала. Установлено, что кожа пациентов с псориазом обогащена популяцией V γ 9V δ 2, которая при стимуляции мигрирует из кровотока и начинает продуцировать ИЛ-17 [114]. Также полагают активное участие $\gamma\delta$ Т17 в ювенильном идиопатическом артрите, спондилоартрите [68]. Установлено также, что $\gamma\delta$ Т-клетки показали доминирующий профиль экспрессии IFN γ и ИЛ-17 у пациентов с привычным невынашиванием [231].

4.4. $\gamma\delta$ НКТ-клетки

$\gamma\delta$ НКТ-клетки изучены к настоящему времени недостаточно и в основном на мышинных моделях [17, 91, 158, 179, 194]. Популяция $\gamma\delta$ НКТ (CD56 $^{+}$ $\gamma\delta$ Т) экспрессирует на высоком уровне CD56. Экспрессия CD56 делает их фенотип сходным с фенотипом $\alpha\beta$ НКТ-клеток. Созревание $\alpha\beta$ НКТ-клеток и $\gamma\delta$ НКТ-клеток в тимусе на стадии DP дает возможность спекулировать о наличии у этих клеток единого предшественника. Однако в настоящее время из-за малочисленности этих клеток особенности их дифференцировки крайне мало изучены. В 2024 году Shuanglinzi Deng и соавт. опубликовали работу, в которой сообщается об обнаружении $\gamma\delta$ Т-клеток с повышенной экспрессией CD56 при плоскоклеточном раке [47]. Эти клетки имели слабую экспрессию PD-1, секретировали IFN γ , ИЛ-17А и ИЛ-22, экспрессировали CCR2, CCR5 и CCR6 и отвечали за реализацию воспаления [2].

4.5. $\gamma\delta$ Treg-клетки

Среди $\alpha\beta$ Т-клеток выделяют особую популяцию, отвечающую за регуляцию реакций им-

мунного ответа и поддержание иммунной толерантности – Т-регуляторные лимфоциты (Treg). Среди $\gamma\delta$ Т-клеток также выделяют подобную популяцию $\gamma\delta$ Treg [178]. $\gamma\delta$ Treg-клетки обладают проопухолевыми свойствами – они способствуют росту и метастазированию опухоли, нарушая функцию эффекторных клеток [289].

Полагают, что у человека дифференцировка эффекторных V δ 1 и V δ 2 Т-клеток в $\gamma\delta$ Treg происходит на периферии в определенном цитокиновом микроокружении (TGF- β , ИЛ-2 и ИЛ-15) [30, 181, 286, 287]. Эта дифференцировка сопровождается экспрессией FoxP3 и гена ИЛ-9 [30, 180]. Полагают, что витамин С является необходимым компонентом превращения Т-клеток V δ 2 в FoxP3 $^{+}$ $\gamma\delta$ Treg [110]. Такие $\gamma\delta$ Treg проявляют супрессивную активность в отношении CD4 $^{+}$ $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов. $\gamma\delta$ Treg-клетки секретируют GM-CSF, ИЛ-10, TGF- β , ИЛ-17, экспрессируют CD39, CD73 и рецепторы контрольных точек [181], благодаря которым реализуют свои супрессорные и регуляторные функции. За счет продукции ИЛ-4, ИЛ-10 и TGF- β $\gamma\delta$ Treg ингибируют созревание дендритных клеток и подавляют активность эффекторных CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ $\alpha\beta$ Т-клеток и NK-клеток в отношении опухолей. При раке молочной железы выделенные из опухоли $\gamma\delta$ Treg способствуют развитию старения дендритных клеток с толерогенными функциями. Такие дендритные клетки подавляют дифференцировку Th1 и Th17, но способствуют развитию $\alpha\beta$ Treg-клеток [216, 289].

В периферической крови, а также в ткани опухоли пациентов с раком молочной железы и раком толстой кишки обнаруживают $\gamma\delta$ Treg-клетки с фенотипом CD73 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ V δ 1 $^{+}$ либо CD39 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ V δ 1 $^{+}$ [163]. За привлечение $\gamma\delta$ Treg в ткань опухоли отвечает IP-10, секретируемый клетками рака молочной железы [289]. При этом $\gamma\delta$ Treg способствуют формированию специфической для опухоли иммунной толерантности [99], подавляют реакции врожденного и адаптивного противоопухолевого иммунного ответа [288].

Поэтому повышенное содержание $\gamma\delta$ Treg-клеток в ткани солидной опухоли, а также повышенная продукция цитокинов, характерных для этих клеток, например ИЛ-10, используются как маркеры течения опухолевого роста. Чем больше этих клеток в опухоли, тем хуже прогноз пятилетней выживаемости, выше риск развития рецидива рака молочной железы [133] и лимфомы [102].

В литературе также описаны и положительные свойства $\gamma\delta$ Treg. Так, было показано, что активированные *Lactobacillus acidiphiscis* $\gamma\delta$ Treg могут подавлять аутореактивные клоны Th1- и

Th17-клеток [193]. С другой стороны, недостаточная активация $\gamma\delta$ Treg бактериями *Lactobacillus acidipiscis* в кишечнике провоцирует дифференцировку кишечных $\gamma\delta$ T-клеток в клетки $\gamma\delta$ T17. Полагают, что миграция таких $\gamma\delta$ T17 в мозговые оболочки может лежать в основе депрессивного поведения [63, 300].

4.6. $\gamma\delta$ T_{APC}-клетки

Профессиональные антигенпрезентирующие клетки (APC – antigen presenting cell) поглощают антиген при помощи фагоцитоза (макрофаги) или макропиноцитоза (дендритные клетки), расщепляют его и представляют в составе молекул локуса MHCII или MHCI наивным $\alpha\beta$ T-лимфоцитам [80]. Дендритные клетки (DC – dendritic cell) поглощают антигены в зоне инфекционного поражения или опухолевой ткани, проходят стадию созревания, включающую активацию экспрессии костимулирующих молекул перед миграцией в регионарные лимфатические узлы. Взаимодействие CD40 на поверхности DC с CD40L на поверхности CD4⁺T-лимфоцитов приводит к активации DC, которая необходима для приобретения ей антигенпрезентирующей функции. Такая активация при помощи костимуляторных рецепторов называется лицензированием APC [9, 160].

Полагают, что одна из субпопуляций $\gamma\delta$ T-клеток, а именно V γ 9V δ 2TCRHLADR⁺, относится к профессиональным антигенпрезентирующим клеткам на основании экспрессии ими молекул локуса MHC класса II, костимулирующих молекул [16] и рецепторов к хемокинам для хоминга в лимфатические узлы (CCR7) [14], способности к кластеризации в зародышевых центрах фолликулов В-клеток [15]. Эти клетки способны захватывать антигены из интактных клеток при помощи фагоцитоза или трогоцитоза [186, 276] и презентировать или кросспрезентировать переработанные антигены как CD4⁺, так и CD8⁺ $\alpha\beta$ T-лимфоцитам [14, 16, 151]. Экспрессия HLA-DR также обнаружена на V δ 1 T-клетках [109, 127] и V δ 3 T-клетках [134]. Стимуляция $\gamma\delta$ T-клеток в опухолевой ткани лигандом T-клеточного рецептора и последующее распознавание таким лимфоцитом опсонизированной антителами клетки-мишени и реализация антитело-зависимой клеточной цитотоксичности лежит в основе лицензирования $\gamma\delta$ T_{APC} [81].

Установлено, что активация V γ 9V δ 2T-клеток периферической крови в толстой и подвздошной кишке бактериями в присутствии IL-15 превращает эти клетки в $\gamma\delta$ T_{APC}-клетки [246], которые поляризуют CD4⁺T-клетки исключительно в Th22, продуцирующие IL-22, но не в Th17, за

образование которых отвечают APC миелоидного происхождения. Полагают, что $\gamma\delta$ T_{APC} и миелоидные APC передают принципиально разные сигналы CD4⁺T-клеткам и что таким образом $\gamma\delta$ T-клетки защищают слизистую кишечника от гипертрофии с привлечением нейтрофилов [87, 121]. В момент антигенпрезентации $\gamma\delta$ T-клетки через молекулы CD28 или CTLA-4, являющиеся лигандами CD80/CD86 [127], могут стимулировать или подавлять активность $\alpha\beta$ T-лимфоцита. Однако $\gamma\delta$ T_{APC} неспособны продуцировать цитокины, отвечающие за поляризацию наивных $\alpha\beta$ T-лимфоцитов. Поэтому за поляризацию в этом случае отвечает экспрессия $\gamma\delta$ T_{APC} клетками ICOSL (inducible T cell costimulator ligand) и продукция ими TNF α , которые, в свою очередь, стимулируют экспрессию CD4⁺T-лимфоцитами IL-22 и мРНК AHR [246].

Как уже отмечено выше, среди субпопуляции V γ 9V δ 2 T-клеток периферической крови человека выделяют множество кластеров с разнообразными характеристиками. Один из таких кластеров клеток коэкспрессирует рецептор CD27 и его лиганд – CD70. Активация $\gamma\delta$ TCR фосфоантигенами многократно усиливается в случае коактивации $\gamma\delta$ T-клетки по линии CD70/CD27. Такое лиганд-рецепторное взаимодействие определяет их жизнеспособность, индуцирует пролиферацию и секрецию Th1-подобных цитокинов [42]. Установлено, что в момент презентации антигена наивному CD4⁺ $\alpha\beta$ T-лимфоциту перекрестное взаимодействие $\gamma\delta$ T_{APC} по линии CD27/CD70 способствует поляризации T-лимфоцита в сторону Th1 и продукции IFN γ [246].

Появление $\gamma\delta$ T_{APC} в периферической крови связывают с активным патологическим процессом. Так, содержание циркулирующих $\gamma\delta$ T_{APC} было значительно выше у пациентов с активной стадией ревматоидного артрита. При этой патологии $\gamma\delta$ T_{APC} присутствуют также и в синовиальной жидкости [116]. V γ 9V δ 2 T-клетки способны приобретать характеристики антигенпрезентирующей клетки в условиях *in vitro* и презентировать антиген CD4⁺ и CD8⁺T-лимфоцитам [16, 245], что лежит в основе разработки методов их применения в терапии опухолей.

4.7. $\gamma\delta$ Tfh-клетки

Подавляющее количество данных в литературе по поводу субпопуляции $\gamma\delta$ Tfh-клеток описано на мышинной модели и свидетельствует в пользу их способности влиять на продукцию антител иммунизированными или инфицированными мышами [259]. Экстраполируя данные, полученные на мышах, исследователи полагают, что $\gamma\delta$ Tfh-клетки человека могут влиять на реакции

гуморального иммунного ответа и влиять на созревание В-лимфоцитов, и влиять на продукцию антител плазматическими клетками. Установлено, что у пациентов с нейробластомой $\gamma\delta\text{Tfh}$ -клетки имеют фенотип наивных клеток с повышенной экспрессией CD25, CD69, HLA-DR и CD40L, пониженной экспрессией CD278 (ICOS); они продуцируют повышенное количество IL-4 и IL-10, чем те же клетки у здоровых доноров. У пациентов с нейробластомой такие характеристики $\gamma\delta\text{Tfh}$ -клеток сочетаются с повышенным содержанием IgG в сыворотке крови [157].

Как уже отмечено выше, активация $V\gamma9V\delta2$ Т-клеток различными цитокинами приводит к поляризации их фенотипа в фенотип, подобный Th2 [260], Th17 [18], Tfh и Treg [25]. Культивирование $V\gamma9V\delta2$ Т-клеток в присутствии антигена и IL-21 определяет их поляризацию в сторону в сторону фенотипа Tfh [25]. Полученные таким образом клетки $\gamma\delta\text{Tfh}$ -клетки экспрессируют репрессор транскрипции Bcl-6 [20], CD40L, CD278 (ICOS), CXCR5, а также обеспечивают продукцию IgM, IgG и IgA В-клеткам миндалин [6, 20]. В отличие от клеток $\alpha\beta\text{Tfh}$ клетки $\gamma\delta\text{Tfh}$ не продуцируют IL-21, но секретируют цитокины IL-2, IL-4 и IL-10, характерные для $\alpha\beta\text{Th2}$. При этом внутри клеток $\gamma\delta\text{Tfh}$ отсутствует экспрессия GATA-3 и IL-13, также характерных для $\alpha\beta\text{Th2}$ -клеток [20]. Полагают, что $\gamma\delta\text{Tfh}$ -клетки участвуют в регуляции созревания В-клеток на ранних стадиях инфекций, до полного развития реакций адаптивного иммунного ответа, либо инициируют продукцию В-лимфоцитами на антигены, на которые отвечают $\gamma\delta\text{T}$ -клетки [21].

5. Перспективы применения $\gamma\delta\text{T}$ -клеток

Существует два подхода к использованию $\gamma\delta\text{T}$ -клеток в лечении различных патологий: 1) избирательное увеличение одной из популяций $\gamma\delta\text{T}$ -клеток в условиях *in vivo*; 2) клеточная терапия. В первом случае изменения содержания одной из популяций $\gamma\delta\text{T}$ -клеток добиваются благодаря введению пациенту рекомбинантного IL-2 и фосфоантигена либо благодаря введению соответствующих антител. Во втором случае опухолевый рост подавляют благодаря введению пациенту аллогенных $\gamma\delta\text{T}$ -клеток, генно-инженерных $\gamma\delta\text{T}$ -клеток либо размноженных *in vitro* аутологических $\gamma\delta\text{T}$ -клеток [95, 120, 147]. Использование такого подхода ограничивается возможностью поляризации введенных в организм пациента в любой кластер $\gamma\delta\text{T}$ -клеток, способных как эффективно уничтожать раковые клетки, например $\gamma\delta\text{T1}$ [298], так и способствовать росту опухоли, например $\gamma\delta\text{T17}$ -клетки [297]. В связи с этим

исследователям следует учитывать описанную выше внутимическую поляризацию $\gamma\delta\text{T}$ -клеток в условиях микроокружения, которая в лучшем случае может свести к минимуму эффект от использования $\gamma\delta\text{T1}$ в терапии опухолей, а в худшем случае может способствовать накоплению $\gamma\delta\text{T17}$ -клеток в опухолях. Использование терапии $\gamma\delta\text{T}$ -клетками с химерным антигенным рецептором (CAR) казалось многообещающим подходом, который мог бы исключить, или хотя бы снизить вероятность реакции трансплантат против хозяина в случае использования CAR- $\alpha\beta\text{T}$ -терапии. Однако, по последним данным, использование CAR- $\gamma\delta\text{T}$ -терапии также имеет свои ограничения в силу низкой токсичности этих клеток в отношении некоторых опухолей, сниженной миграции в опухолевые ткани и повышенной склонности к приобретению толерантности [293]. Поэтому терапия опухолей с применением $\gamma\delta\text{T}$ -клеток пока еще остается терапией второго плана [28, 67].

Заключение

Важнейшей функцией $\gamma\delta\text{T}$ -клеток является контроль за реакциями врожденного и адаптивного иммунитета. Эти клетки влияют на огромное число как физиологических, так и патологических процессов. Благодаря собственному рецепторному аппарату, буквальному копированию субпопуляционного состава $\alpha\beta\text{T}$ -лимфоцитов и отсутствию необходимости реагировать антигенспецифически, а также благодаря способности презентировать антигены $\alpha\beta\text{T}$ -лимфоцитам, контролировать активность клеток микроокружения, включая дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты, $\gamma\delta\text{T}$ -клетки не только являются «сенсором чужого» и обладают прямой цитотоксичностью в отношении мишеней, но и контролируют течение иммунного ответа, находясь, образно выражаясь, «над схваткой». Создается впечатление, что $\gamma\delta\text{T}$ -клетки являются неким звеном на клеточном уровне, которое «разумно» управляет процессами, координирует и, в случае необходимости, корректирует их. Однако это предположение, скорее всего, ложное, и $\gamma\delta\text{T}$ -клетки, вероятно, являются одним из способов дублирования или компенсации «выпадающих» функций отдельных звеньев иммунологического надзора в сложном многообразии межклеточных взаимодействий и цитокиновых сетей. С другой стороны, зафиксировано множество случаев неадекватного соответствующей ситуации поведения $\gamma\delta\text{T}$ -клеток в некоторых патологических процессах. Например, при онкогенезе $\gamma\delta\text{T}$ -клетки стимулируют рост опухолевых клеток, подавляя одновременно противоопухолевую активность

клеток иммунной системы. Такому неадекватному поведению $\gamma\delta$ T-клеток способствуют сами опухолевые клетки, стимулирующие дифференцировку $\gamma\delta$ T-клеток в субпопуляцию $\gamma\delta$ T17 или $\gamma\delta$ Treg. В подобных случаях пластичность $\gamma\delta$ T-клеток и их способность к внетимической трансдифференцировке из одной субпопуляции в другую может лежать в основе множества патологических процессов, так как эти клетки ак-

тивно влияют на клетки микроокружения. Эти свойства $\gamma\delta$ T-клеток необходимо учитывать при разработке различных подходов к диагностике и терапии различных заболеваний, в том числе терапии с использованием самих $\gamma\delta$ T-клеток.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Список литературы / References

1. Agrati C., Alonzi T., De Santis R., Castilletti C., Abbate I., Capobianchi M.R., D'Offizi G., Siepi F., Fimia G.M., Tripodi M., Poccia F. Activation of Vgamma9Vdelta2 T cells by non-peptidic antigens induces the inhibition of subgenomic HCV replication. *Int. Immunol.*, 2006, Vol. 18, no. 1, pp. 11-18.
2. Alexander A.A., Maniar A., Cummings J.S., Hebbeler A.M., Schulze D.H., Gastman B.R., Pauza C.D., Strome S.E., Chapoval A.I. Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56+ gammadelta T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2008, Vol. 14, no. 13, pp. 4232-4240.
3. Anvari S., Watkin L., Rajapakshe K., Hassan O., Schuster K., Coarfa C., Davis C.M. Memory and naive gamma delta regulatory T-cell gene expression in the first 24-weeks of peanut oral immunotherapy. *Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 230, 108820. doi: 10.1016/j.clim.2021.108820.
4. Autran B., Triebel F., Katlama C., Rozenbaum W., Hercend T., Debre P. T cell receptor gamma/delta+ lymphocyte subsets during HIV infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 1989, Vol. 75, no. 2, pp. 206-210.
5. Bank I. The role of gamma delta t cells in autoimmune rheumatic diseases. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 2, 462. doi: 10.3390/cells9020462.
6. Bansal R.R., Mackay C.R., Moser B., Eberl M. IL-21 enhances the potential of human gammadelta T cells to provide B-cell help. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 1, pp. 110-119.
7. Barisa M., Kramer A.M., Majani Y., Moulding D., Saraiva L., Bajaj-Elliott M., Anderson J., Gustafsson K.E. coli promotes human Vgamma9Vdelta2 T cell transition from cytokine-producing bactericidal effectors to professional phagocytic killers in a TCR-dependent manner. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 2805. doi: 10.1038/s41598-017-02886-8.
8. Barjon C., Michaud H.A., Fages A., Dejoux C., Zampieri A., They L., Gennetier A., Sanchez F., Gros L., Eliaou J.F., Bonnefoy N., Lafont V. IL-21 promotes the development of a CD73-positive Vgamma9Vdelta2 T cell regulatory population. *Oncimmunology*, 2017, Vol. 7, no. 1, e1379642. doi: 10.1080/2162402X.2017.1379642.
9. Bennett S.R., Carbone F.R., Karamalis F., Flavell R.A., Miller J.F., Heath W.R. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*, 1998, Vol. 393, no. 6684, pp. 478-480.
10. Benveniste P.M., Roy S., Nakatsugawa M., Chen E.L.Y., Nguyen L., Millar D.G., Ohashi P.S., Hirano N., Adams E.J., Zuniga-Pflucker J.C. Generation and molecular recognition of melanoma-associated antigen-specific human gammadelta T cells. *Sci. Immunol.*, 2018, Vol. 3, no. 30, eaav4036. doi: 10.1126/sciimmunol.aav4036.
11. Birkinshaw R.W., Pellicci D.G., Cheng T.Y., Keller A.N., Sandoval-Romero M., Gras S., de Jong A., Uldrich A.P., Moody D.B., Godfrey D.I., Rossjohn J. alphabeta T cell antigen receptor recognition of CD1a presenting self lipid ligands. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 3, pp. 258-266.
12. Boehme L., Roels J., Taghon T. Development of gammadelta T cells in the thymus – A human perspective. *Semin. Immunol.*, 2022, Vol. 61-64, 101662. doi: 10.1016/j.smim.2022.101662.
13. Bonneville M., O'Brien R.L., Born W.K. gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 7, pp. 467-478.
14. Brandes M., Willimann K., Bioley G., Levy N., Eberl M., Luo M., Tampe R., Levy F., Romero P., Moser B. Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 7, pp. 2307-2312.
15. Brandes M., Willimann K., Lang A.B., Nam K.H., Jin C., Brenner M.B., Morita C.T., Moser B. Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 10, pp. 3693-3701.
16. Brandes M., Willimann K., Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science*, 2005, Vol. 309, no. 5732, pp. 264-268.
17. Buus T.B., Odum N., Geisler C., Lauritsen J.P.H. Three distinct developmental pathways for adaptive and two IFN-gamma-producing gammadelta T subsets in adult thymus. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, no. 1, 1911. doi: 10.1038/s41467-017-01963-w.

18. Caccamo N., la Mendola C., Orlando V., Meraviglia S., Todaro M., Stassi G., Sireci G., Fournie J.J., Dieli F. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 1, pp. 129-138.
19. Caccamo N., Meraviglia S., Ferlazzo V., Angelini D., Borsellino G., Poccia F., Battistini L., Dieli F., Salerno A. Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human Vgamma9Vdelta2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, no. 6, pp. 1764-1772.
20. Caccamo N., Todaro M., La Manna M.P., Sireci G., Stassi G., Dieli F. IL-21 regulates the differentiation of a human gammadelta T cell subset equipped with B cell helper activity. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 7, e41940. doi: 10.1371/journal.pone.0041940.
21. Caccamo N., Todaro M., Sireci G., Meraviglia S., Stassi G., Dieli F. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of human gammadelta T cells. *Cell. Mol. Immunol.*, 2013, Vol. 10, no. 1, pp. 30-34.
22. Cai Y., Xue F., Quan C., Qu M., Liu N., Zhang Y., Fleming C., Hu X., Zhang H.G., Weichselbaum R., Fu Y.X., Tieri D., Rouchka E.C., Zheng J., Yan J. A Critical Role of the IL-1beta-IL-1R Signaling Pathway in Skin Inflammation and Psoriasis Pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, 2019, Vol. 139, no. 1, pp. 146-156.
23. Carman C.V., Springer T.A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.*, 2004, Vol. 167, no. 2, pp. 377-388.
24. Cartwright J.E., Balarajah G. Trophoblast interactions with endothelial cells are increased by interleukin-1beta and tumour necrosis factor alpha and involve vascular cell adhesion molecule-1 and alpha4beta1. *Exp. Cell Res.*, 2005, Vol. 304, no. 1, pp. 328-336.
25. Casetti R., Agrati C., Wallace M., Sacchi A., Martini F., Martino A., Rinaldi A., Malkovsky M. Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 6, pp. 3574-3577.
26. Castella B., Foglietta M., Sciancalepore P., Rigoni M., Coscia M., Griggio V., Vitale C., Ferracini R., Saraci E., Omede P., Riganti C., Palumbo A., Boccadoro M., Massaia M. Anergic bone marrow Vgamma9Vdelta2 T cells as early and long-lasting markers of PD-1-targetable microenvironment-induced immune suppression in human myeloma. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 4, no. 11, e1047580. doi: 10.1080/2162402X.2015.1047580.
27. Chabab G., Barjon C., Abdellaoui N., Salvador-Prince L., Dejou C., Michaud H.A., Boissiere-Michot F., Lopez-Crapez E., Jacot W., Pourquier D., Bonnefoy N., Lafont V. Identification of a regulatory Vdelta1 gamma delta T cell subpopulation expressing CD73 in human breast cancer. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, Vol. 107, no. 6, pp. 1057-1067.
28. Chabab G., Barjon C., Bonnefoy N., Lafont V. Pro-tumor gammadelta T cells in human cancer: polarization, mechanisms of action, and implications for therapy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 2186. doi: 10.3389/fimmu.2020.02186.
29. Chan K.F., Duarte J.D.G., Ostrouska S., Behren A. gammadelta T cells in the tumor microenvironment-interactions with other immune cells. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 894315. doi: 10.3389/fimmu.2022.894315.
30. Chen W. TGF-beta regulation of T cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2023, Vol. 41, no. 1, pp. 483-512.
31. Chien Y.H., Meyer C., Bonneville M. gammadelta T cells: first line of defense and beyond. *Annu. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 32, pp. 121-155.
32. Christopoulos P., Dopfer E.P., Malkovsky M., Esser P.R., Schaefer H.E., Marx A., Kock S., Rupp N., Lorenz M.R., Schwarz K., Harder J., Martin S.F., Werner M., Bogdan C., Schamel W.W., Fisch P. A novel thymoma-associated immunodeficiency with increased naive T cells and reduced CD247 expression. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 7, pp. 3045-3053.
33. Cibrian D., Sanchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.*, 2017, Vol. 47, no. 6, pp. 946-953.
34. Ciccone E., Viale O., Pende D., Malnati M., Battista Ferrara G., Barocci S., Moretta A., Moretta L. Specificity of human T lymphocytes expressing a gamma/delta T cell antigen receptor. Recognition of a polymorphic determinant of HLA class I molecules by a gamma/delta clone. *Eur. J. Immunol.*, 1989, Vol. 19, no. 7, pp. 1267-1271.
35. Cipriani B., Borsellino G., Poccia F., Placido R., Tramonti D., Bach S., Battistini L., Brosnan C.F. Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. *Blood*, 2000, Vol. 95, no. 1, pp. 39-47.
36. Coffelt S.B., Kersten K., Doornebal C.W., Weiden J., Vrijland K., Hau C.S., Verstegen N.J.M., Ciampricotti M., Hawinkels L., Jonkers J., de Visser K.E. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*, 2015, Vol. 522, no. 7556, pp. 345-348.
37. Cox S.T., Haver D.S., Patterson W., Cambridge C.A., Turner T.R., Danby R.D., Hernandez D. Characterisation of RAET1E/ULBP4 exon 4 and 3' untranslated region genetic architecture reveals further diversity and allelic polymorphism. *HLA*, 2024, Vol. 103, no. 4, e15457. doi: 10.1111/tan.15457.
38. Dai Y., Chen H., Mo C., Cui L., He W. Ectopically expressed human tumor biomarker MutS homologue 2 is a novel endogenous ligand that is recognized by human gammadelta T cells to induce innate anti-tumor/virus immunity. *J. Biol. Chem.*, 2012, Vol. 287, no. 20, pp. 16812-16819.
39. Daley D., Zambirinis C.P., Seifert L., Akkad N., Mohan N., Werba G., Barilla R., Torres-Hernandez A., Hundeyin M., Mani V.R.K., Avanzi A., Tippens D., Narayanan R., Jang J.E., Newman E., Pillarisetty V.G., Dustin M.L.,

Bar-Sagi D., Hajdu C., Miller G. gammadelta T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining alphabeta T Cell Activation. *Cell*, 2016, Vol. 166, no. 6, pp. 1485-1499e15.

40. Davey M.S., Willcox C.R., Joyce S.P., Ladell K., Kasatskaya S.A., McLaren J.E., Hunter S., Salim M., Mohammed F., Price D.A., Chudakov D.M., Willcox B.E. Clonal selection in the human Vdelta1 T cell repertoire indicates gammadelta TCR-dependent adaptive immune surveillance. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, 14760. doi: 10.1038/ncomms14760.

41. de Vries N.L., van de Haar J., Veninga V., Chalabi M., Ijsselsteijn M.E., van der Ploeg M., van den Bulk J., Ruano D., van den Berg J.G., Haanen J.B., Zeveerijn L.J., Geurts B.S., de Wit G.F., Battaglia T.W., Gelderblom H., Verheul H.M.W., Schumacher T.N., Wessels L.F.A., Koning F., de Miranda N., Voest E.E. gammadelta T cells are effectors of immunotherapy in cancers with HLA class I defects. *Nature*, 2023, Vol. 613, no. 7945, pp. 743-750.

42. DeBarros A., Chaves-Ferreira M., d'Orey F., Ribot J.C., Silva-Santos B. CD70-CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human gammadelta peripheral blood lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 1, pp. 195-201.

43. Dechanet J., Merville P., Lim A., Retiere C., Pitard V., Lafarge X., Michelson S., Meric C., Hallet M.M., Kourilsky P., Potaux L., Bonneville M., Moreau J.F. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol. 103, no. 10, pp. 1437-1449.

44. Deetz C.O., Hebbeler A.M., Propp N.A., Cairo C., Tikhonov I., Pauza C.D. Gamma interferon secretion by human Vgamma2Vdelta2 T cells after stimulation with antibody against the T-cell receptor plus the Toll-Like receptor 2 agonist Pam3Cys. *Infect. Immun.*, 2006, Vol. 74, no. 8, pp. 4505-4511.

45. Degli-Esposti M.A., Smolak P.J., Walczak H., Waugh J., Huang C.P., DuBose R.F., Goodwin R.G., Smith C.A. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J. Exp. Med.*, 1997, Vol. 186, no. 7, pp. 1165-1170.

46. Del Porto P., D'Amato M., Fiorillo M.T., Tuosto L., Piccolella E., Sorrentino R. Identification of a novel HLA-B27 subtype by restriction analysis of a cytotoxic gamma delta T cell clone. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 7, pp. 3093-3100.

47. Deng S., Jiang Y., Luo L., Tang H., Hu X., Wu C., Tang J., Ge H., Gong X., Cai R., Wang G., Li X., Feng J. C5a enhances inflammation and chemotaxis of gammadelta T cells in malignant pleural effusion. *Int. Immunopharmacol.*, 2024, Vol. 127, 111332. doi: 10.1016/j.intimp.2023.111332.

48. Deseke M., Prinz I. Ligand recognition by the gammadelta TCR and discrimination between homeostasis and stress conditions. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 9, pp. 914-924.

49. Deseke M., Rampoldi F., Sandrock I., Borst E., Boning H., Ssebyatika G.L., Jurgens C., Pluckebaum N., Beck M., Hassan A., Tan L., Demera A., Janssen A., Steinberger P., Koenecke C., Viejo-Borbolla A., Messerle M., Krey T., Prinz I. A CMV-induced adaptive human Vdelta1+ gammadelta T cell clone recognizes HLA-DR. *J. Exp. Med.*, 2022, Vol. 219, no. 9, e20212525. doi: 10.1084/jem.20212525.

50. Deusch K., Luling F., Reich K., Classen M., Wagner H., Pfeiffer K. A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment. *Eur. J. Immunol.*, 1991, Vol. 21, no. 4, 1053-1059.

51. di Lorenzo B., Ravens S., Silva-Santos B. High-throughput analysis of the human thymic Vdelta1(+) T cell receptor repertoire. *Sci. Data*, 2019, Vol. 6, no. 1, 115. doi: 10.1038/s41597-019-0118-2.

52. Dieli F., Poccia F., Lipp M., Sireci G., Caccamo N., di Sano C., Salerno A. Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, no. 3, pp. 391-397.

53. Dieli F., Troye-Blomberg M., Ivanyi J., Fournie J.J., Krensky A.M., Bonneville M., Peyrat M.A., Caccamo N., Sireci G., Salerno A. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J. Infect. Dis.*, 2001, Vol. 184, no. 8, pp. 1082-1085.

54. Dimova T., Brouwer M., Gosselin F., Tassignon J., Leo O., Donner C., Marchant A., Vermijlen D. Effector Vgamma9Vdelta2 T cells dominate the human fetal gammadelta T-cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 6, pp. E556-E565.

55. Dondero A., Pastorino F., Della Chiesa M., Corrias M.V., Morandi F., Pistoia V., Olive D., Bellora F., Locatelli F., Castellano A., Moretta L., Moretta A., Bottino C., Castriconi R. PD-L1 expression in metastatic neuroblastoma as an additional mechanism for limiting immune surveillance. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 1, e1064578. doi: 10.1080/2162402X.2015.1064578.

56. Du Y., Peng Q., Cheng D., Pan T., Sun W., Wang H., Ma X., He R., Zhang H., Cui Z., Feng X., Liu Z., Zhao T., Hu W., Shen L., Jiang W., Gao N., Martin B.N., Zhang C.J., Zhang Z., Wang C. Cancer cell-expressed BTNL2 facilitates tumour immune escape via engagement with IL-17A-producing gammadelta T cells. *Nat. Commun.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 231. doi: 10.1038/s41467-021-27936-8.

57. Dudal S., Turriere C., Bessoles S., Fontes P., Sanchez F., Liautard J., Liautard J.P., Lafont V. Release of LL-37 by activated human Vgamma9Vdelta2 T cells: a microbicidal weapon against Brucella suis. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 8, pp. 5533-5539.

58. Edwards S.C., Hedley A., Hoevenaar W.H.M., Wiesheu R., Glauner T., Kilbey A., Shaw R., Boufeva K., Batada N., Hatano S., Yoshikai Y., Blyth K., Miller C., Kirschner K., Coffelt S.B. PD-1 and TIM-3 differentially regulate subsets of mouse IL-17A-producing gammadelta T cells. *J. Exp. Med.*, 2023, Vol. 220, no. 2, e20211431. doi: 10.1084/jem.20211431.
59. Fenoglio D., Poggi A., Catellani S., Battaglia F., Ferrera A., Setti M., Murdaca G., Zocchi M.R. Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 26, pp. 6611-6618.
60. Field K.R., Wragg K.M., Kent S.J., Lee W.S., Juno J.A. gammadelta T cells mediate robust anti-HIV functions during antiretroviral therapy regardless of immune checkpoint expression. *Clin. Transl. Immunology*, 2024, Vol. 13, no. 2, e1486. doi: 10.1002/cti2.1486.
61. Fischer M.A., Golovchenko N.B., Edelblum K.L. gammadelta T cell migration: Separating trafficking from surveillance behaviors at barrier surfaces. *Immunol. Rev.*, 2020, Vol. 298, no. 1, pp. 165-180.
62. Flajnik M.F. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 18, no. 7, pp. 438-453.
63. Flemming A. Dectin-1 on colonic gammadelta T cells mediates vulnerability to psychosocial stress. *Nat. Rev. Immunol.*, 2023, Vol. 23, no. 5, 271. doi: 10.1038/s41577-023-00876-8.
64. Fowler D.W., Copier J., Wilson N., Dagleish A.G., Bodman-Smith M.D. Mycobacteria activate gammadelta T-cell anti-tumour responses via cytokines from type 1 myeloid dendritic cells: a mechanism of action for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 4, pp. 535-547.
65. Frascoli M., Ferraj E., Miu B., Malin J., Spidale N.A., Cowan J., Shissler S.C., Brink R., Xu Y., Cyster J.G., Bhandoola A., Kang J., Reboldi A. Skin gammadelta T cell inflammatory responses are hardwired in the thymus by oxysterol sensing via GPR183 and calibrated by dietary cholesterol. *Immunity*, 2023, Vol. 56, no. 3, pp. 562-575e6.
66. Fuertes M.B., Domaica C.I., Zwirner N.W. Leveraging NKG2D ligands in immuno-oncology. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 713158. doi: 10.3389/fimmu.2021.713158
67. Ganapathy T., Radhakrishnan R., Sakshi S., Martin S. CAR gammadelta T cells for cancer immunotherapy. Is the field more yellow than green? *Cancer Immunol. Immunother.*, 2023, Vol. 72, no. 2, pp. 277-286.
68. Gaur P., Misra R., Aggarwal A. Natural killer cell and gamma delta T cell alterations in enthesitis related arthritis category of juvenile idiopathic arthritis. *Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 161, no. 2, pp. 163-169.
69. Gertner-Dardenne J., Fauriat C., Orlanducci F., Thibult M.L., Pastor S., Fitzgibbon J., Bouabdallah R., Xerri L., Olive D. The co-receptor BTLA negatively regulates human Vgamma9Vdelta2 T-cell proliferation: a potential way of immune escape for lymphoma cells. *Blood*, 2013, Vol. 122, no. 6, pp. 922-931.
70. Girard P., Charles J., Cluzel C., Degeorges E., Manches O., Plumas J., De Fraipont F., Leccia M.T., Mouret S., Chaperot L., Asporid C. The features of circulating and tumor-infiltrating gammadelta T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome. *Oncoimmunology*, 2019, Vol. 8, no. 8, 1601483. doi: 10.1080/2162402X.2019.1601483.
71. Glatzel A., Wesch D., Schiemann F., Brandt E., Janssen O., Kabelitz D. Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood gamma delta T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V delta 2/V gamma 9 gamma delta T cells. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 10, pp. 4920-4929.
72. Godfrey D.I., Uldrich A.P., McCluskey J., Rossjohn J., Moody D.B. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 11, pp. 1114-1123.
73. Gogoi D., Dar A.A., Chiplunkar S.V. Involvement of Notch in activation and effector functions of gammadelta T cells. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 5, pp. 2054-2062.
74. Goyal A., O'Leary D., Duncan L.M. The significance of epidermal involvement in primary cutaneous gamma/delta (gammadelta) T-cell lymphoma: A systematic review and meta-analysis. *J. Cutan. Pathol.*, 2021, Vol. 48, no. 12, pp. 1449-1454.
75. Groh V., Rhinehart R., Secrist H., Bauer S., Grabstein K.H., Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, Vol. 96, no. 12, pp. 6879-6884.
76. Guo Y., Ziegler H.K., Safley S.A., Niesel D.W., Vaidya S., Klimpel G.R. Human T-cell recognition of *Listeria monocytogenes*: recognition of listeriolysin O by TcR alpha beta + and TcR gamma delta + T cells. *Infect. Immun.*, 1995, Vol. 63, no. 6, pp. 2288-2294.
77. Hamada S., Umemura M., Shiono T., Tanaka K., Yahagi A., Begum M.D., Oshiro K., Okamoto Y., Watanabe H., Kawakami K., Roark C., Born W.K., O'Brien R., Ikuta K., Ishikawa H., Nakae S., Iwakura Y., Ohta T., Matsuzaki G. IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against *Listeria monocytogenes* infection in the liver. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 5, pp. 3456-3463.
78. Harly C., Peigne C.M., Scotet E. Molecules and mechanisms implicated in the peculiar antigenic activation process of human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 657. doi: 10.3389/fimmu.2014.00657.
79. Hayday A.C. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000, Vol. 18, pp. 975-1026.
80. Hilligan K.L., Ronchese F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 6, pp. 587-599.

81. Himoudi N., Morgenstern D.A., Yan M., Vernay B., Saraiva L., Wu Y., Cohen C.J., Gustafsson K., Anderson J. Human gammadelta T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 4, pp. 1708-1716.
82. Holoshitz J., Vila L.M., Keroack B.J., McKinley D.R., Bayne N.K. Dual antigenic recognition by cloned human gamma delta T cells. *J. Clin. Invest.*, 1992, Vol. 89, no. 1, pp. 308-314.
83. Hosokawa H., Rothenberg E.V. How transcription factors drive choice of the T cell fate. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021, Vol. 21, no. 3, pp. 162-176.
84. Hu G., Wu P., Cheng P., Zhang Z., Wang Z., Yu X., Shao X., Wu D., Ye J., Zhang T., Wang X., Qiu F., Yan J., Huang J. Tumor-infiltrating CD39(+)gammadeltaTregs are novel immunosuppressive T cells in human colorectal cancer. *Oncoimmunology*, 2017, Vol. 6, no. 2, e1277305. doi: 10.1080/2162402X.2016.1277305.
85. Hu W., Shang R., Yang J., Chen C., Liu Z., Liang G., He W., Luo G. Skin gammadelta T cells and their function in wound healing. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 875076. doi: 10.3389/fimmu.2022.875076.
86. Huang C., Zeng Y., Tu W. The role of gammadelta-T cells during human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 78, no. 2. doi: 10.1111/aji.12713.
87. Hueber W., Sands B.E., Lewitzky S., Vandemeulebroecke M., Reinisch W., Higgins P.D., Wehkamp J., Feagan B.G., Yao M.D., Karczewski M., Karczewski J., Pezous N., Bek S., Bruin G., Mellgard B., Berger C., Londei M., Bertolino A.P., Tougas G., Travis S.P., Secukinumab in Crohn's Disease Study G. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut*, 2012, Vol. 61, no. 12, pp. 1693-1700.
88. Hwang H.J., Lee J.J., Kang S.H., Suh J.K., Choi E.S., Jang S., Hwang S.H., Koh K.N., Im H.J., Kim N. The BTLA and PD-1 signaling pathways independently regulate the proliferation and cytotoxicity of human peripheral blood gammadelta T cells. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2021, Vol. 9, no. 1, pp. 274-287.
89. Iwasaki M., Tanaka Y., Kobayashi H., Murata-Hirai K., Miyabe H., Sugie T., Toi M., Minato N. Expression and function of PD-1 in human gammadelta T cells that recognize phosphoantigens. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 2, pp. 345-355.
90. Jalali S., Stankovic S., Westall G.P., Reading P.C., Sullivan L.C., Brooks A.G. Examining the impact of immunosuppressive drugs on antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of human peripheral blood natural killer (NK) cells and gamma delta (gammadelta) T cells. *Transpl. Immunol.*, 2024, Vol. 82, 101962. doi: 10.1016/j.trim.2023.101962.
91. Jensen K.D., Su X., Shin S., Li L., Youssef S., Yamasaki S., Steinman L., Saito T., Locksley R.M., Davis M.M., Baumgarth N., Chien Y.H. Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity*, 2008, Vol. 29, no. 1, pp. 90-100.
92. Jia Z., Ren Z., Ye D., Li J., Xu Y., Liu H., Meng Z., Yang C., Chen X., Mao X., Luo X., Yang Z., Ma L., Deng A., Li Y., Han B., Wei J., Huang C., Xiang Z., Chen G., Li P., Ouyang J., Chen P., Luo O.J., Gao Y., Yin Z. Immune-Ageing Evaluation of Peripheral T and NK Lymphocyte Subsets in Chinese Healthy Adults. *Phenomics*, 2023, Vol. 3, no. 4, pp. 360-374.
93. Jin C., Lagoudas G.K., Zhao C., Bullman S., Bhutkar A., Hu B., Ameh S., Sandel D., Liang X.S., Mazzilli S., Whary M.T., Meyerson M., Germain R., Blainey P.C., Fox J.G., Jacks T. Commensal microbiota promote lung cancer development via gammadelta T cells. *Cell*, 2019, Vol. 176, no. 5, pp. 998-1013.e16.
94. Jin Y., Xia M., Sun A., Saylor C.M., Xiong N. CCR10 is important for the development of skin-specific gammadeltaT cells by regulating their migration and location. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 10, pp. 5723-5731.
95. Kabelitz D., Serrano R., Kouakanou L., Peters C., Kalyan S. Cancer immunotherapy with gammadelta T cells: many paths ahead of us. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 9, pp. 925-939.
96. Kabelitz D., Wesch D. Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors. *Crit. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 23, no. 5-6, pp. 339-370.
97. Kallemeijn M.J., Kavelaars F.G., van der Klift M.Y., Wolvers-Tettero I.L.M., Valk P.J.M., van Dongen J.J.M., Langerak A.W. Next-generation sequencing analysis of the human TCRgammadelta+ T-cell repertoire reveals shifts in vgamma- and vdelta-usage in memory populations upon aging. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 448. doi: 10.3389/fimmu.2018.00448.
98. Kaminski H., Marseres G., Cosentino A., Guerville F., Pitard V., Fournie J.J., Merville P., Dechanet-Merville J., Couzi L. Understanding human gammadelta T cell biology toward a better management of cytomegalovirus infection. *Immunol. Rev.*, 2020, Vol. 298, no. 1, pp. 264-288.
99. Kapp J.A., Kapp L.M., McKenna K.C., Lake J.P. gammadelta T-cell clones from intestinal intraepithelial lymphocytes inhibit development of CTL responses ex vivo. *Immunology*, 2004, Vol. 111, no. 2, pp. 155-164.
100. Karunakaran M.M., Willcox C.R., Salim M., Paletta D., Fichtner A.S., Noll A., Starick L., Nohren A., Begley C.R., Berwick K.A., Chaleil R.A.G., Pitard V., Dechanet-Merville J., Bates P.A., Kimmel B., Knowles T.J., Kunzmann V., Walter L., Jeeves M., Mohammed F., Willcox B.E., Herrmann T. Butyrophilin-2A1 directly binds germline-encoded regions of the Vgamma9Vdelta2 TCR and is essential for phosphoantigen sensing. *Immunity*, 2020, Vol. 52, no. 3, pp. 487-498.e6.

101. Karunathilaka A., Halstrom S., Price P., Holt M., Lutzky V.P., Doolan D.L., Kupz A., Bell S.C., Thomson R.M., Miles J.J., Ratnatunga C.N. CD161 expression defines new human gammadelta T cell subsets. *Immun. Ageing*, 2022, Vol. 19, no. 1, 11. doi: 10.1186/s12979-022-00269-w.
102. Ke Y., Kapp L.M., Kapp J.A. Inhibition of tumor rejection by gammadelta T cells and IL-10. *Cell. Immunol.*, 2003, Vol. 221, no. 2, pp. 107-114.
103. Kenna T., Golden-Mason L., Norris S., Hegarty J.E., O'Farrelly C., Doherty D.G. Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 113, no. 1, pp. 56-63.
104. Khairallah C., Dechanet-Merville J., Capone M. Gammadelta T cell-mediated immunity to cytomegalovirus infection. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 105. doi: 10.3389/fimmu.2017.00105.
105. Kierkels G.J.J., Scheper W., Meringa A.D., Johanna I., Beringer D.X., Janssen A., Schiffler M., Aarts-Riemens T., Kramer L., Straetmans T., Heijhuurs S., Leusen J.H.W., San Jose E., Fuchs K., Griffioen M., Falkenburg J.H., Bongiovanni L., de Bruin A., Vargas-Diaz D., Altelaar M., Heck A.J.R., Shultz L.D., Ishikawa F., Nishimura M.I., Sebastyen Z., Kuball J. Identification of a tumor-specific allo-HLA-restricted gammadeltaTCR. *Blood Adv.*, 2019, Vol. 3, no. 19, pp. 2870-2882.
106. Kim M., Kim H., Han M., Hwang H.J., Kim H., Im H.J., Kim N., Koh K.N. Characteristics of Human Peripheral Blood gammadelta T Cells Expanded With Zoledronate. *Anticancer Res.*, 2021, Vol. 41, no. 12, pp. 6031-6038.
107. Kjer-Nielsen L., Patel O., Corbett A.J., Le Nours J., Meehan B., Liu L., Bhati M., Chen Z., Kostenko L., Reantragoon R., Williamson N.A., Purcell A.W., Dudek N.L., McConville M.J., O'Hair R.A., Khairallah G.N., Godfrey D.I., Fairlie D.P., Rossjohn J., McCluskey J. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*, 2012, Vol. 491, no. 7426, pp. 717-723.
108. Kong Y., Cao W., Xi X., Ma C., Cui L., He W. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 2, pp. 310-317.
109. Kornberg A., Botella T., Moon C.S., Rao S., Gelbs J., Cheng L., Miller J., Bacarella A.M., Garcia-Vilas J.A., Vargas J., Yu X., Krupska I., Bush E., Garcia-Carrasquillo R., Lebwohl B., Krishnareddy S., Lewis S., Green P.H.R., Bhagat G., Yan K.S., Han A. Gluten induces rapid reprogramming of natural memory alphabeta and gammadelta intraepithelial T cells to induce cytotoxicity in celiac disease. *Sci. Immunol.*, 2023, Vol. 8, no. 85, eadf4312. doi: 10.1126/sciimmunol.adf4312.
110. Kouakanou L., Peters C., Sun Q., Floess S., Bhat J., Huehn J., Kabelitz D. Vitamin C supports conversion of human gammadelta T cells into FOXP3-expressing regulatory cells by epigenetic regulation. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 6550. doi: 10.1038/s41598-020-63572-w.
111. Kozbor D., Trinchieri G., Monos D.S., Isobe M., Russo G., Haney J.A., Zmijewski C., Croce C.M. Human TCR-gamma+/delta+, CD8+ T lymphocytes recognize tetanus toxoid in an MHC-restricted fashion. *J. Exp. Med.*, 1989, Vol. 169, no. 5, pp. 1847-1851.
112. Kulicke C., Karamoos E., Lewinsohn D., Harriff M. Covering all the bases: complementary MR1 antigen presentation pathways sample diverse antigens and intracellular compartments. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 2034. doi: 10.3389/fimmu.2020.02034.
113. Lafont V., Sanchez F., Laprevotte E., Michaud H.A., Gros L., Eliaou J.F., Bonnefoy N. Plasticity of gammadelta T cells: impact on the anti-tumor response. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 622. doi: 10.3389/fimmu.2014.00622.
114. Laggner U., Di Meglio P., Perera G.K., Hundhausen C., Lacy K.E., Ali N., Smith C.H., Hayday A.C., Nickoloff B.J., Nestle F.O. Identification of a novel proinflammatory human skin-homing Vgamma9Vdelta2 T cell subset with a potential role in psoriasis. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 5, pp. 2783-2793.
115. Lalaoui N., Morle A., Merino D., Jacquemin G., Iessi E., Morizot A., Shirley S., Robert B., Solary E., Garrido C., Micheau O. TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 5, e19679. doi: 10.1371/journal.pone.0019679.
116. Lamour A., Jouen-Beades F., Lees O., Gilbert D., Le Loet X., Tron F. Analysis of T cell receptors in rheumatoid arthritis: the increased expression of HLA-DR antigen on circulating gamma delta+ T cells is correlated with disease activity. *Clin. Exp. Immunol.*, 1992, Vol. 89, no. 2, pp. 217-222.
117. Lanca T., Costa M.F., Goncalves-Sousa N., Rei M., Grosso A.R., Penido C., Silva-Santos B. Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic gammadelta T lymphocytes to tumor beds. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 12, pp. 6673-6680.
118. Le Floch A.C., Rouviere M.S., Salem N., Ben Amara A., Orlanducci F., Vey N., Gorvel L., Chretien A.S., Olive D. Prognostic immune effector signature in adult acute lymphoblastic leukemia patients is dominated by gammadelta T Cells. *Cells*, 2023, Vol. 12, no. 13, 1693. doi: 10.3390/cells12131693.
119. Lee D., Dunn Z.S., Guo W., Rosenthal C.J., Penn N.E., Yu Y., Zhou K., Li Z., Ma F., Li M., Song T.C., Cen X., Li Y.R., Zhou J.J., Pellegrini M., Wang P., Yang L. Unlocking the potential of allogeneic Vdelta2 T cells for ovarian cancer therapy through CD16 biomarker selection and CAR/IL-15 engineering. *Nat. Commun.*, 2023, Vol. 14, no. 1, 6942. doi: 10.1038/s41467-023-42619-2.

120. Lee D., Rosenthal C.J., Penn N.E., Dunn Z.S., Zhou Y., Yang L. Human gammadelta T cell subsets and their clinical applications for cancer immunotherapy. *Cancers*, 2022, Vol. 14, no. 12, 3005. doi: 10.3390/cancers14123005.
121. Lee J.S., Tato C.M., Joyce-Shaikh B., Gulen M.F., Cayatte C., Chen Y., Blumenschein W.M., Judo M., Ayanoglu G., McClanahan T.K., Li X., Cua D.J. Interleukin-23-independent il-17 production regulates intestinal epithelial permeability. *Immunity*, 2015, Vol. 43, no. 4, pp. 727-738.
122. Lee M., Lee E., Han S.K., Choi Y.H., Kwon D.I., Choi H., Lee K., Park E.S., Rha M.S., Joo D.J., Shin E.C., Kim S., Kim J.K., Lee Y.J. Single-cell RNA sequencing identifies shared differentiation paths of mouse thymic innate T cells. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 4367. doi: 10.1038/s41467-020-18155-8.
123. Leon-Lara X., Yang T., Fichtner A.S., Bruni E., von Kaisenberg C., Eiz-Vesper B., Dodoo D., Adu B., Ravens S. Evidence for an adult-like type 1-immunity phenotype of Vdelta1, Vdelta2 and Vdelta3 T Cells in Ghanaian children with repeated exposure to malaria. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 807765. doi: 10.3389/fimmu.2022.807765.
124. Lepore M., Kalinichenko A., Calogero S., Kumar P., Paleja B., Schmalzer M., Narang V., Zolezzi F., Poidinger M., Mori L., De Libero G. Functionally diverse human T cells recognize non-microbial antigens presented by MR1. *Elife*, 2017, Vol. 6, e24476. doi: 10.7554/eLife.24476.
125. Lesport E., Baudhuin J., Sousa S., LeMaout J., Zamborlini A., Rouas-Freiss N., Carosella E.D., Favier B. Inhibition of human gamma delta [corrected] T-cell antitumoral activity through HLA-G: implications for immunotherapy of cancer. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, no. 20, pp. 3385-3399.
126. Li X., Lu H., Gu Y., Zhang X., Zhang G., Shi T., Chen W. Tim-3 suppresses the killing effect of Vgamma9Vdelta2 T cells on colon cancer cells by reducing perforin and granzyme B expression. *Exp. Cell Res.*, 2020, Vol. 386, no. 1, 111719. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111719.
127. Li Y., Jiang S., Li J., Yin M., Yan F., Chen Y., Chen Y., Wu T., Cheng M., He Y., Liang H., Yu H., Qiao Q., Guo Z., Xu Y., Zhang Y., Xiang Z., Yin Z. Phenotypic changes of peripheral gammadelta T cell and its subsets in patients with coronary artery disease. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 900334. doi: 10.3389/fimmu.2022.900334.
128. Libera J., Wittner M., Kantowski M., Woost R., Eberhard J.M., de Heer J., Reher D., Huber S., Haag F., Schulze Zur Wiesch J. Decreased frequency of intestinal CD39(+) gammadelta(+) T cells with tissue-resident memory phenotype in inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 567472. doi: 10.3389/fimmu.2020.567472.
129. Liu B., He X., Wang Y., Huang J.W., Zheng Y.B., Li Y., Lu L.G. Bibliometric analysis of gammadelta T Cells as immune regulators in cancer prognosis. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 874640. doi: 10.3389/fimmu.2022.874640.
130. Liu J., Wu M., Yang Y., Wang Z., He S., Tian X., Wang H. gammadelta T cells and the PD-1/PD-L1 axis: a love-hate relationship in the tumor microenvironment. *J. Transl. Med.*, 2024, Vol. 22, no. 1, 553. doi: 10.1186/s12967-024-05327-z.
131. Lo Presti E., Dieli F., Fournie J.J., Meraviglia S. Deciphering human gammadelta T cell response in cancer: Lessons from tumor-infiltrating gammadelta T cells. *Immunol. Rev.*, 2020, Vol. 298, no. 1, pp. 153-164.
132. Lo Presti E., Dieli F., Meraviglia S. Tumor-Infiltrating gammadelta T lymphocytes: pathogenic role, clinical significance, and differential programming in the tumor microenvironment. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 607. doi: 10.3389/fimmu.2014.00607.
133. Ma C., Zhang Q., Ye J., Wang F., Zhang Y., Wevers E., Schwartz T., Hunborg P., Varvares M.A., Hoft D.F., Hsueh E.C., Peng G. Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 10, pp. 5029-5036.
134. Mangan B.A., Dunne M.R., O'Reilly V.P., Dunne P.J., Exley M.A., O'Shea D., Scotet E., Hogan A.E., Doherty D.G. Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human Vdelta3 T cells. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 1, pp. 30-34.
135. Maniar A., Zhang X., Lin W., Gastman B.R., Pauza C.D., Strome S.E., Chapoval A.I. Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 10, pp. 1726-1733.
136. Mao T.L., Miao C.H., Liao Y.J., Chen Y.J., Yeh C.Y., Liu C.L. Ex vivo expanded human Vgamma9Vdelta2 T-cells can suppress epithelial ovarian cancer cell growth. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 5, 1139. doi: 10.3390/ijms20051139.
137. Mao Y., Yin S., Zhang J., Hu Y., Huang B., Cui L., Kang N., He W. A new effect of IL-4 on human gammadelta T cells: promoting regulatory Vdelta1 T cells via IL-10 production and inhibiting function of Vdelta2 T cells. *Cell. Mol. Immunol.*, 2016, Vol. 13, no. 2, pp. 217-228.
138. Marlin R., Pappalardo A., Kaminski H., Willcox C.R., Pitard V., Netzer S., Khairallah C., Lomenech A.M., Harly C., Bonneville M., Moreau J.F., Scotet E., Willcox B.E., Faustin B., Dechanet-Merville J. Sensing of cell stress by human gammadelta TCR-dependent recognition of annexin A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, Vol. 114, no. 12, pp. 3163-3168.
139. Martinet L., Jean C., Dietrich G., Fournie J.J., Poupot R. PGE2 inhibits natural killer and gamma delta T cell cytotoxicity triggered by NKR and TCR through a cAMP-mediated PKA type I-dependent signaling. *Biochem. Pharmacol.*, 2010, Vol. 80, no. 6, pp. 838-845.

140. Matsuo Y., Tsujimura T., Drexler H.G. Proposal for the designation of the natural killer antigens-positive gammadelta T-cell subset as gammadelta NKT-cells: nomenclature based on immunoprofile. *Hum. Cell*, 2021, Vol. 34, no. 4, pp. 1278-1279.
141. McGinley A.M., Edwards S.C., Raverdeau M., Mills K.H.G. Th17 cells, gammadelta T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. *J. Autoimmun.*, 2018, S0896-8411(18)30007-6. doi: 10.1016/j.jaut.2018.01.001.
142. McKenzie D.R., Hart R., Bah N., Ushakov D.S., Munoz-Ruiz M., Feederle R., Hayday A.C. Normality sensing licenses local T cells for innate-like tissue surveillance. *Nat. Immunol.*, 2022, Vol. 23, no. 3, pp. 411-422.
143. McVay L.D., Carding S.R. Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 157, no. 7, pp. 2873-2882.
144. McVay L.D., Carding S.R. Generation of human gammadelta T-cell repertoires. *Crit. Rev. Immunol.*, 1999, Vol. 19, no. 5-6, pp. 431-460.
145. McVay L.D., Jaswal S.S., Kennedy C., Hayday A., Carding S.R. The generation of human gammadelta T cell repertoires during fetal development. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 160, no. 12, pp. 5851-5860.
146. Melandri D., Zlatareva I., Chaleil R.A.G., Dart R.J., Chancellor A., Nussbaumer O., Polyakova O., Roberts N.A., Wesch D., Kabelitz D., Irving P.M., John S., Mansour S., Bates P.A., Vantourout P., Hayday A.C. The gammadeltaTCR combines innate immunity with adaptive immunity by utilizing spatially distinct regions for agonist selection and antigen responsiveness. *Nat. Immunol.*, 2018, Vol. 19, no. 12, pp. 1352-1365.
147. Mensurado S., Blanco-Dominguez R., Silva-Santos B. The emerging roles of gammadelta T cells in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2023, Vol. 20, no. 3, pp. 178-191.
148. Mensurado S., Silva-Santos B. Battle of the gammadelta T cell subsets in the gut. *Trends Cancer*, 2022, Vol. 8, no. 11, pp. 881-883.
149. Meraviglia S., Lo Presti E., Tosolini M., La Mendola C., Orlando V., Todaro M., Catalano V., Stassi G., Cicero G., Vieni S., Fournie J.J., Dieli F. Distinctive features of tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes in human colorectal cancer. *Oncoimmunology*, 2017, Vol. 6, no. 10, e1347742. doi: 10.1080/2162402X.2017.1347742.
150. Merino D., Lalaoui N., Morizot A., Schneider P., Solary E., Micheau O. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.*, 2006, Vol. 26, no. 19, pp. 7046-7055.
151. Meuter S., Eberl M., Moser B. Prolonged antigen survival and cytosolic export in cross-presenting human gammadelta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 19, pp. 8730-8735.
152. Michel M.L., Pang D.J., Haque S.F., Potocnik A.J., Pennington D.J., Hayday A.C. Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing gammadelta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 43, pp. 17549-17554.
153. Mikulak J., Oriolo F., Bruni E., Roberto A., Colombo F.S., Villa A., Bosticardo M., Bortolomai I., Lo Presti E., Meraviglia S., Dieli F., Vetrano S., Danese S., Della Bella S., Carvello M.M., Sacchi M., Cugini G., Colombo G., Klinger M., Spaggiari P., Roncalli M., Prinz I., Ravens S., di Lorenzo B., Marcenaro E., Silva-Santos B., Spinelli A., Mavilio D. NKp46-expressing human gut-resident intraepithelial Vdelta1 T cell subpopulation exhibits high antitumor activity against colorectal cancer. *JCI Insight*, 2019, Vol. 4, no. 24, e125884. doi: 10.1172/jci.insight.125884.
154. Mo W.X., Yin S.S., Chen H., Zhou C., Zhou J.X., Zhao L.D., Fei Y.Y., Yang H.X., Guo J.B., Mao Y.J., Huang L.F., Zheng W.J., Zhang W., Zhang J.M., He W., Zhang X. Chemotaxis of Vdelta2 T cells to the joints contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2017, Vol. 76, no. 12, pp. 2075-2084.
155. Moens E., Brouwer M., Dimova T., Goldman M., Willems F., Vermijlen D. IL-23R and TCR signaling drives the generation of neonatal Vgamma9Vdelta2 T cells expressing high levels of cytotoxic mediators and producing IFN-gamma and IL-17. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, Vol. 89, no. 5, pp. 743-752.
156. Montaldo E., Del Zotto G., Della Chiesa M., Mingari M.C., Moretta A., De Maria A., Moretta L. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A*, 2013, Vol. 83, no. 8, pp. 702-713. doi: 10.1002/cyto.a.22302.
157. Mou W., Han W., Ma X., Wang X., Qin H., Zhao W., Ren X., Chen X., Yang W., Cheng H., Wang X., Zhang H., Ni X., Wang H., Gui J. gammadeltaTFH cells promote B cell maturation and antibody production in neuroblastoma. *BMC Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 1, 36. doi: 10.1186/s12865-017-0216-x.
158. Munoz-Ruiz M., Ribot J.C., Grosso A.R., Goncalves-Sousa N., Pamplona A., Pennington D.J., Regueiro J.R., Fernandez-Malave E., Silva-Santos B. TCR signal strength controls thymic differentiation of discrete proinflammatory gammadelta T cell subsets. *Nat. Immunol.*, 2016, Vol. 17, no. 6, pp. 721-727.
159. Munoz-Ruiz M., Sumaria N., Pennington D.J., Silva-Santos B. Thymic determinants of gammadelta T Cell differentiation. *Trends Immunol.*, 2017, Vol. 38, no. 5, pp. 336-344.
160. Murray S.A., Mohar I., Miller J.L., Brempeles K.J., Vaughan A.M., Kappe S.H., Crispe I.N. CD40 is required for protective immunity against liver stage Plasmodium infection. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 5, pp. 2268-2279.
161. Ness-Schwickerath K.J., Jin C., Morita C.T. Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 12, pp. 7268-7280.
162. Neumann S., Hasenauer J., Pollak N., Scheurich P. Dominant negative effects of tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor 4 on TRAIL receptor 1 signaling by formation of heteromeric complexes. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 23, pp. 16576-16587.

163. Ni C., Fang Q.Q., Chen W.Z., Jiang J.X., Jiang Z., Ye J., Zhang T., Yang L., Meng F.B., Xia W.J., Zhong M., Huang J. Breast cancer-derived exosomes transmit lncRNA SNHG16 to induce CD73+gammadelta1 Treg cells. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2020, Vol. 5, no. 1, 41. doi: 10.1038/s41392-020-0129-7.
164. Nielsen C.M., White M.J., Goodier M.R., Riley E.M. Functional significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 422. doi: 10.3389/fimmu.2013.00422.
165. Nielsen M.M., Witherden D.A., Havran W.L. gammadelta T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 12, pp. 733-745.
166. Ning Z., Liu K., Xiong H. Roles of BTLA in immunity and immune disorders. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 654960. doi: 10.3389/fimmu.2021.654960.
167. Nowak I., Wilczynska K., Wilczynski J.R., Malinowski A., Radwan P., Radwan M., Kusnierczyk P. KIR, LILRB and their ligands' genes as potential biomarkers in recurrent implantation failure. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2017, Vol. 65, no. 5, pp. 391-399.
168. Oberg H.H., Wesch D., Kalyan S., Kabelitz D. Regulatory interactions between neutrophils, tumor cells and T cells. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1690. doi: 10.3389/fimmu.2019.01690.
169. Otano I., Azpilikueta A., Glez-Vaz J., Alvarez M., Medina-Echeverez J., Cortés-Domínguez I., Ortiz-de-Solorzano C., Ellmark P., Fritzell S., Hernandez-Hoyos G., Nelson M.H., Ochoa M.C., Bolaños E., Cuculescu D., Jauregui P., Sanchez-Gregorio S., Etxeberria I., Rodriguez-Ruiz M.E., Sanmamed M.F., Teijeira Á., Berraondo P., Melero I. CD137 (4-1BB) costimulation of CD8+ T cells is more potent when provided in cis than in trans with respect to CD3-TCR stimulation. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 7296. doi: 10.1038/s41467-021-27613-w.
170. Ou L., Wang H., Huang H., Zhou Z., Lin Q., Guo Y., Mitchell T., Huang A.C., Karakousis G., Schuchter L., Amaravadi R., Guo W., Salvino J., Herlyn M., Xu X. Preclinical platforms to study therapeutic efficacy of human gammadelta T cells. *Clin. Transl. Med.*, 2022, Vol. 12, no. 6, e814. doi: 10.1002/ctm2.814.
171. Palakodeti A., Sandstrom A., Sundaresan L., Harly C., Nedellec S., Olive D., Scotet E., Bonneville M., Adams E.J. The molecular basis for modulation of human Vgamma9Vdelta2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. *J. Biol. Chem.*, 2012, Vol. 287, no. 39, pp. 32780-32790.
172. Pan G., Ni J., Wei Y.F., Yu G., Gentz R., Dixit V.M. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 1997, Vol. 277, no. 5327, pp. 815-818.
173. Papotto P.H., Reinhardt A., Prinz I., Silva-Santos B. Innately versatile: gammadelta17 T cells in inflammatory and autoimmune diseases. *J. Autoimmun.*, 2018, Vol. 87, pp. 26-37.
174. Papotto P.H., Ribot J.C., Silva-Santos B. IL-17(+) gammadelta T cells as kick-starters of inflammation. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 6, pp. 604-611.
175. Park J.H., Lee H.K. Function of gammadelta T cells in tumor immunology and their application to cancer therapy. *Exp. Mol. Med.*, 2021, Vol. 53, no. 3, pp. 318-327.
176. Patil R.S., Shah S.U., Shrikhande S.V., Goel M., Dikshit R.P., Chiplunkar S.V. IL17 producing gammadeltaT cells induce angiogenesis and are associated with poor survival in gallbladder cancer patients. *Int. J. Cancer*, 2016, Vol. 139, no. 4, pp. 869-881.
177. Patin E.C., Soulard D., Fleury S., Hassane M., Dombrowicz D., Faveeuw C., Trottein F., Paget C. Type I IFN Receptor Signaling Controls IL7-Dependent Accumulation and Activity of Protumoral IL17A-Producing gammadeltaT Cells in Breast Cancer. *Cancer Res.*, 2018, Vol. 78, no. 1, pp. 195-204.
178. Paul S., Lal G. Regulatory and effector functions of gamma-delta (gammadelta) T cells and their therapeutic potential in adoptive cellular therapy for cancer. *Int. J. Cancer*, 2016, Vol. 139, no. 5, pp. 976-985.
179. Pellicci D.G., Koay H.F., Berzins S.P. Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and gammadelta T cells emerge. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 12, pp. 756-770.
180. Peters C., Hasler R., Wesch D., Kabelitz D. Human Vdelta2 T cells are a major source of interleukin-9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, Vol. 113, no. 44, pp. 12520-12525.
181. Peters C., Kabelitz D., Wesch D. Regulatory functions of gammadelta T cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2018, Vol. 75, no. 12, pp. 2125-2135.
182. Peters C., Oberg H.H., Kabelitz D., Wesch D. Phenotype and regulation of immunosuppressive Vdelta2-expressing gammadelta T cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014, Vol. 71, no. 10, pp. 1943-1960.
183. Poggi A., Carosio R., Fenoglio D., Brenni S., Murdaca G., Indiveri F., Scabini S., Ferrero E., Zocchi M.R. Migration of V delta 1 and V delta 2 T cells in response to CXCR3 and CXCR4 ligands in healthy donors and HIV-1-infected patients: competition by HIV-1 Tat. *Blood*, 2004, Vol. 103, no. 6, pp. 2205-2213.
184. Poggi A., Contini P., Catellani S., Setti M., Murdaca G., Zocchi M.R. Regulation of gammadelta T cell survival by soluble HLA-I: involvement of CD8 and activating killer Ig-like receptors. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, no. 9, pp. 2670-2678.
185. Polgar B., Barakonyi A., Xynos I., Szekeres-Bartho J. The role of gamma/delta T cell receptor positive cells in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1999, Vol. 41, no. 4, pp. 239-244.
186. Poupot M., Pont F., Fournie J.J. Profiling blood lymphocyte interactions with cancer cells uncovers the innate reactivity of human gamma delta T cells to anaplastic large cell lymphoma. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 3, pp. 1717-1722.

187. Qu G., Wang S., Zhou Z., Jiang D., Liao A., Luo J. Comparing mouse and human tissue-resident gammadelta T Cells. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 891687. doi: 10.3389/fimmu.2022.891687.
188. Raulat D.H., Gasser S., Gowen B.G., Deng W., Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 413-441.
189. Ravens S., Hengst J., Schlapphoff V., Deterding K., Dhingra A., Schultze-Florey C., Koenecke C., Cornberg M., Wedemeyer H., Prinz I. Human gammadelta T cell receptor repertoires in peripheral blood remain stable despite clearance of persistent hepatitis C virus infection by direct-acting antiviral drug therapy. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 510. doi: 10.3389/fimmu.2018.00510.
190. Ravens S., Schultze-Florey C., Raha S., Sandrock I., Drenker M., Oberdorfer L., Reinhardt A., Ravens I., Beck M., Geffers R., von Kaisenberg C., Heuser M., Thol F., Ganser A., Forster R., Koenecke C., Prinz I. Human gammadelta T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 4, pp. 393-401.
191. Rei M., Goncalves-Sousa N., Lanca T., Thompson R.G., Mensurado S., Balkwill F.R., Kulbe H., Pennington D.J., Silva-Santos B. Murine CD27(-) Vgamma6(+) gammadelta T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, no. 34, pp. E3562-E3570.
192. Reis B.S., Darcy P.W., Khan I.Z., Moon C.S., Kornberg A.E., Schneider V.S., Alvarez Y., Eleso O., Zhu C., Scherthanner M., Lockhart A., Reed A., Bortolatto J., Castro T.B.R., Bilate A.M., Grivennikov S., Han A.S., Mucida D. TCR-Vgammadelta usage distinguishes protumor from antitumor intestinal gammadelta T cell subsets. *Science*, 2022, Vol. 377, no. 6603, pp. 276-284.
193. Ren S., Zhang X., Guan H., Wu L., Yu M., Hou D., Yan Y., Fang X. Lactobacillus acidipiscis induced regulatory gamma Delta T cells and attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 623451. doi: 10.3389/fimmu.2021.623451.
194. Ribot J.C., deBarros A., Pang D.J., Neves J.F., Peperzak V., Roberts S.J., Girardi M., Borst J., Hayday A.C., Pennington D.J., Silva-Santos B. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 4, pp. 427-436.
195. Ribot J.C., deBarros A., Silva-Santos B. Searching for «signal 2»: costimulation requirements of gammadelta T cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, no. 14, pp. 2345-2355.
196. Ribot J.C., Lopes N., Silva-Santos B. gammadelta T cells in tissue physiology and surveillance. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021, Vol. 21, no. 4, pp. 221-232.
197. Ribot J.C., Ribeiro S.T., Correia D.V., Sousa A.E., Silva-Santos B. Human gammadelta thymocytes are functionally immature and differentiate into cytotoxic type 1 effector T cells upon IL-2/IL-15 signaling. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 5, pp. 2237-2243.
198. Rice M.T., von Borstel A., Chevour P., Awad W., Howson L.J., Littler D.R., Gherardin N.A., Le Nours J., Giles E.M., Berry R., Godfrey D.I., Davey M.S., Rossjohn J., Gully B.S. Recognition of the antigen-presenting molecule MR1 by a Vdelta3(+) gammadelta T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2021, Vol. 118, no. 49, e2110288118. doi: 10.1073/pnas.2110288118.
199. Ridgley L.A., Caron J., Dagleish A., Bodman-Smith M. Releasing the restraints of Vgamma9Vdelta2 T-cells in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1065495. doi: 10.3389/fimmu.2022.1065495.
200. Rigau M., Ostrouska S., Fulford T.S., Johnson D.N., Woods K., Ruan Z., McWilliam H.E.G., Hudson C., Tutuka C., Wheatley A.K., Kent S.J., Villadangos J.A., Pal B., Kurts C., Simmonds J., Pelzing M., Nash A.D., Hammet A., Verhagen A.M., Vairo G., Maraskovsky E., Panousis C., Gherardin N.A., Cebon J., Godfrey D.I., Behren A., Uldrich A.P. Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by gammadelta T cells. *Science*, 2020, Vol. 367, no. 6478, eaay5516. doi: 10.1126/science.aay5516.
201. Riol-Blanco L., Lazarevic V., Awasthi A., Mitsdoerffer M., Wilson B.S., Croxford A., Waisman A., Kuchroo V.K., Glimcher L.H., Oukka M. IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 4, pp. 1710-1720.
202. Robak E., Niewiadomska H., Robak T., Bartkowiak J., Blonski J.Z., Wozniacka A., Pomorski L., Sysa-Jedrezejowska A. Lymphocytes Tgammadelta in clinically normal skin and peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus and their correlation with disease activity. *Mediators Inflamm.*, 2001, Vol. 10, no. 4, pp. 179-189.
203. Rodin W., Szeponik L., Rangelova T., Tamiru Kebede F., Osterlund T., Sundstrom P., Hogg S., Wettergren Y., Cosma A., Stahlberg A., Bexé Lindskog E., Quiding Jarbrink M. gammadelta T cells in human colon adenocarcinomas comprise mainly Vdelta1, Vdelta2, and Vdelta3 cells with distinct phenotype and function. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2024, Vol. 73, no. 9, 174. doi: 10.1007/s00262-024-03758-7.
204. Rothenberg E.V. Single-cell insights into the hematopoietic generation of T-lymphocyte precursors in mouse and human. *Exp. Hematol.*, 2021, Vol. 95, pp. 1-12.
205. Roura-Mir C., Catalfamo M., Cheng T.Y., Marqusee E., Besra G.S., Jaraquemada D., Moody D.B. CD1a and CD1c activate intrathyroidal T cells during Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 6, pp. 3773-3780.

206. Roy S., Ly D., Castro C.D., Li N.S., Hawk A.J., Altman J.D., Meredith S.C., Piccirilli J.A., Moody D.B., Adams E.J. Molecular Analysis of Lipid-Reactive Vdelta1 gammadelta T Cells Identified by CD1c Tetramers. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 4, pp. 1933-1942.
207. Rust C.J., Verreck F., Vietor H., Koning F. Specific recognition of staphylococcal enterotoxin A by human T cells bearing receptors with the V gamma 9 region. *Nature*, 1990, Vol. 346, no. 6284, pp. 572-574.
208. Ryan P.L., Sumaria N., Holland C.J., Bradford C.M., Izotova N., Grandjean C.L., Jawad A.S., Bergmeier L.A., Pennington D.J. Heterogeneous yet stable Vdelta2(+) T-cell profiles define distinct cytotoxic effector potentials in healthy human individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, Vol. 113, no. 50, pp. 14378-14383.
209. Sanchez-Correa B., Valhondo I., Hassouneh F., Lopez-Sejas N., Pera A., Bergua J.M., Arcos M.J., Banas H., Casas-Aviles I., Duran E., Alonso C., Solana R., Tarazona R. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: Novel immune checkpoints for natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancers*, 2019, Vol. 11, no. 6, 877. doi: 10.3390/cancers11060877.
210. Sandstrom A., Peigne C.M., Leger A., Crooks J.E., Konczak F., Gesnel M.C., Breathnach R., Bonneville M., Scotet E., Adams E.J. The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human Vgamma9Vdelta2 T cells. *Immunity*, 2014, Vol. 40, no. 4, pp. 490-500.
211. Schönefeldt S., Wais T., Herling M., Mustjoki S., Bekiaris V., Moriggl R., Neubauer H.A. The diverse roles of gammadelta T cells in cancer: from rapid immunity to aggressive lymphoma. *Cancers*, 2021, Vol. 13, no. 24, 6212. doi: 10.3390/cancers13246212.
212. Sebestyen Z., Prinz I., Dechanet-Merville J., Silva-Santos B., Kuball J. Translating gammadelta (gammadelta) T cells and their receptors into cancer cell therapies. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2020, Vol. 19, no. 3, pp. 169-184.
213. Seifert A.M., List J., Heiduk M., Decker R., von Renesse J., Meinecke A.C., Aust D.E., Welsch T., Weitz J., Seifert L. Gamma-delta T cells stimulate IL-6 production by pancreatic stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2020, Vol. 146, no. 12, pp. 3233-3240.
214. Shah D.K., Zuniga-Pflucker J.C. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 9, pp. 4017-4023.
215. Shibata K., Yamada H., Hara H., Kishihara K., Yoshikai Y. Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 7, pp. 4466-4472.
216. Si F., Liu X., Tao Y., Zhang Y., Ma F., Hsueh E.C., Puram S.V., Peng G. Blocking senescence and tolerogenic function of dendritic cells induced by gammadelta Treg cells enhances tumor-specific immunity for cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer*, 2024, Vol. 12, no. 4, e008219. doi: 10.1136/jitc-2023-008219.
217. Siblany L., Stocker N., Ricard L., Brissot E., Dulery R., Banet A., Sestili S., Belhocine R., Van de Wyngaert Z., Bonnin A., Capes A., Ledraa T., Beurier P., Fadel K., Mohty M., Gaugler B., Malard F. Unconventional T Cells influence clinical outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J. Clin. Immunol.*, 2024, Vol. 44, no. 6, 139. doi: 10.1007/s10875-024-01741-6.
218. Silva-Santos B. Promoting angiogenesis within the tumor microenvironment: the secret life of murine lymphoid IL-17-producing gammadelta T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 7, pp. 1873-1876.
219. Silva-Santos B., Mensurado S., Coffelt S.B. gammadelta T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2019, Vol. 19, no. 7, pp. 392-404.
220. Silva-Santos B., Schamel W.W., Fisch P., Eberl M. gammadelta T-cell conference 2012: close encounters for the fifth time. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 12, pp. 3101-3105.
221. Silva-Santos B., Serre K., Norell H. gammadelta T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 11, pp. 683-691.
222. Simoes A.E., Di Lorenzo B., Silva-Santos B. Molecular determinants of target cell recognition by human gammadelta T Cells. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 929. doi: 10.3389/fimmu.2018.00929.
223. Simon S., Labarriere N. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncoimmunology*, 2017, Vol. 7, no. 1, e1364828. doi: 10.1080/2162402X.2017.1364828.
224. Spada F.M., Grant E.P., Peters P.J., Sugita M., Melian A., Leslie D.S., Lee H.K., van Donselaar E., Hanson D.A., Krensky A.M., Majdic O., Porcelli S.A., Morita C.T., Brenner M.B. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 191, no. 6, pp. 937-948.
225. Spits H., Paliard X., Engelhard V.H., de Vries J.E. Cytotoxic activity and lymphokine production of T cell receptor (TCR)-alpha beta+ and TCR-gamma delta+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones recognizing HLA-A2 and HLA-A2 mutants. Recognition of TCR-gamma delta+ CTL clones is affected by mutations at positions 152 and 156. *J. Immunol.*, 1990, Vol. 144, no. 11, pp. 4156-4162.
226. Suen T.K., Moorlag S., Li W., de Bree L.C.J., Koeken V., Mourits V.P., Dijkstra H., Lemmers H., Bhat J., Xu C.J., Joosten L.A.B., Schultze J.L., Li Y., Placek K., Netea M.G. BCG vaccination induces innate immune memory in gammadelta T cells in humans. *J. Leukoc. Biol.*, 2024, Vol. 115, no. 1, pp. 149-163.
227. Suliman S., Geldenhuys H., Johnson J.L., Hughes J.E., Smit E., Murphy M., Toefy A., Lerumo L., Hopley C., Pienaar B., Chheng P., Nemes E., Hoft D.F., Hanekom W.A., Boom W.H., Hatherill M., Scriba T.J. Bacillus Calmette-

Guerin (BCG) revaccination of adults with latent mycobacterium tuberculosis infection induces long-lived BCG-Reactive NK Cell Responses. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 197, no. 4, pp. 1100-1110.

228. Sumaria N., Grandjean C.L., Silva-Santos B., Pennington D.J. Strong TCRgammadelta signaling prohibits thymic development of IL-17A-secreting gammadelta T cells. *Cell Rep.*, 2017, Vol. 19, no. 12, pp. 2469-2476.

229. Sun H., Sun C., Xiao W. Expression regulation of co-inhibitory molecules on human natural killer cells in response to cytokine stimulations. *Cytokine*, 2014, Vol. 65, no. 1, pp. 33-41.

230. Sutton C.E., Lalor S.J., Sweeney C.M., Brereton C.F., Lavelle E.C., Mills K.H. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*, 2009, Vol. 31, no. 2, pp. 331-341.

231. Talukdar A., Rai R., Aparna Sharma K., Rao D.N., Sharma A. Peripheral Gamma Delta T cells secrete inflammatory cytokines in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Cytokine*, 2018, Vol. 102, pp. 117-122.

232. Tan G., Spillane K.M., Maher J. The Role and Regulation of the NKG2D/NKG2D Ligand System in Cancer. *Biology*, 2023, Vol. 12, no. 8, 1079. doi: 10.3390/biology12081079.

233. Taupin J.L., Halary F., Dechanet J., Peyrat M.A., Ragnaud J.M., Bonneville M., Moreau J.F. An enlarged subpopulation of T lymphocytes bearing two distinct gammadelta TCR in an HIV-positive patient. *Int. Immunol.*, 1999, Vol. 11, no. 4, pp. 545-552.

234. Terzieva A., Dimitrova V., Djerov L., Dimitrova P., Zapryanova S., Hristova I., Vangelov I., Dimova T. Early Pregnancy human decidua is enriched with activated, fully differentiated and pro-inflammatory gamma/delta T cells with diverse TCR repertoires. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 3, 687. doi: 10.3390/ijms20030687.

235. Tieppo P., Papadopoulou M., Gatti D., McGovern N., Chan J.K.Y., Gosselin F., Goetgeluk G., Weening K., Ma L., Dauby N., Cogan A., Donner C., Ginhoux F., Vandekerckhove B., Vermijlen D. The human fetal thymus generates invariant effector gammadelta T cells. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 3, jem.20190580. doi: 10.1084/jem.20190580.

236. Tilloy F., Treiner E., Park S.H., Garcia C., Lemonnier F., de la Salle H., Bendelac A., Bonneville M., Lantz O. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J. Exp. Med.*, 1999, Vol. 189, no. 12, pp. 1907-1921.

237. Tomogane M., Sano Y., Shimizu D., Shimizu T., Miyashita M., Toda Y., Hosogi S., Tanaka Y., Kimura S., Ashihara E. Human Vgamma9Vdelta2 T cells exert anti-tumor activity independently of PD-L1 expression in tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2021, Vol. 573, pp. 132-139.

238. Toulon A., Breton L., Taylor K.R., Tenenhaus M., Bhavsar D., Lanigan C., Rudolph R., Jameson J., Havran W.L. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 4, pp. 743-750.

239. Toutirais O., Cabillic F., Le Friec G., Salot S., Loyer P., Le Gallo M., Desille M., de La Pintiere C.T., Daniel P., Bouet F., Catros V. DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes human hepatocellular carcinoma cell lysis by Vgamma9Vdelta2 T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 5, pp. 1361-1368.

240. Towstyka N.Y., Shiromizu C.M., Keitelman I., Sabbione F., Salamone G.V., Geffner J.R., Trevani A.S., Jancic C.C. Modulation of gammadelta T-cell activation by neutrophil elastase. *Immunology*, 2018, Vol. 153, no. 2, pp. 225-237.

241. Treiner E., Duban L., Bahram S., Radosavljevic M., Wanner V., Tilloy F., Affaticati P., Gilfillan S., Lantz O. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*, 2003, Vol. 422, no. 6928, pp. 164-169.

242. Trowsdale J., Moffett A. NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. *Semin. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 6, pp. 317-320.

243. Tsai C.Y., Liong K.H., Gunalan M.G., Li N., Lim D.S., Fisher D.A., MacAry P.A., Leo Y.S., Wong S.C., Puan K.J., Wong S.B. Type I IFNs and IL-18 regulate the antiviral response of primary human gammadelta T cells against dendritic cells infected with Dengue virus. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 8, pp. 3890-3900.

244. Tuengel J., Ranchal S., Maslova A., Aulakh G., Papadopoulou M., Drissler S., Cai B., Mohsenzadeh-Green C., Soudeyns H., Mostafavi S., van den Elzen P., Vermijlen D., Cook L., Gantt S. Characterization of adaptive-like gammadelta T cells in ugandan infants during primary cytomegalovirus infection. *Viruses*, 2021, Vol. 13, no. 10, 1987. doi: 10.3390/v13101987.

245. Tyler C.J., Doherty D.G., Moser B., Eberl M. Human Vgamma9/Vdelta2 T cells: Innate adaptors of the immune system. *Cell. Immunol.*, 2015, Vol. 296, no. 1, pp. 10-21.

246. Tyler C.J., McCarthy N.E., Lindsay J.O., Stagg A.J., Moser B., Eberl M. Antigen-presenting human gammadelta T cells promote intestinal CD4(+) T cell expression of IL-22 and mucosal release of calprotectin. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 9, pp. 3417-3425.

247. Tyshchuk E.V., Mikhailova V.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. Natural killer cells: origin, phenotype, function. *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1207-1228. doi: 10.15789/1563-0625-nkc-2330.

248. Uehara S., Song K., Farber J.M., Love P.E. Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gammadeltaTCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 1, pp. 134-142.

249. Ullrich R., Schieferdecker H.L., Ziegler K., Riecken E.O., Zeitz M. gamma delta T cells in the human intestine express surface markers of activation and are preferentially located in the epithelium. *Cell. Immunol.*, 1990, Vol. 128, no. 2, pp. 619-627.
250. van Coppennolle S., Vanhee S., Verstichel G., Snauwaert S., van der Spek A., Velghe I., Sinnesael M., Heemskerk M.H., Taghon T., Leclercq G., Plum J., Langerak A.W., Kerre T., Vandekerckhove B. Notch induces human T-cell receptor gammadelta+ thymocytes to differentiate along a parallel, highly proliferative and bipotent CD4 CD8 double-positive pathway. *Leukemia*, 2012, Vol. 26, no. 1, pp. 127-138.
251. van de Walle I., De Smet G., De Smedt M., Vandekerckhove B., Leclercq G., Plum J., Taghon T. An early decrease in Notch activation is required for human TCR-alpha-beta lineage differentiation at the expense of TCR-gammadelta T cells. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 13, pp. 2988-2998.
252. van Rhijn I., Godfrey D.I., Rossjohn J., Moody D.B. Lipid and small-molecule display by CD1 and MR1. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 10, pp. 643-654.
253. von Karstedt S., Montinaro A., Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2017, Vol. 17, no. 6, pp. 352-366.
254. von Lilienfeld-Toal M., Nattermann J., Feldmann G., Sievers E., Frank S., Strehl J., Schmidt-Wolf I.G. Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, Vol. 144, no. 3, pp. 528-533.
255. Walczak H., Degli-Esposti M.A., Johnson R.S., Smolak P.J., Waugh J.Y., Boiani N., Timour M.S., Gerhart M.J., Schooley K.A., Smith C.A., Goodwin R.G., Rauch C.T. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.*, 1997, Vol. 16, no. 17, pp. 5386-5397.
256. Wang C., Lai A.Y., Baiu D.C., Smith K.A., Odorico J.S., Wilson K., Schreiber T., de Silva S., Gumperz J.E. Analysis of butyrophilin-mediated activation of gammadelta T cells from human spleen. *J. Immunol.*, 2024, Vol. 212, no. 2, pp. 284-294.
257. Wang L., Xu M., Wang C., Zhu L., Hu J., Chen S., Wu X., Li B., Li Y. The feature of distribution and clonality of TCR gamma/delta subfamilies T cells in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J. Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2014, 241246. doi: 10.1155/2014/241246.
258. Wegrecki M., Ocampo T.A., Gunasinghe S.D., von Borstel A., Tin S.Y., Reijneveld J.F., Cao T.P., Gully B.S., Le Nours J., Moody D.B., Van Rhijn I., Rossjohn J. Atypical sideways recognition of CD1a by autoreactive gammadelta T cell receptors. *Nat. Commun.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 3872. doi: 10.1038/s41467-022-31443-9.
259. Wen L., Hayday A.C. Gamma delta T-cell help in responses to pathogens and in the development of systemic autoimmunity. *Immunol. Res.*, 1997, Vol. 16, no. 3, pp. 229-241. doi: 10.1007/BF02786392.
260. Wesch D., Glatzel A., Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell. Immunol.*, 2001, Vol. 212, no. 2, pp. 110-117.
261. Wesch D., Hinz T., Kabelitz D. Analysis of the TCR Vgamma repertoire in healthy donors and HIV-1-infected individuals. *Int. Immunol.*, 1998, Vol. 10, no. 8, pp. 1067-1075.
262. Wesch D., Kabelitz D., Oberg H.H. Tumor resistance mechanisms and their consequences on gammadelta T cell activation. *Immunol. Rev.*, 2020, Vol. 298, no. 1, pp. 84-98.
263. Wesch D., Peters C., Oberg H.H., Pietschmann K., Kabelitz D. Modulation of gammadelta T cell responses by TLR ligands. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, no. 14, pp. 2357-2370.
264. Willcox B.E., Willcox C.R. gammadelta TCR ligands: the quest to solve a 500-million-year-old mystery. *Nat. Immunol.*, 2019, Vol. 20, no. 2, pp. 121-128.
265. Willcox C.R., Davey M.S., Willcox B.E. Development and selection of the human Vgamma9Vdelta2(+) T-Cell Repertoire. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1501. doi: 10.3389/fimmu.2018.01501.
266. Willcox C.R., Mohammed F., Willcox B.E. The distinct MHC-unrestricted immunobiology of innate-like and adaptive-like human gammadelta T cell subsets-Nature's CAR-T cells. *Immunol. Rev.*, 2020, Vol. 298, no. 1, pp. 25-46.
267. Willcox C.R., Pitard V., Netzer S., Couzi L., Salim M., Silberzahn T., Moreau J.F., Hayday A.C., Willcox B.E., Dechanet-Merville J. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 9, pp. 872-879.
268. Willcox C.R., Vantourout P., Salim M., Zlatareva I., Melandri D., Zanardo L., George R., Kjaer S., Jeeves M., Mohammed F., Hayday A.C., Willcox B.E. Butyrophilin-like 3 directly binds a human Vgamma4(+) T cell receptor using a modality distinct from clonally-restricted antigen. *Immunity*, 2019, Vol. 51, no. 5, pp. 813-825.e4.
269. Wistuba-Hamprecht K., Martens A., Haehnel K., Geukes Foppen M., Yuan J., Postow M.A., Wong P., Romano E., Khammari A., Dreno B., Capone M., Ascierto P.A., Demuth I., Steinhagen-Thiessen E., Larbi A., Schilling B., Schadendorf D., Wolchok J.D., Blank C.U., Pawelec G., Garbe C., Weide B. Proportions of blood-borne Vdelta1+ and Vdelta2+ T-cells are associated with overall survival of melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur. J. Cancer*, 2016, Vol. 64, pp. 116-126.
270. Woo S.R., Corrales L., Gajewski T.F. Innate immune recognition of cancer. *Annu. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 33, no. 1, pp. 445-474.

271. Wu C., Cao X., Zhang X. VISTA inhibitors in cancer immunotherapy: a short perspective on recent progresses. *RSC Med. Chem.*, 2021, Vol. 12, no. 10, pp. 1672-1679.

272. Wu J., Groh V., Spies T. T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 3, pp. 1236-1240.

273. Wu K., Feng J., Xiu Y., Li Z., Lin Z., Zhao H., Zeng H., Xia W., Yu L., Xu B. Vdelta2 T cell subsets, defined by PD-1 and TIM-3 expression, present varied cytokine responses in acute myeloid leukemia patients. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 80, 106122. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106122.

274. Wu P., Wu D., Ni C., Ye J., Chen W., Hu G., Wang Z., Wang C., Zhang Z., Xia W., Chen Z., Wang K., Zhang T., Xu J., Han Y., Zhang T., Wu X., Wang J., Gong W., Zheng S., Qiu F., Yan J., Huang J. gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity*, 2014, Vol. 40, no. 5, pp. 785-800.

275. Wu X., Yang T., Liu X., Guo J.N., Xie T., Ding Y., Lin M., Yang H. IL-17 promotes tumor angiogenesis through Stat3 pathway mediated upregulation of VEGF in gastric cancer. *Tumour Biol.*, 2016, Vol. 37, no. 4, pp. 5493-5501.

276. Wu Y., Wu W., Wong W.M., Ward E., Thrasher A.J., Goldblatt D., Osman M., Digard P., Canaday D.H., Gustafsson K. Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 9, pp. 5622-5629.

277. Wun K.S., Reijneveld J.F., Cheng T.Y., Ladell K., Uldrich A.P., le Nours J., Miners K.L., McLaren J.E., Grant E.J., Haigh O.L., Watkins T.S., Suliman S., Iwany S., Jimenez J., Calderon R., Tamara K.L., Leon S.R., Murray M.B., Mayfield J.A., Altman J.D., Purcell A.W., Miles J.J., Godfrey D.I., Gras S., Price D.A., Van Rhijn I., Moody D.B., Rossjohn J. T cell autoreactivity directed toward CD1c itself rather than toward carried self lipids. *Nat. Immunol.*, 2018, Vol. 19, no. 4, pp. 397-406.

278. Xi X., Han X., Li L., Zhao Z. Identification of a new tuberculosis antigen recognized by gammadelta T cell receptor. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2013, Vol. 20, no. 4, pp. 530-539.

279. Xi X., Zhang X., Wang B., Wang J., Huang H., Cui L., Han X., Li L., He W., Zhao Z. A novel strategy to screen Bacillus Calmette-Guerin protein antigen recognized by gammadelta TCR. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 4, e18809. doi: 10.1371/journal.pone.0018809.

280. 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.

281. Xu R., Jacques L.C., Khandaker S., Beentjes D., Leon-Rios M., Wei X., French N., Neill D.R., Kadioglu A. TNFR2(+) regulatory T cells protect against bacteremic pneumococcal pneumonia by suppressing IL-17A-producing gammadelta T cells in the lung. *Cell Rep.*, 2023, Vol. 42, no. 2, 112054. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112054.

282. Xu W., Lau Z.W.X., Fulop T., Larbi A. The Aging of gammadelta T Cells. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 5, 1181. doi: 10.3390/cells9051181.

283. Xu Y., Xiang Z., Alnaggar M., Kouakanou L., Li J., He J., Yang J., Hu Y., Chen Y., Lin L., Hao J., Li J., Chen J., Li M., Wu Q., Peters C., Zhou Q., Li J., Liang Y., Wang X., Han B., Ma M., Kabelitz D., Xu K., Tu W., Wu Y., Yin Z. Allogeneic Vgamma9Vdelta2 T-cell immunotherapy exhibits promising clinical safety and prolongs the survival of patients with late-stage lung or liver cancer. *Cell. Mol. Immunol.*, 2021, Vol. 18, no. 2, pp. 427-439.

284. Yan J., Allen S., McDonald E., Das I., Mak J.Y.W., Liu L., Fairlie D.P., Meehan B.S., Chen Z., Corbett A.J., Varelias A., Smyth M.J., Teng M.W.L. MAIT cells promote tumor initiation, growth, and metastases via tumor MR1. *Cancer Discov.*, 2020, Vol. 10, no. 1, pp. 124-141.

285. Yang Q., Liu X., Liu Q., Guan Z., Luo J., Cao G., Cai R., Li Z., Xu Y., Wu Z., Xu M., Zhang S., Zhang F., Yang H., Lin X., Yang M., Wu Y., Gao Y., Flavell R., Hao J., Yin Z. Roles of mTORC1 and mTORC2 in controlling gammadelta T1 and gammadelta T17 differentiation and function. *Cell Death Differ.*, 2020, Vol. 27, no. 7, pp. 2248-2262.

286. Yang X., Zhan N., Jin Y., Ling H., Xiao C., Xie Z., Zhong H., Yu X., Tang R., Ma J., Guan J., Yin G., Wu G., Lu L., Wang J. Tofacitinib restores the balance of gammadeltaTreg/gammadeltaT17 cells in rheumatoid arthritis by inhibiting the NLRP3 inflammasome. *Theranostics*, 2021, Vol. 11, no. 3, pp. 1446-1457.

287. Yao Y.E., Qin C.C., Yang C.M., Huang T.X. gammadeltaT17/gammadeltaTreg cell subsets: a new paradigm for asthma treatment. *J. Asthma*, 2022, Vol. 59, no. 10, pp. 2028-2038.

288. Ye J., Ma C., Hsueh E.C., Eickhoff C.S., Zhang Y., Varvares M.A., Hoft D.F., Peng G. Tumor-derived gammadelta regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 5, pp. 2403-2414.

289. Ye J., Ma C., Wang F., Hsueh E.C., Toth K., Huang Y., Mo W., Liu S., Han B., Varvares M.A., Hoft D.F., Peng G. Specific recruitment of gammadelta regulatory T cells in human breast cancer. *Cancer Res.*, 2013, Vol. 73, no. 20, pp. 6137-6148.

290. Yi Y., He H.W., Wang J.X., Cai X.Y., Li Y.W., Zhou J., Cheng Y.F., Jin J.J., Fan J., Qiu S.J. The functional impairment of HCC-infiltrating gammadelta T cells, partially mediated by regulatory T cells in a TGFbeta- and IL-10-dependent manner. *J. Hepatol.*, 2013, Vol. 58, no. 5, pp. 977-983.
291. Young J.L., Goodall J.C., Beacock-Sharp H., Gaston J.S. Human gamma delta T-cell recognition of *Yersinia enterocolitica*. *Immunology*, 1997, Vol. 91, no. 4, pp. 503-510.
292. Yuan S., Wang C., Zeng Y., Li J., Li W., He Z., Ye J., Li F., Chen Y., Lin X., Xu Y., Yu N., Cai X. Aberrant phenotypes of circulating gammadelta-T cells may be involved in the onset of systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2024, Vol. 33, no. 6, pp. 587-597.
293. Zakeri N., Hall A., Swadling L., Pallett L.J., Schmidt N.M., Diniz M.O., Kucykowicz S., Amin O.E., Gander A., Pinzani M., Davidson B.R., Quaglia A., Maini M.K. Characterisation and induction of tissue-resident gamma delta T-cells to target hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 1372. doi: 10.1038/s41467-022-29012-1.
294. Zarin P., Wong G.W., Mohtashami M., Wiest D.L., Zuniga-Pflucker J.C. Enforcement of gammadelta-lineage commitment by the pre-T-cell receptor in precursors with weak gammadelta-TCR signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, no. 15, pp. 5658-5663.
295. Zhang M., Ge T., Zhang Y., La X. Identification of MARK2, CCDC71, GATA2, and KLRC3 as candidate diagnostic genes and potential therapeutic targets for repeated implantation failure with antiphospholipid syndrome by integrated bioinformatics analysis and machine learning. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1126103. doi: 10.3389/fimmu.2023.1126103.
296. Zhang Y., Cado D., Asarnow D.M., Komori T., Alt F.W., Raulet D.H., Allison J.P. The role of short homology repeats and TdT in generation of the invariant gamma delta antigen receptor repertoire in the fetal thymus. *Immunity*, 1995, Vol. 3, no. 4, pp. 439-447.
297. Zhang Z., Yang C., Li L., Zhu Y., Su K., Zhai L., Wang Z., Huang J. «gammadeltaT Cell-IL17A-neutrophil» axis drives immunosuppression and confers breast cancer resistance to high-dose Anti-VEGFR2 Therapy. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 699478. doi: 10.3389/fimmu.2021.699478.
298. Zhao Y., Niu C., Cui J. Gamma-delta (gammadelta) T cells: friend or foe in cancer development? *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, no. 1, 3. doi: 10.1186/s12967-017-1378-2.
299. Zhou J., Kang N., Cui L., Ba D., He W. Anti-gammadelta TCR antibody-expanded gammadelta T cells: a better choice for the adoptive immunotherapy of lymphoid malignancies. *Cell. Mol. Immunol.*, 2012, Vol. 9, no. 1, pp. 34-44.
300. Zhu X., Sakamoto S., Ishii C., Smith M.D., Ito K., Obayashi M., Unger L., Hasegawa Y., Kurokawa S., Kishimoto T., Li H., Hatano S., Wang T.H., Yoshikai Y., Kano S.I., Fukuda S., Sanada K., Calabresi P.A., Kamiya A. Dectin-1 signaling on colonic gammadelta T cells promotes psychosocial stress responses. *Nat. Immunol.*, 2023, Vol. 24, no. 4, pp. 625-636.
301. Zingoni A., Molfetta R., Fionda C., Soriani A., Paolini R., Cippitelli M., Cerboni C., Santoni A. NKG2D and Its Ligands: “One for All, All for One”. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 476. doi: 10.3389/fimmu.2018.00476.

Автор:

Соколов Д.И. — д.б.н., доцент, заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Author:

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Leading Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 18.12.2024

Отправлена на доработку 27.12.2024

Принята к печати 23.03.2025

Received 18.12.2024

Revision received 27.12.2024

Accepted 23.03.2025

ТРАНСКРИПТОМИКА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК В ИССЛЕДОВАНИИ РАКА ПРОСТАТЫ

Акрамова Э.Р., Шарифьянова Ю.В., Гайнуллина Д.Х.,
Шмелькова П.Н., Калимуллина Л.И., Павлов В.Н., Еникеева К.И.

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Резюме. Цель исследования – проанализировать современные достижения в области транскриптомных технологий, ориентированных на анализе единичных клеток с акцентом на их применение в исследовании опухолевого микроокружения и иммунного ландшафта при раке предстательной железы (РПЖ). Были проанализированы научные базы данных PubMed, Medline, Web of Science, Embase. РПЖ – злокачественное новообразование, зависящее от гормонов андрогенного происхождения, которое поражает мочеполовую систему мужчин. Данные показывают, что у мужчин младше 40 лет РПЖ встречается крайне редко, в то время как наибольшее количество случаев наблюдается в возрастной группе от 50 до 70 лет. На сегодняшний день РПЖ является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний среди мужчин и представляет собой одну из основных причин смертности от рака. Согласно данным Глобальной онкологической обсерватории (GCO), в 2022 году по всему миру было зарегистрировано 1 467 854 новых случая РПЖ, что привело к 397 430 летальным исходам, связанным с этим заболеванием. РПЖ занимает четвертое место по заболеваемости и второе по смертности среди всех онкологических заболеваний у мужчин. В России РПЖ занимает вторую позицию по заболеваемости среди всех видов рака у мужчин, с зарегистрированными 52 712 случаями на 2022 год, и четвертую по смертности, с 14 635 случаями. Глубокое понимание механизмов патогенеза и прогрессирования РПЖ имеет ключевое значение для эффективной диагностики и разработки методов лечения. В обзоре представлен анализ транскриптомных технологий в разрешении единичных клеток в изучении клеточной гетерогенности при РПЖ. Также подробно представлена методология анализа, охарактеризована клеточная гетерогенность при РПЖ, описаны современные исследования в области транскриптомики единичных клеток при раке простаты, а также обозначены перспективные направления применения полученных результатов в клинической практике. Результаты исследований в этой области имеют значительный потенциал для использования в качестве прогностических, так и диагностических маркеров опухолевых процессов. Таким образом, работа подчеркивает важность изучения клеточной гетерогенности для совершенствования методов диагностики и терапии рака простаты. Технологии исследования транскриптома единичных клеток предоставляют уникальные возможности для углубленного понимания молекулярных и клеточных меха-

Адрес для переписки:

Акрамова Элина Ринатовна
Институт урологии и клинической онкологии
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
450083, Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа,
ул. Шафиева, 2, корп. 5.
Тел.: 8 (996) 256-98-57.
E-mail: erakramova@bashgmu.ru

Address for correspondence:

Elina R. Akramova
Institute of Urology and Clinical Oncology,
Bashkir State Medical University
2 Shafiev St, Bldg 5
Ufa, Republic of Bashkortostan
450083 Russian Federation
Phone: +7 (996) 256-98-57.
E-mail: erakramova@bashgmu.ru

Образец цитирования:

Э.Р. Акрамова, Ю.В. Шарифьянова, Д.Х. Гайнуллина,
П.Н. Шмелькова, Л.И. Калимуллина, В.Н. Павлов,
К.И. Еникеева «Транскриптомика единичных клеток
в исследовании рака простаты» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 935-944.
doi: 10.15789/1563-0625-SCT-3214

© Акрамова Э.Р. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.R. Akramova, Yu.V. Sharifyanova, D.Kh. Gainullina,
P.N. Shmelkova, L.I. Kalimullina, V.N. Pavlov, K.I. Enikeeva
“Single cell transcriptomics in prostate cancer research”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2025, Vol. 27, no. 5, pp. 935-944.
doi: 10.15789/1563-0625-SCT-3214

© Akramova E.R. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-SCT-3214

низмов, лежащих в основе иммунного ответа при онкологических заболеваниях. Полученные данные могут стать основой для развития новых направлений в фундаментальной иммунологии, разработки инновационных терапевтических стратегий и внедрения персонализированного подхода к лечению рака простаты, что открывает перспективы для повышения эффективности терапии.

Ключевые слова: рак, простата, транскриптомика, секвенирование, scRNAseq, РНК, ДНК

SINGLE CELL TRANSCRIPTOMICS IN PROSTATE CANCER RESEARCH

Akramova E.R., Sharifyanova Yu.V., Gainullina D.Kh., Shmelkova P.N., Kalimullina L.I., Pavlov V.N., Enikeeva K.I.

Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Abstract. The objective of our study was to review current advances in transcriptome technologies focused on single cell analysis with emphasis on their application in the study of the tumor microenvironment and immune landscape in prostate cancer (PCa). PubMed, Medline, Web of Science, and Embase scientific databases were analyzed. PCa is an androgen hormone-dependent malignant neoplasm that affects the male genitourinary system. Evidence shows that, in men under 40 years of age, PCa is extremely rare, while the highest number of cases occurs in the 50 to 70 age group. Today, PCa is one of the most common cancers among men and represents one of the leading causes of cancer-related deaths. According to the Global Cancer Observatory (GCO), there were 1,467,854 new cases of cancer worldwide in 2022, resulting in 397,430 deaths associated with the disease. PCa ranks fourth in terms of incidence and second in terms of mortality among all cancers in men. In Russia, PCa ranks second in incidence among all cancers in men, with 52,712 cases registered as of 2022, and fourth in mortality, with 14,635 cases. A thorough understanding of the mechanisms of the pathogenesis and progression of PCa is key to effective diagnosis and treatment development. This review presents an analysis of transcriptome-based techniques in single-cell resolution for studying cellular heterogeneity in PCa. The methodology of the analysis is also presented in detail, cellular heterogeneity in PCa is characterized, current research in the field of single cell transcriptomics in PCa is described, and promising applications of the results in clinical practice are also outlined. The results of research in this area have significant potential for use as both prognostic and diagnostic markers of tumor processes. Thus, the work emphasizes the importance of studying cellular heterogeneity to improve the methods of PCa diagnostics and therapy. Technologies for studying the transcriptome of single cells provide unique opportunities for in-depth understanding of the molecular and cellular mechanisms underlying the immune response in cancer. The data obtained may become the basis for the development of new directions in fundamental immunology, the development of innovative therapeutic strategies and a personalized approach to prostate cancer treatment, which opens prospects for improving the efficiency of treatment.

Keywords: cancer, prostate, transcriptomics, sequencing, single-cell RNA, RNA, DNA

Источник финансирования: программа стратегического академического лидерства БГМУ «Приоритет-2030».

Введение

На сегодняшний день рак предстательной железы (РПЖ) является самым распространенным злокачественным заболеванием среди мужчин во всем мире и одной из основных причин их смертности от рака [32]. РПЖ представляет собой клинически разнообразное заболевание. У некоторых пациентов выявляются опухоли низкого

риска, тогда как у других диагностируется заболевание высокого риска с вероятностью рецидива, даже после применения современных методов лечения, таких как робот-ассистированная радикальная простатэктомия (РПЭ), андроген-депривационная и лучевая терапии.

Существует необходимость в более глубоком понимании и изучении биологии микроокружения РПЖ [13].

Технологии экспрессии генов на уровне отдельных клеток сделали возможным анализ тысяч клеток в одном образце, что позволило глуб-

же понять гетерогенность опухолевых клеток и сложную систему образования микроокружения злокачественной опухоли предстательной железы.

Для установления прогрессии злокачественной опухоли простаты важно иметь представление о конкретных типах клеток, образующих рак простаты. Решение этой задачи оказалось возможным в результате разработки и применения технологий секвенирования РНК (RNA-seq) единичных клеток (scRNA-seq) или отдельных ядер – эффективного инструмента для понимания роли клеток разных типов в прогрессировании рака простаты. Эти технологии позволяют представить распределение клеток конкретного типа, анализируя экспрессию генов в контексте тканевой структуры или крови.

Методы и подходы в транскриптомике единичных клеток

РНК-секвенирование единичных клеток включает несколько этапов [3, 4, 14, 16, 24, 31, 33].

1. Получение изолированных отдельных клеток

Изолирование одиночных клеток биологического образца заключается в разделении клеток или их ядер в пространстве. Для этого обычно используют клеточные сортеры, такие как CytoFLEX SRT (США), MACSQuant® Tyto (Германия), S3e Cell Sorter – Bio-Rad (США) от различных коммерческих компаний [28, 37] или систему 10X Genomics (США), принцип работы которой заключается в том, что клетки связываются по одной с особыми гранулами в специальном микрофлюидном устройстве, а полученные комплексы затем упаковываются в отдельные масляные капли для дальнейшего анализа [41].

Также одним из решений изолирования чистых популяций клеток является микродиссекция с лазерным захватом. Этот подход позволяет работать с образцами фиксированной ткани или культурами фиксированных клеток, используя прямую визуализацию под микроскопом [8]. Микроскоп, оснащенный лазером, позволяет аккуратно иссекать выбранные участки ткани, которые затем собираются в пробирку. Изолированные фрагменты могут быть использованы для дальнейшего анализа, включая исследования РНК, ДНК и протеомные исследования.

2. Подготовка и амплификация нуклеиновых кислот

Состоит из несколько этапов:

1. Изолированные единичные клетки подвергаются лизису для максимального извлечения молекул РНК.

2. Для специфического анализа полиаденилированных мРНК и предотвращения захвата

рибосомной РНК обычно применяются поли(Т)-праймеры. Анализ неполиаденилированных мРНК, как правило, более сложен и требует специальных протоколов [10, 30].

3. После этого поли(Т)-праймированная мРНК преобразуется в комплементарную ДНК (кДНК) с использованием обратной транскриптазы. В зависимости от протокола scRNA-seq к праймерам для обратной транскрипции могут добавляться дополнительные нуклеотидные последовательности, такие как адаптеры для NGS-платформ, уникальные молекулярные идентификаторы для точной маркировки отдельных молекул мРНК и последовательности, сохраняющие информацию о клеточном происхождении [17].

4. Затем небольшие объемы кДНК амплифицируются либо с помощью ПЦР, либо, в некоторых случаях, с использованием транскрипции *in vitro*.

5. Подготовка библиотек, заключающаяся в маркировке нуклеотидным штрих-кодом для сохранения информации о клеточном происхождении [6].

3. Высокопроизводительное секвенирование

Следующим этапом после изоляции клеток является подготовка РНК к секвенированию.

Этот процесс включает в себя получение кДНК и ее расщепление на считываемые фрагменты, что похоже на стандартную подготовку к NGS-секвенированию, но с некоторыми изменениями. Ключевым отличием является необходимость индивидуальной маркировки каждой клетки, так как кДНК всех выделенных клеток затем необходимо объединить для достижения высокой производительности. Поэтому в каждую лунку планшета или на каждую гранулу, используемую в капельной технологии изоляции клеток, добавляют уникальные олигонуклеотидные метки, синтезированные комбинаторным методом. После получения большого объема считываний фрагментов целевой кДНК, программное обеспечение позволяет распознавать подмножества этих считываний (ридов), относящиеся к единичным клеткам [42].

4. Анализ данных

Данные экспериментов scRNA-seq имеют ряд особенностей, которые требуют специальных подходов к биоинформатике.

После проведения предварительной обработки данных, направленной на извлечение биологической информации и описание исследуемой биологической системы, осуществляется комплексный анализ. Этот анализ включает несколько ключевых этапов [26]:

1. Кластеризация клеток и построение траекторий дифференцировки — выявление групп клеток на основе схожести их транскриптомных профилей и определение путей их дифференцировки в процессе развития. В результате формируются группы клеток, объединенные общими паттернами экспрессии генов, что служит основой для дальнейшего биологического анализа [15, 26]. Кластеризация данных позволяет не только идентифицировать уже известные типы клеток, характеризующиеся специфическими генами-маркерами, но и выявлять новые, ранее не описанные клеточные популяции. Этот подход открывает возможности для более глубокого понимания клеточного разнообразия и обнаружения уникальных биологических особенностей, которые могут быть упущены при использовании традиционных методов анализа. Кластеризация клеток представляет собой один из ключевых этапов анализа single cell данных и часто служит первым значимым промежуточным результатом.

Анализ дифференциальной экспрессии генов — идентификация генов, уровень экспрессии которых значимо различается между различными клеточными популяциями, что позволяет выявить молекулярные механизмы, лежащие в основе их функциональных различий. Анализ дифференциальной экспрессии позволяет выявить, как различные клеточные популяции изменяют свою транскрипционную активность в ответ на конкретные экспериментальные условия. Это помогает понять молекулярные механизмы, лежащие в основе клеточных реакций, и выделить ключевые гены, которые могут играть важную роль в этих процессах.

2. Исследование межклеточных взаимодействий — изучение коммуникации между клетками, включая анализ сигнальных путей и молекулярных сетей, которые регулируют клеточное поведение и координацию в системе.

3. Оценка динамики клеточного цикла — мониторинг изменений в прохождении клетками различных фаз клеточного цикла, что позволяет понять закономерности пролиферации и дифференцировки в контексте изучаемой биологической системы.

Таким образом, данные подходы не только углубляют понимание генной регуляции, но и связывают ее с клеточной гетерогенностью, что позволяет получить более полную картину биологических процессов на уровне отдельных клеток [26].

Клеточная гетерогенность при раке простаты

В последние годы метод секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq) находит все более широкое применение в различных научных дис-

циплинах, таких как иммунология, молекулярная биология и онкология.

Метод scRNA-seq открыл новые горизонты для одновременного анализа тысяч клеток в образце, что позволило выявить гетерогенность и сложность опухолевых клеток [1, 21, 35]. Этот подход также предоставляет уникальные возможности для изучения регуляции, эволюции и взаимодействий отдельных клеток [9, 19, 35, 36, 38]. Понимание клеточной коммуникации и эволюции является важным шагом к осознанию роли различных компонентов опухоли и ее микроокружения, а также к формированию сети их взаимодействия [18].

Метод scRNA-seq становится все более популярным, его использование в исследованиях РПЖ ограничивается не только циркулирующими опухолевыми клетками, но и иммортализованными клеточными линиями [22]. Применение scRNA-seq в изучении гетерогенности РПЖ позволяет создавать подробные клеточные транскрипционные профили, что в дальнейшем может помочь предсказать сигнальные пути и прояснить процессы дифференцировки, функций и развития клеток [18].

Опухолевая ткань предстательной железы состоит из раковых клеток, стромальных клеток (включая фибробласты, связанные с опухолью — cancer-associated fibroblasts (CAF), гладкомышечных клеток, эндотелиальных клеток и перицитов) и иммунных клеток (миелоидные клетки: CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки, NK-клетки и В-клетки). CAF обычно расположены на границах опухоли. Гладкомышечные клетки, перициты и эндотелиальные клетки участвуют в формировании микрососудов. Микроокружение опухоли (ТМЕ) характеризуется иммуносупрессией: увеличением миелоидных клеток, снижением Т-клеток, активацией Treg, увеличением количества обедненных CD56DIM NK-клеток и активацией В-клеток [22].

На данный момент актуальной задачей является углубленное изучение микроокружения опухоли предстательной железы. Это направление может открыть новые перспективы для идентификации терапевтических мишеней и разработки эффективных методов лечения [32].

L. de Vargas Roditi et al. выявили в микроокружении опухоли простаты пять фенотипов Т-клеток (CD3⁺, CD45⁺) и пять фенотипов макрофагов (CD68⁺, CD45⁺). Также были обнаружены три гранулоцитарных (CD24⁺/CD15⁺), один стромальный (SMA⁺, S100A4⁺), один В-клеточный (CD20⁺) и один эндотелиальный (CD31⁺) метакластеры. Эти метакластеры со-

держали разнообразные клетки, характерные для большинства пациентов [5].

Исследование М.С. Haffner показало, что большинство метастатических поражений при mCRPC (метастатическим кастрационно-резистентным РПЖ, являющимся агрессивной формой заболевания, которое не поддается хирургическому вмешательству и гормонотерапии и распространяющееся за пределы предстательной железы) сохраняют дифференцировку по линии предстательной железы, характеризующийся экспрессией маркеров эпителия предстательной железы: AR (андрогеновый рецептор), NKX3.1 и PSA (простатический специфический антиген) [2, 11, 20]. Однако терапия может вызывать изменения клеточной дифференцировки, приводящие к резистентности [11]. У пациентов с mCRPC наблюдалась потеря экспрессии AR и усиление нейроэндокринной дифференцировки, что указывает на фенотипическую пластичность опухолей [2]. Эти данные позволяют классифицировать mCRPC на подгруппы, определяемые экспрессией AR, его генов-мишеней и нейроэндокринных маркеров [11].

Исследование, проведенное В. Dong et al., показало, что повторная кластеризация эпителиальных клеток из каждой опухоли в сочетании с анализом тепловой карты позволяет выделить субкластеры эпителиальных клеток в каждом образце. Эти субкластеры характеризовались высокой экспрессией маркеров люминальных клеток, таких как KRT8 и KRT18. В то же время экспрессия генов, связанных с базальными клетками, нейроэндокринными (NE) и андрогенными (AR) сигналами, демонстрировала заметную гетерогенность как внутри опухоли, так и между различными опухолями [7].

Single cell и рак простаты: текущие исследования

В исследовании В. Zhang et al. было показано, что базальные и промежуточные эпителиальные клетки экспрессируют гены, связанные с прогрессированием РПЖ, включая гены *PIGR*, *MMP7* и *AGR2*. Анализ продемонстрировал, что люминальные эпителиальные клетки могут служить предшественниками, дифференцируясь в базальные или промежуточные. Онкогенные пути, такие как катаболизм липидов и метаболизм жирных кислот, активны в этих клетках. Также обнаружено их тесное взаимодействие с нервными клетками, что может способствовать периневральной инвазии при РПЖ [39].

У. Ou et al. исследовали девять генов, ассоциированных с макрофагами M2 (*SMOC2*, *PLPP1*, *HES1*, *STMN1*, *GPR160*, *ABCG1*, *MAZ*, *MYC*, *EPSCAM*), как потенциальные прогностические

маркеры. Используя данные RNA-seq из когорты TCGA-PRAD (496 опухолевых и 52 нормальных образцов), полученные из информационного портала Genomic Data Commons (GDC) (<https://portal.gdc.cancer.gov>) в атласе Tumor Cancer Genomic Atlas (TCGA), а также наборы данных GSE54691 и GSE116918. Авторы провели анализ дифференциально экспрессируемых генов, иммунной и стромальной оценки, а также изучили чистоту опухоли и инфильтрацию иммунных клеток. Дополнительно был проанализирован транскриптом единичных клеток из GSE137829. Результаты подтвердили, что макрофаги M2 способствуют пролиферации, инвазии и миграции клеток РПЖ [27].

J.C. Siefert et al. провели транскриптомный анализ единичных клеток резидентных макрофагов РПЖ человека, в результате чего были выявлены три различные популяции в пораженной простате. Удивительно, но не было обнаружено значительных различий между макрофагами, выделенными из опухолевых и неопухолевых участков образцов, полученных при простатэктомии. Хотя в опухолевой ткани были идентифицированы маркеры – CD68, PLAC8, CD2017, связанные с классическими фенотипами макрофагов M1 и M2, они не оказались ключевыми факторами, определяющими уникальные подтипы макрофагов [31].

W. Liu et al. с помощью scRNA-seq выделили кластер клеток, ассоциированных с фибробластами опухоли (CAF), состоящий из 783 клеток и определили 183 маркерных гена. Анализ межклеточной коммуникации выявил активное взаимодействие CAF с иммунными клетками. На основе 7 генов (*ASPEN*, *AEBP1*, *ALDH1A1*, *BGN*, *COL1A1*, *PAGE4*, *RASD1*) разработана модель прогноза безрецидивной выживаемости (bRFS), валидированная на четырех когортах с использованием bulk РНК-секвенирования. Группа высокого риска по этой модели характеризовалась иммуносупрессивным микроокружением с повышенным уровнем M2-макрофагов, сниженным количеством плазматических и CD8⁺Т-клеток и меньшей эффективностью иммунотерапии. Неконтролируемая кластеризация выявила три подтипа CAF: миофибробластоподобные (myCAFs), иммунные и воспалительные (iCAF) и антигенпрезентирующие (apCAFs) [23].

Исследование I. Heidegger et al. с использованием scRNA-seq выявило 27 подтипов клеток, включая эндотелиальные клетки с артериальными, венозными и ангиогенными сигналами. Артериальные опухолевые эндотелиальные клетки (ОЭК) экспрессируют ген *CXCL12* на высоком уровне по сравнению с другими клетками

опухолевого микроокружения рака простаты, что связано с негативной прогностической ролью. Установлено взаимодействие *CXCL12* с рецептором *CXCR4* на ангиогенных клетках. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* подтвердили роль *CXCL12* как мишени: ингибитор *CXCR4*-AMD3100 снижал плотность и количество сосудов, пролиферацию и миграцию ОЭК. Результаты указывают на *CXCR4/CXCL12* как потенциальную мишень для подавления ангиогенеза при РПЖ [12].

Z. Sun et al. в 2024 году предоставили новые идеи для борьбы с РПЖ и улучшения клинических результатов, тем самым открывая новые возможности для индивидуальных альтернатив лечения. Была разработана инновационная прогностическая модель, заключающаяся в модификации гистонов и высокой прогностической эффективностью гена *YWHAN* в качестве возможных диагностических и терапевтических биомаркеров РПЖ [34].

Перспективы и прикладное значение исследований транскриптома единичных клеток при раке простаты

Методы транскриптомики применяют для создания атласов экспрессии генов в любых тканевых компартментах РПЖ, описывающих дорожную карту прогрессирования опухоли качественным и количественным образом [25].

Секвенирование РНК единичных клеток в исследованиях рака может быть использован для идентификации редких субпопуляций и циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК); в определении гетерогенности опухоли и механизмов, связанных с онкогенезом, прогрессированием, метастазированием, эволюцией, рецидивом и резистентностью к терапии [40, 43].

Интегрируя клиническую патологическую информацию и данные секвенирования единичных клеток, можно расшифровать новые диагностические и прогностические биомаркеры и потенциально терапевтически значимые типы или состояния клеток [29].

Например, в исследовании J.C. Siefert et al. генетические маркеры, специфично ассоциированные с каждым кластером макрофагов, были

использованы для создания генетической сигнатуры, которая оказалась тесно связанной как с безрецидивной, так и с метастазированной выживаемостью. Эти результаты подчеркивают важность тканеспецифичных подтипов макрофагов в опухолевом микроокружении для прогрессирования РПЖ и демонстрируют полезность профилирования транскриптомики единичных клеток в образцах опухолей человека как стратегии для разработки генетических классификаторов, способствующих прогнозированию течения заболевания у пациентов [31].

Предсказать эффективно прогноз при РПЖ, а также послужить индикатором для иммунотерапии позволяет сигнатура, полученная от САФ (кластер клеток, ассоциированных с фибробластами опухоли), стимулирующие ремоделирование внеклеточного матрикса, рост раковых клеток и ангиогенез, что приводит к ухудшению прогноза заболевания. Проведенное исследование также выявило три субпопуляции САФ с различными функциями в контексте РПЖ [23].

Выводы

Исследования транскриптома единичных клеток (scRNA-seq) при РПЖ открывают новые перспективы для понимания опухолевой биологии и разработки персонализированных подходов к лечению. Кроме того, scRNA-seq позволяет анализировать гетерогенность клеток в пределах одной опухоли, выявляя различные подтипы раковых клеток, которые могут иметь разные молекулярные профили и иммунный ответ на лечение, а также может помочь выявить механизмы резистентности к терапии, позволяя исследовать, как отдельные единичные клетки адаптируются к лечению и какие молекулярные пути активируются. Анализ транскриптома единичных клеток может привести к открытию новых биомаркеров для диагностики и прогноза РПЖ. Сравнение транскриптомов клеток на разных стадиях заболевания может дать представление о том, как рак прогрессирует и какие молекулярные изменения происходят в ходе этого процесса.

Список литературы / References

1. Azizi E., Carr A.J., Plitas G., Cornish A.E., Konopacki C., Prabhakaran S., Nainys J., Wu K., Kisieliovas V., Setty M., Choi K., Fromme R.M., Dao P., McKenney P.T., Wasti R.C., Kadaveru K., Mazutis L., Rudensky A.Y., Pe'er D. Single-Cell Map of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. *Cell*, 2018, Vol. 174, no. 5, pp. 1293-1308.
2. Beltran H., Hruszkewycz A., Scher H.I., Hildesheim J., Isaacs J., Yu E.Y., Kelly K., Lin D., Dicker A., Arnold J., Hecht T., Wicha M., Sears R., Rowley D., White R., Gulley J.L., Lee J., Diaz Meco M., Small E.J., Shen M., Knudsen K., Goodrich D.W., Lotan T., Zoubeidi A., Sawyers C.L., Rudin C.M., Loda M., Thompson T., Rubin M.A.,

Tawab-Amiri A., Dahut W., Nelson P.S. The role of lineage plasticity in prostate cancer therapy resistance. *Clin. Cancer Res.*, 2019, Vol. 25, no. 23, pp. 6916-6924.

3. Cao Y., Zhu S., Yu B., Yao C. Single-cell RNA sequencing for traumatic spinal cord injury. *FASEB J.*, 2022, Vol. 36, no. 12, e22656. doi: 10.1096/fj.202200943R.

4. Chen G., Ning B., Shi T. Single-cell RNA-Seq technologies and related computational data analysis. *Front. Genet.*, 2019, Vol. 10, 317. doi: 10.3389/fgene.2019.00317.

5. De Vargas Roditi L., Jacobs A., Rueschoff J.H., Bankhead P., Chevrier S., Jackson H.W., Hermanns T., Fankhauser C.D., Poyet C., Chun F., Rupp N.J., Tschaebunin A., Bodenmiller B., Wild P.J. Single-cell proteomics defines the cellular heterogeneity of localized prostate cancer. *Cell Rep. Med.*, 2022, Vol. 3, no. 4, 100604. doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100604.

6. Donati G. The niche in single-cell technologies. *Immunol. Cell Biol.*, 2016, Vol. 94, no. 3, pp. 250-255.

7. Dong B., Miao J., Wang Y., Luo W., Ji Z., Lai H., Zhang M., Cheng X., Wang J., Fang Y., Zhu H.H., Chua C.W., Fan L., Zhu Y., Pan J., Wang J., Xue W., Gao W.Q., Single-cell analysis supports a luminal-neuroendocrine transdifferentiation in human prostate cancer. *Commun. Biol.*, 2020, Vol. 3, no. 1, 778. doi: 10.1038/s42003-020-01476-1.

8. Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Smith P.D., Chuaqui R.F., Zhuang Z., Goldstein S.R., Weiss R.A., Liotta L.A. Laser capture microdissection. *Science*, 1996, Vol. 274, no. 5, pp. 998-1001.

9. Enikeeva K., Rafikova G., Sharifyanova Y., Mulyukova D., Vanzin A., Pavlov V. Epigenetics as a Key Factor in Prostate Cancer. *Adv. Biol.*, 2024, Vol. 8, no. 5, e2300520. doi: 10.1002/adbi.202300520.

10. Fan X., Zhang X., Wu X., Guo H., Hu Y., Tang F., Huang Y. Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos. *Genome Biol.*, 2015, Vol. 16, no. 1, 148. doi: 10.1186/s13059-015-0706-1.

11. Haffner M.C., Zwart W., Roudier M.P., True L.D., Nelson W.G., Epstein J.I., De Marzo A.M., Nelson P.S., Yegnasubramanian S. Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.*, 2021, Vol. 18, no. 2, pp. 79-92.

12. Heidegger I., Fotakis G., Offermann A., Goveia J., Daum S., Salcher S., Noureen A., Timmer-Bosscha H., Schäfer G., Walenkamp A., Perner S., Beatovic A., Moisse M., Plattner C., Krogsdam A., Haybaeck J., Sopper S., Thaler S., Keller M.A., Klocker H., Trajanoski Z., Wolf D., Pircher A. Comprehensive characterization of the prostate tumor microenvironment identifies CXCR4/CXCL12 crosstalk as a novel antiangiogenic therapeutic target in prostate cancer. *Mol. Cancer*, 2022, Vol. 21, no. 1, 132. doi: 10.1186/s12943-022-01597-7.

13. Held-Warmkessel J. Treatment of advanced prostate cancer. *Semin. Oncol. Nurs.*, 2001, Vol. 17, no. 2, pp. 118-128.

14. Hwang B., Lee J.H., Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp. Mol. Med.*, 2018, Vol. 50, no. 8, pp. 1-14.

15. Islam S., Zeisel A., Joost S., La Manno G., Zajac P., Kasper M., Lönnerberg P., Linnarsson S. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat. Methods*, 2014, Vol. 11, no. 2, pp. 163-166.

16. Jovic D., Liang X., Zeng H., Lin L., Xu F., Luo Y. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview. *Clin. Transl. Med.*, 2022, Vol. 12, no. 3, e694. doi: 10.1002/ctm2.694.

17. Kivioja T., Vähärautio A., Karlsson K., Bonke M., Enge M., Linnarsson S., Taipale J. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat. Methods.*, 2011, Vol. 9, no. 1, pp. 72-74.

18. Koukourakis I.M., Platoni K., Kouloulis V., Arelaki S., Zygogianni A. Prostate cancer stem cells: biology and treatment implications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 19, 14890. doi: 10.3390/ijms241914890

19. Kumar M.P., Du J., Lagoudas G., Jiao Y., Sawyer A., Drummond D.C., Lauffenburger D.A., Raue A. Analysis of Single-Cell RNA-Seq Identifies Cell-Cell Communication Associated with Tumor Characteristics. *Cell Rep.*, 2018, Vol. 25, no. 6, pp. 1458-1468.

20. Labrecque M.P., Coleman I.M., Brown L.G., True L.D., Kollath L., Lakely B., Nguyen H.M., Yang Y.C., da Costa R.M.G., Kaipainen A., Coleman R., Higano C.S., Yu E.Y., Cheng H.H., Mostaghel E.A., Montgomery B., Schweizer M.T., Hsieh A.C., Lin D.W., Corey E., Nelson P.S., Morrissey C. Molecular profiling stratifies diverse phenotypes of treatment-refractory metastatic castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Invest.*, 2019, Vol. 129, no. 10, pp. 4492-4505.

21. Lambrechts D., Wauters E., Boeckx B., Aibar S., Nittner D., Burton O., Bassez A., Decaluwé H., Pircher A., van den Eynde K., Weynand B., Verbeken E., De Leyn P., Liston A., Vansteenkiste J., Carmeliet P., Aerts S., Thienpont B., Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nat. Med.*, 2018, Vol. 24, no. 8, pp. 1277-1289.

22. Li Z., Li Z., Luo Y., Chen W., Fang Y., Xiong Y., Zhang Q., Yuan D., Yan B., Zhu J. Application and new findings of scRNA-seq and ST-seq in prostate cancer. *Cell Regen.*, 2024, Vol. 13, no. 1, 23. doi: 10.1186/s13619-024-00206-w.

23. Liu W., Wang M., Wang M., Liu M. Single-cell and bulk RNA sequencing reveal cancer-associated fibroblast heterogeneity and a prognostic signature in prostate cancer. *Medicine*, 2023, Vol. 102, no. 32, e34611. doi: 10.1097/MD.00000000000034611.

24. Liu Y., Liang S., Wang B., Zhao J., Zi X., Yan S., Dou T., Jia J., Wang K., Ge C. Advances in single-cell sequencing technology and its application in poultry science. *Genes*, 2022, Vol. 13, no. 12, 2211. doi: 10.3390/genes13122211.
25. Liudahl S.M., Betts C.B., Sivagnanam S., Morales-Oyarvide V., da Silva A., Yuan C., Hwang S., Grossblatt-Wait A., Leis K.R., Larson W., Lavoie M.B., Robinson P., Dias Costa A., Väyrynen S.A., Clancy T.E., Rubinson D.A., Link J., Keith D., Horton W., Tempero M.A., Vonderheide R.H., Jaffee E.M., Sheppard B., Goecks J., Sears R.C., Park B.S., Mori M., Nowak J.A., Wolpin B.M., Coussens L.M. Leukocyte heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma: phenotypic and spatial features associated with clinical outcome. *Cancer Discov*, 2021, Vol. 11, no. 8, pp. 2014-2031.
26. Luecken M.D., Theis F.J. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.*, 2019, Vol. 15, no. 6, e8746. doi: 10.15252/msb.20188746.
27. Ou Y., Xia C., Ye C., Liu M., Jiang H., Zhu Y., Yang D. Comprehensive scRNA-seq analysis to identify new markers of M2 macrophages for predicting the prognosis of prostate cancer. *Ann. Med.*, 2024, Vol. 56, no. 1, 2398195. doi: 10.1080/07853890.2024.2398195.
28. Picelli S., Björklund Å.K., Faridani O.R., Sagasser S., Winberg G., Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat. Methods*, 2013, Vol. 10, no. 11, pp. 1096-1108.
29. Rozenblatt-Rosen O., Regev A., Oberdoerffer P., Nawy T., Hupalowska A., Rood J.E., Ashenberg O., Cerami E., Coffey R.J., Demir E., Ding L., Esplin E.D., Ford J.M., Goecks J., Ghosh S., Gray J.W., Guinney J., Hanlon S.E., Hughes S.K., Hwang E.S., Iacobuzio-Donahue C.A., Jané-Valbuena J., Johnson B.E., Lau K.S., Lively T., Mazzilli S.A., Pe'er D., Santagata S., Shalek A.K., Schapiro D., Snyder M.P., Sorger P.K., Spira A.E., Srivastava S., Tan K., West R.B., Williams E.H. Human Tumor Atlas Network. The human tumor atlas network: charting tumor transitions across space and time at single-cell resolution. *Cell*, 2020, Vol. 181, no. 2, pp. 236-249.
30. Sheng K., Cao W., Niu Y., Deng Q., Zong C. Effective detection of variation in single-cell transcriptomes using MATQ-seq. *Nat. Methods*, 2017, Vol. 14, no. 3, pp. 267-270.
31. Siefert J.C., Cioni B., Muraro M.J., Alshalalfa M., Vivié J., van der Poel H.G., Schoots I.G., Bekers E., Feng F.Y., Wessels L.F.A., Zwart W., Bergman A.M. The prognostic potential of human prostate cancer-associated macrophage subtypes as revealed by single-cell transcriptomics. *Mol. Cancer Res.*, 2021, Vol. 19, no. 10, pp. 1778-1791.
32. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.*, 2020, Vol. 70, no. 1, pp. 7-30.
33. Slovin S., Carissimo A., Panariello F., Grimaldi A., Bouché V., Gambardella G., Cacchiarelli D. Single-cell RNA sequencing analysis: A step-by-step overview. *Methods Mol. Biol.*, 2021, Vol. 2284, pp. 343-365.
34. Sun Z., Wang J., Zhang Q., Meng X., Ma Z., Niu J., Guo R., Tran L.J., Zhang J., Liu Y., Ye F., Ma B. Coordinating single-cell and bulk RNA-seq in deciphering the intratumoral immune landscape and prognostic stratification of prostate cancer patients. *Environ. Toxicol.*, 2024, Vol. 39, no. 2, pp. 657-668.
35. Tirosh I., Izar B., Prakadan S.M., Wadsworth M.H. 2nd, Treacy D., Trombetta J.J., Rotem A., Rodman C., Lian C., Murphy G., Fallahi-Sichani M., Dutton-Regester K., Lin J.R., Cohen O., Shah P., Lu D., Genshaft A.S., Hughes T.K., Ziegler C.G., Kazer S.W., Gaillard A., Kolb K.E., Villani A.C., Johannesson C.M., Andreev A.Y., Van Allen E.M., Bertagnolli M., Sorger P.K., Sullivan R.J., Flaherty K.T., Frederick D.T., Jané-Valbuena J., Yoon C.H., Rozenblatt-Rosen O., Shalek A.K., Regev A., Garraway L.A. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*, 2016, Vol. 352, no. 6282, pp. 189-196.
36. Trapnell C., Cacchiarelli D., Grimsby J., Pokharel P., Li S., Morse M., Lennon N.J., Livak K.J., Mikkelsen T.S., Rinn J.L. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat. Biotechnol.*, 2014, Vol. 32, no. 4, pp. 381-386.
37. Valihrach L., Androvic P., Kubista M. Platforms for single-cell collection and analysis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 3, 807. doi: 10.3390/ijms19030807.
38. Vento-Tormo R., Efremova M., Botting R.A., Turco M.Y., Vento-Tormo M., Meyer K.B., Park J.E., Stephenson E., Polański K., Goncalves A., Gardner L., Holmqvist S., Henriksson J., Zou A., Sharkey A.M., Millar B., Innes B., Wood L., Wilbrey-Clark A., Payne R.P., Ivarsson M.A., Lisgo S., Filby A., Rowitch D.H., Bulmer J.N., Wright G.J., Stubbington M.J.T., Haniffa M., Moffett A., Teichmann S.A. Single-cell reconstruction of the early maternal-fetal interface in humans. *Nature*, 2018, Vol. 563, no. 7731, pp. 347-353.
39. Zhang B., Wang S., Fu Z., Gao Q., Yang L., Lei Z., Shi Y., Le K., Xiong J., Liu S., Zhang J., Su J., Chen J., Liu M., Niu B. Single-cell RNA sequencing reveals intratumoral heterogeneity and potential mechanisms of malignant progression in prostate cancer with perineural invasion. *Front. Genet.*, 2023, Vol. 13, 1073232. doi: 10.3389/fgene.2022.1073232.
40. Zhang L., Li Z., Skrzypczynska K.M., Fang Q., Zhang W., O'Brien S.A., He Y., Wang L., Zhang Q., Kim A., Gao R., Orf J., Wang T., Sawant D., Kang J., Bhatt D., Lu D., Li C.M., Rapaport A.S., Perez K., Ye Y., Wang S., Hu X., Ren X., Ouyang W., Shen Z., Egen J.G., Zhang Z., Yu X. Single-cell analyses inform mechanisms of myeloid-targeted therapies in colon cancer. *Cell*, 2020, Vol. 181, no. 2, pp. 442-459.e29.
41. Zheng G.X., Terry J.M., Belgrader P., Ryvkin P., Bent Z.W., Wilson R., Ziraldo S.B., Wheeler T.D., McDermott G.P., Zhu J., Gregory M.T., Shuga J., Montesclaros L., Underwood J.G., Masquelier D.A., Nishimura S.Y., Schnall-Levin M., Wyatt P.W., Hindson C.M., Bharadwaj R., Wong A., Ness K.D., Beppu L.W., Deeg H.J.,

McFarland C., Loeb K.R., Valente W.J., Ericson N.G., Stevens E.A., Radich J.P., Mikkelsen T.S., Hindson B.J., Bielas J.H. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, 14049. doi: 10.1038/ncomms14049.

42. Ziegenhain C., Vieth B., Parekh S., Reinius B., Guillaumet-Adkins A., Smets M., Leonhardt H., Heyn H., Hellmann I., Enard W. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods. *Mol. Cell*, 2017, Vol. 65, no. 4, pp. 631-643.

43. Zilionis R., Engblom C., Pfirschke C., Savova V., Zemmour D., Saatcioglu H.D., Krishnan I., Maroni G., Meyerovitz C.V., Kerwin C.M., Choi S., Richards W.G., De Rienzo A., Tenen D.G., Bueno R., Levantini E., Pittet M.J., Klein A.M. Single-cell transcriptomics of human and mouse lung cancers reveals conserved myeloid populations across individuals and species. *Immunity*, 2019, Vol. 50, no. 5, pp. 1317-1334.

Авторы:

Акрямова Э.Р. — лаборант-исследователь лаборатории иммунологии Института урологии и клинической онкологии; магистрант Института развития образования по направлению «Биология» ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Шарифьянова Ю.В. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии Института урологии и клинической онкологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Гайнуллина Д.Х. — лаборант-исследователь лаборатории иммунологии Института урологии и клинической онкологии; студент педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Шмелькова П.Н. — лаборант-исследователь лаборатории иммунологии Института урологии и клинической онкологии; студент педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Authors:

Akramova E.R., Laboratory Research Assistant, Laboratory of Immunology, Institute of Urology and Clinical Oncology; Master's Student in Biology, Institute for Education Development, Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Sharifyanova Yu.V., Junior Researcher, Laboratory of Immunology, Institute of Urology and Clinical Oncology, Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Gainullina D.Kh., Laboratory Research Assistant, Laboratory of Immunology, Institute of Urology and Clinical Oncology; Student, Pediatric Faculty, Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Shmelkova P.N., Laboratory Research Assistant, Laboratory of Immunology, Institute of Urology and Clinical Oncology; Student, Pediatric Faculty, Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Калимуллина Л.И. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии Института урологии и клинической онкологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Павлов В.Н. — д.м.н., профессор, академик РАН, ректор ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Еникеева К.И. — к.фарм.н., заведующая лабораторией иммунологии Института урологии и клинической онкологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Kalimullina L.I., Junior Researcher, Laboratory of Immunology, Institute of Urology and Clinical Oncology, Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Pavlov V.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Rector, Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Enikeeva K.I., PhD (Pharmacy), Head, Laboratory of Immunology, Institute of Urology and Clinical Oncology, Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Поступила 25.03.2025

Отправлена на доработку 29.04.2025

Принята к печати 25.06.2025

Received 25.03.2025

Revision received 29.04.2025

Accepted 25.06.2025

РОЛЬ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ Т-КЛЕТОК В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Горшков Г.С.¹, Быков А.С.¹, Свитич О.А.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва,
Россия

Резюме. Современные исследования в области иммунологии указывают на немаловажное значение механических факторов в формировании иммунного ответа. Механоиммунология, как новое междисциплинарное направление, изучает влияние механических стимулов на поведение иммунных клеток, в частности Т-лимфоцитов. Доказано, что жесткость микросреды, механические взаимодействия с внеклеточным матриксом, а также изменение мембранного натяжения способны модулировать активацию, миграцию, пролиферацию и эффекторные функции Т-клеток. Оптимальная механическая среда способствует повышению Т-клеточной активности, в то время как увеличение жесткости микросреды, изменение свойств внеклеточного матрикса, могут снижать их функциональные возможности. Известные молекулы такие, как Piezo 1, интегрины, Yes-ассоциированный белок, являются ключевыми регуляторами механотрансдукции в иммунных клетках. Постепенное развитие представлений об их участии в иммунном ответе свидетельствует о значительной сопряженности их модулирующих влияний, формирующих систему, обеспечивающую комплексное реагирование на механические стимулы. Механомодуляция приводит к изменению внутриклеточной среды, выступая в качестве фактора, определяющего метаболический профиль Т-клеток. Кроме того, исследования показывают, что механочувствительные сигнальные пути могут участвовать в регуляции межклеточных взаимодействий и адаптивного иммунного ответа, что предоставляет широкие возможности для модификации иммунных реакций. Понимание механизмов механотрансдукции открывает перспективы для разработки новых терапевтических стратегий. Механические сигналы могут быть использованы для повышения эффективности CAR-T-клеток за счет оптимизации их активации, пролиферации и инфильтрации в опухолевую ткань, что особенно важно в лечении злокачественных новообразований, в частности солидных опухолей, где CAR-T-клеточная терапия сталкивается с серьезными ограничениями. Механоиммунологические подходы рассматриваются также в контексте лечения аутоиммунных заболеваний. Предполагается, что механочувствительные пути могут регулировать избыточную активацию Т-клеток, препятствуя

Адрес для переписки:

Горшков Григорий Сергеевич
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ
119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2.
Тел.: 8 (917) 132-09-10.
E-mail: gorshkov.grigoriy@mail.ru

Address for correspondence:

Grigory S. Gorshkov
I. Sechenov First Moscow State Medical University
(Sechenov University)
8 Trubetskaya St, Bldg 2
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (917) 132-09-10.
E-mail: gorshkov.grigoriy@mail.ru

Образец цитирования:

Г.С. Горшков, А.С. Быков, О.А. Свитич «Роль механических свойств Т-клеток в формировании иммунного ответа» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 945-960.
doi: 10.15789/1563-0625-ROM-3215

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

For citation:

G.S. Gorshkov, A.S. Bykov, O.A. Svitich "Role of mechanical properties of T cells in shaping the immune response", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 5, pp. 945-960.
doi: 10.15789/1563-0625-ROM-3215

© Gorshkov G.S. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-ROM-3215

развитию аутоиммунных процессов и патологической гиперактивации иммунной системы. Не исключено создание эффективных методик предотвращения реакций трансплантат-против-хозяина и отторжения трансплантата, а также методов лечения хронических инфекций. Спектр возможных фармакологических методик включает в себя применение активаторов и ингибиторов Piezo 1, интегринов и Yes-ассоциированного белка. Разрабатываются и биоинженерные подходы. Одним из перспективных направлений является использование наномоторов для *ex vivo* активации Т-клеток, что может повысить эффективность клеточных иммунных технологий в лечении различных заболеваний. Кроме того, настройка иммунных реакций с использованием механических свойств может позволить направленно регулировать иммунный ответ в зависимости от специфики патологического процесса.

Ключевые слова: иммунология, механоиммунология, Т-клетка, механочувствительность, механотрансдукция, CAR-T-клеточная терапия, наномоторы

ROLE OF MECHANICAL PROPERTIES OF T CELLS IN SHAPING THE IMMUNE RESPONSE

Gorshkov G.S.^a, Bykov A.S.^a, Svitich O.A.^{a, b}

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

^b I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. Recent studies in immunology highlight the critical role of mechanical factors in shaping the immune response. Mechanoimmunology, being an emerging interdisciplinary field, concerns the influence of mechanical stimuli on immune cell behavior, in particular, T lymphocytes. Microenvironment stiffness, mechanical interactions with the extracellular matrix, and changes in membrane tension are able to modulate T cell activation, migration, proliferation, and effector functions. An optimal mechanical environment enhances T cell activity, whereas increased stiffness of the microenvironment and alterations in extracellular matrix properties may reduce their functional capacity. Key molecules such as Piezo 1, integrins, and Yes-associated protein serve as central regulators of mechanotransduction in immune cells. The expanding knowledge on their role in immune interactions suggests a high degree of interconnected modulation, resulting into a system of coordinated responses to mechanical stimuli. Mechanomodulation alters the intracellular environment, acting as a determinant of metabolic profile of T cell populations. Moreover, these studies presume that mechanosensitive signaling pathways may regulate intercellular interactions and adaptive immune responses, offering broad opportunities for modifying immune reactions. Understanding the mechanotransduction mechanisms provides new prospects for the development of novel therapeutic strategies. Mechanical signals may be leveraged to enhance the efficacy of CAR-T cells by optimizing their activation, proliferation, and infiltration into tumor tissue, which is particularly important in treating malignant neoplasms, especially solid tumors, where CAR-T cell therapy faces significant limitations. Mechanoimmunological approaches are also being explored in the context of autoimmune disease treatment. It is hypothesized that mechanosensitive pathways may regulate excessive T cell activation, preventing autoimmune processes and pathological hyperactivation of the immune system. Moreover, development of effective methods for preventing graft-versus-host disease and transplant rejection, as well as strategies for treating chronic infections, remains an important goal. The spectrum of potential pharmacological interventions includes the use of activators and inhibitors of Piezo 1, integrins, and Yes-associated protein. Bioengineering approaches are also being actively developed. One promising direction involves the use of nanomotors for *ex vivo* T cell activation, which may improve the efficacy of cellular immunotherapy in various diseases. Furthermore, fine-tuning of immune responses via mechanical properties of the cells could provide a precise regulation of immune activity based on the specific characteristics of pathological processes.

Keywords: immunology, mechanoimmunology, T cell, mechanosensitivity, mechanotransduction, CAR-T cell therapy, nanomotors

Введение

Традиционный иммунологический подход рассматривает иммунный ответ как результат взаимодействия между клетками посредством системы сигнальных молекул и рецепторов, инициирующих активацию иммунокомпетентных клеток в ответ на чужеродные агенты. Согласно этому подходу, иммунная система реагирует на инфекционные агенты и другие угрозы организма путем активации клеток, что приводит к целенаправленной защите от патогенов. Подобная модель, однако, не вполне полноценно способна объяснить ряд наблюдаемых аутоиммунных процессов [7, 85], парадоксальные иммунологические явления при онкологии, например, отсутствие ответа на Т-клеточную терапию при солидных опухолях [11, 57, 76], феноменальное реагирование иммунных клеток на микросреду [38, 52, 71] и ряд других свойственных иммунной системе эффектов. Постепенное развитие смежных областей привело к пониманию того, что инициация и регуляция биохимических путей может осуществляться и посредством механических стимулов [13, 41, 60]. Клетки способны ощущать механическую жесткость своего окружения и собственных компонентов, изменяя ряд клеточных функций [37]. Кроме того, немаловажную роль в клеточном взаимодействии играют физические силы, создаваемые клетками при помощи биохимических каскадов [37, 83]. Рассмотрение подобной двунаправленной регуляторной системы в иммунологическом контексте послужило основанием к созданию особой области иммунологии, именуемой механоиммунологией [2, 12, 17, 48, 92, 96].

Клетки адаптивного иммунитета занимают центральное место в иммунном ответе. Они не только обеспечивают специфическое распознавание антигенов, но и формируют долговременную иммунную память. Особое место в адаптивном иммунном ответе занимают Т-лимфоциты. Различные популяции Т-клеток обеспечивают выполнение своей специфичной функции. Уникальность Т-клеток заключается в их способности распознавать антигены в комплексе с молекулами МНС, что обеспечивает высокую точность иммунного ответа [1]. Широкое распространение получают биоинженерные методики, связанные с Т-клетками, в частности CAR-Т-клеточная терапия, основанная на генетической модификации Т-клеток *ex vivo* [15, 81].

Накопленные за последние годы данные указывают на значительную роль механической регуляции в Т-клеточном ответе [2, 48, 82]. Исследования показали, что механические сигналы могут модулировать миграцию, пролиферацию и дифференцировку Т-клеток, а также изменять

их способность к распознаванию антигенов. Несмотря на это механоиммунология, особенно в контексте Т-лимфоцитов, является сравнительно новой областью, ряд фундаментальных и прикладных медицинских вопросов в которой остается недостаточно изученным. Так, например, не до конца понятно место механической регуляции иммунных функций в патологических процессах при заболеваниях. До сих пор нет попыток устанавливать корреляции, которые подтверждали бы имеющиеся предположения. Кроме того, нет разработанных терапевтических методик, которые бы использовали новейшие фармакологические достижения с целью механорегуляции Т-клеточного ответа. Однако прогресс в данной области, видимый уже сейчас, позволяет утверждать, что понимание реагирования Т-клеток на механические стимулы может открыть новые горизонты в иммунотерапии и лечении аутоиммунных и онкологических заболеваний [34, 84, 104].

В связи с ростом числа исследований, проводимых в данной области, возникает необходимость систематизации имеющихся знаний. Предпринятые попытки, как правило, не рассматривают механоиммунологический вопрос с медико-фармакологической точки зрения [2, 12, 48, 66, 70]. Детальный анализ, включающий обзор существующих исследований, посвященных влиянию механических факторов на Т-лимфоциты, анализ молекулярных и клеточных механизмов, через которые механические стимулы влияют на функцию Т-клеток, исследование роли механических факторов в патогенезе различных заболеваний, а также обзор перспективных биоинженерных и фармакологических методик, способных оказывать влияние на восприятие механических стимулов, способствовал бы более быстрому развитию области и направил бы исследования в сторону изучения не только фундаментальных, но и прикладных аспектов механической регуляции.

Целью данного обзора является систематизация современных данных о механоиммунологии Т-лимфоцитов, анализ ключевых механорегуляторных путей и их влияния на иммунный ответ. В работе рассматриваются основные механосенсорные свойства, вовлеченные в функционирование Т-клеток, а также их медицинская значимость. Отдельное место отведено анализу возможных фармакологических методик.

Механизмы механочувствительности

Рассмотрение механоиммунологии Т-лимфоцитов следует начать с краткого описания механизмов механочувствительности. Принято выделять следующие ключевые молекулы, участвующие в реакциях механосенсинга.

Piezo 1 — это механочувствительный ионный канал, который активируется в ответ на механи-

ческое растяжение мембраны. Он представляет собой крупный трансмембранный белок, формирующий тримерную структуру, которая реагирует на деформацию липидного бислоя. При механическом воздействии конформационные изменения в структуре Piezo 1 приводят к открытию канала и входу ионов кальция в клетку. Это инициирует каскад сигнальных событий, что, в свою очередь, приводит к изменению клеточной пролиферации, миграции и дифференцировки [18, 36, 97].

Интегрины представляют собой трансмембранные рецепторы, связывающие внеклеточный матрикс с актиновым цитоскелетом клетки. Эти белки формируют фокальные контакты, которые участвуют в механотрансдукции – процессе преобразования механических сигналов в биохимические каскады. При механическом напряжении или изменении жесткости внеклеточного матрикса интегрины активируются, что приводит к рекрутированию белков фокального адгезионного комплекса, таких как талин и винкулин. Это запускает сигнальные пути за счет активации киназы фокальной адгезии FAK и RhoA, регулируя клеточную адгезию, миграцию и активацию. Интегрины также взаимодействуют с другими механочувствительными путями, например с YAP/TAZ, что обеспечивает интеграцию механических сигналов с различными клеточными программами [32, 43, 106].

YAP (Yes-ассоциированный белок; механосенсор, механотрансдуктор) – это транскрипционный кофактор, играющий важную роль в механочувствительной регуляции генной экспрессии. Он активируется в ответ на механические сигналы, такие как натяжение клеточного цитоскелета, жесткость внеклеточного матрикса и межклеточные взаимодействия. В неактивном состоянии YAP удерживается в цитоплазме за счет фосфорилирования киназами Hippo-пути, такими как LATS1/2. При механическом растяжении или увеличении клеточного напряжения этот тормозящий механизм ослабляется, и YAP транслоцирует в ядро, где он взаимодействует с факторами транскрипции TEAD, активируя экспрессию генов, регулирующих пролиферацию, выживание и дифференцировку клеток [9, 44, 67].

Актин играет центральную роль в механочувствительности, обеспечивая структурную поддержку клетки и реагируя на механические сигналы путем перестройки цитоскелета. Полимеризация и деполимеризация актина регулирует клеточную жесткость, миграцию и передачу механических сигналов к ядру. Актиновый цитоскелет взаимодействует с интегринными, Piezo 1 и YAP, формируя механическую систему, которая регулирует клеточный ответ на внешние воздей-

ствия. Изменения в организации актина могут модулировать активацию механочувствительных путей, что критически важно для ответа на механические стимулы [54, 77].

Активация Т-клеток напряжением сдвига

Находясь в организме, Т-клетки постоянно подвергаются воздействию напряжения сдвига, возникающего в кровотоке и лимфатической системе [3, 21, 22, 62]. Современные исследования показывают, что Т-клетки способны реагировать на сдвиговое напряжение [19, 31, 74, 95]. Понимание механизмов взаимодействия потоков жидкости и путей механочувствительности является ключевым фактором для объяснения наблюдаемых реакций.

Обнаружено, что Т-клетки способны дополнительно усиливать CD3/CD28-опосредованную активацию в ответ на действие напряжения сдвига жидкости [31, 74]. Исследования показали, что в клетках линии Jurkat и в человеческих CD4⁺, а также CD8⁺Т-лимфоцитах при одностороннем воздействии постоянным и равномерным напряжением сдвига жидкости 5 дин/см² усиливается приток ионов кальция через механочувствительные каналы Piezo 1. Предполагается, что, выступая в качестве вторичного мессенджера, ион кальция активирует кальциевый канал, инициируя фосфорилирование ZAP70. При этом усиливается экспрессия транскрипционных факторов NF-κB, NFAT и AP-1, а также увеличивается продукция цитокинов IL-2, TNFα, IFNγ [31, 74]. Изучение динамики подобного стимула в течение 10 дней позволило установить, что максимум активации NF-κB наблюдался на 3-й день и даже на 7-й день уровень фосфорилирования NF-κB оставался значительно выше в клетках, подвергавшихся воздействию сдвигового напряжения [74]. Немаловажно, что сразу после подобной сочетанной стимуляции происходило значимое повышение уровня фосфорилирования c-Fos, а также усиление ядерной транслокации NFATc1. Исследователи также отмечают, что уровень усиления переноса NFATc1 в ядро даже при воздействии только напряжением сдвига жидкости сопоставим с усилением соответствующей величины при стимуляции антителами к CD3/CD28 в статических условиях. Кроме того, воздействие напряжением сдвига жидкости значимо усиливало пролиферацию Т-клеток, экспрессию CD107, гранзима В и перфорина в CD8⁺Т-лимфоцитах [74].

Изначально предполагалось, что данное свойство может лечь в основу объяснения синдрома высвобождения цитокинов у пациентов с гипертензией, а также явления усугубления аутоиммунных заболеваний у данной группы пациентов [31]. Однако в более позднем исследовании, основываясь на непостоянстве напряжения

сдвига крови и данных о невозможности активации Т-клеток прерывистым потоком кальция, был сделан вывод о нецелесообразности такой идеи [74]. Между тем аналогичный механизм активации, но под действием сил динамического давления частиц, наблюдается, по всей видимости, в исследованиях *ex vivo* активации Т-клеток под действием наномоторов [19, 95]. При этом очевидно, что движение наномотора представляет собой неравномерный процесс, а значит в данных работах наблюдалась активация Т-клеток меняющимся механическим стимулом. Косвенно это подтверждает предположение об участии напряжения сдвига крови в аутоиммунных процессах при гипертензии. Кроме того, активно обсуждается применение данного свойства для активации Т-клеток *ex vivo* при Т-клеточных терапиях как возможного варианта дешевого повышения их эффективности [31, 74]. Список гипотетических приложений можно продолжать. Сюда, например, могут входить и реакция трансплантат-против-хозяина, и отторжение трансплантата, при которых локальное уменьшение кровотока теоретически способно увеличить вероятность приживления.

Стоит отметить, что до сих пор остается непонятной физиологическая роль указанного механизма. В представленных статьях часто наблюдалась значимое увеличение уровня активации различных факторов даже при воздействии только напряжением сдвига [74]. Можно предположить, что подобным путем в циркулирующих биологических жидкостях создается фон активированных Т-клеток. Помимо создания фона функционирующих Т-клеток, активация посредством сдвигового напряжения, очевидно, упрощает включение клеточного ответа в биологических жидкостях. Это может означать, что попадание антигенов в кровь, лимфу и другие движущиеся физиологические жидкости распознается организмом как более серьезная угроза по сравнению с их нахождением в периферических тканях. Тем не менее по-прежнему неясен рабочий диапазон напряжений сдвига Piezo 1.

Механозависимость миграции

Миграция Т-лимфоцитов является ключевым процессом в поддержании иммунного гомеостаза и эффективного иммунного ответа. Она включает несколько видов, которые регулируются различными молекулярными механизмами. Интегрин-зависимая миграция характеризуется взаимодействием интегринов с внеклеточным матриксом и связана ретроградным потоком актина [6, 33, 68, 72, 79, 87]. Она представляет собой ключевой процесс, при помощи которого реализуется в том числе и проникновение Т-клеток через эндотелий [75]. В последние годы установле-

на возможность перемещения Т-лимфоцитов без прикрепления к внеклеточному матриксу. Оно получило название интегрин-независимой миграции [5, 45, 69, 93]. Исследователи отмечают, что данные два механизма движения не являются взаимоисключающими и могут реализовываться одновременно.

Удалось установить, что интегрин-зависимая хемокиновая миграция Т-лимфоцитов является механозависимым процессом [49]. Было показано, что при стимуляции хемокином происходит фосфорилирование FAK, приводящее к формированию фокальных контактов. Наблюдаемое далее локальное увеличение натяжения мембраны обуславливает активацию ионного канала Piezo 1 и приток ионов кальция внутрь Т-клеток. Активация кальпаина способствует полимеризации F-актина и привлечению интегринов к переднему краю. Интегриновая индукция запускает PI3K/Akt-сигнальный путь, активирующий Rho GTPазу. Увеличивается полимеризация F-актина, и за счет актомиозиновых сокращений F-актин ретроградно перемещается в заднюю часть клетки, что позволяет клеткам двигаться по градиенту хемокинов вперед. В недавнем исследовании было также показано снижение миграционной способности Т-клеток в ориентированном пространстве по сравнению с геометрически неправильным, что, возможно, связано с воздействием внеклеточного матрикса на мембрану Т-клеток [73]. Логично предположить, что в геометрически неправильном пространстве сила натяжения мембраны выше, что облегчает открытие канала Piezo 1.

Подобное участие механизма механотрансдукции в Т-клеточной миграции открывает новые возможности для объяснения снижения миграционной способности Т-клеток при ряде патологических состояний, связанных с изменением плотности их окружения. Так, например, при хронических инфекциях и заболеваниях, а также при опухолевых процессах возможно изменение внеклеточного матрикса, что усложняет образование фокальных контактов и миграцию Т-лимфоцитов в очагах воспаления и возле опухолевых клеток [11, 52, 91].

Кроме того, участие Piezo 1 в миграции Т-лимфоцитов позволяет использовать данный канал в качестве инновационной терапевтической мишени. Например, при лечении аутоиммунных заболеваний возможно снижение миграции Т-клеток за счет разобщения внешних и внутренних активационных процессов посредством ингибирования Piezo 1. Усиление миграционной способности Т-клеток за счет активации Piezo 1 гипотетически может способствовать улучшению проникновения Т-клеток внутрь опухоли

и, как следствие, повышению эффективности Т-клеточных терапий. Уже существует ряд фармакологических методик, направленных на указанный канал, однако до сих пор их применение в рамках иммунологического контекста не обсуждалось [42].

Не очень ясны также механизмы интегрин-независимой миграции. Исследования показали, что Т-клетки сохраняют способность к миграции даже в отсутствие фокальных контактов. Ключевую роль в подобном виде перемещения играет, по-видимому, геометрия окружения [69]. Нельзя исключать возможность участия в данном процессе Piezo 1, так как различная пространственная топология, очевидно, влияет на величину поверхностного натяжения. В одном из недавних исследований было установлено, что на суспензированных эритроцитах увеличение угла наклона микропипетки приводило к сильному входу кальция через Piezo 1, коррелирующему с потоком F-актина в область притока кальция [88]. Вероятно, могут существовать неустановленные механизмы сопряжения активации Piezo 1 и перемещения F-актина, которые, в частности, обуславливают и миграционную способность неадгезированных Т-клеток в геометрически нестандартном окружении.

Жесткость микросреды

Жесткость внеклеточного матрикса существенно меняется в различных тканях и при различных состояниях [20, 26, 27, 51, 56, 59]. При сравнении здоровых легких и костного мозга жесткость изменяется от 0,4 кПа до 7-10 кПа соответственно [59]. Между нормальными и опухолевыми тканями она может варьировать от 0,5 кПа до 48 кПа [56].

Оказалось, что Т-клетки способны воспринимать жесткость микросреды. Многие исследователи сходятся во мнении, что ключевую роль в восприятии жесткости микросреды играет YAP. В мягкой среде YAP1, фосфорилированный по Ser397, связывается с IQGAP1 в цитоплазме, что способствует взаимодействию IQGAP1 и фосфорилированного NFAT1, в результате чего NFAT1 не перемещается в ядро [55]. В жесткой же среде уровень фосфорилирования YAP1 по Ser397 снижен [55]. Уменьшается взаимодействие IQGAP1 и NFAT1, что дает возможность кальциневрину дефосфорилировать остатки серина и треонина NFAT1, влияя на его транслокацию в ядро [55]. Подобная регуляция при переходе от жесткого окружения к мягкому хорошо согласуется со снижением активации Т-клеток. Было показано, что в активированных CD8⁺Т-клетках, увеличивается экспрессия YAP1, что, по всей видимости, способствует ограничению активации цитотоксических Т-лимфоцитов для предотвращения чрезмерных эффектов [46]. При нокауте YAP1 в

этих клетках происходило увеличение экспрессии воспалительных цитокинов и повышалась цитотоксичность. Кроме того, YAP1 влияет на Treg-клетки. В условиях дефицита YAP1 наблюдается снижение иммуносупрессивной функции Treg-лимфоцитов [4, 61]. Индукция YAP1 усиливает активацию сигнальных путей, опосредованных TGF- β и SMAD в Treg-клетках [61].

В недавнем исследовании обнаруживается еще один интересный результат. Ингибирование YAP1 приводило к более выраженной активации Т-клеток в геометрически неправильном пространстве по сравнению с ориентированным [73]. Особенно ярко это проявлялось в изменении профиля таких маркеров, как PD1, CD44, CD69, а также цитокинов IL-2 и IFN γ . Примечательно, что в свете обсуждений о возможности участия Piezo 1 в активации YAP1 [30, 103] наблюдаемое явление гипотетически может свидетельствовать о превалирующей роли оси Piezo 1-YAP1 в Т-клеточной регуляции по сравнению с другими активирующими YAP механизмами. Косвенно это указывает на участие Piezo 1 в сигнальном пути Hippo, однако не исключено существование других механизмов механочувствительности, задействующих YAP.

Не менее важным аспектом подобного вида регуляции иммунного ответа является YAP-индуцированное метаболическое перепрограммирование активированных Т-клеток [4, 55]. При нокауте YAP наблюдается увеличение гликолитической способности, усиление митохондриального дыхания, увеличение скорости потребления кислорода, резервной дыхательной способности.

Стоит, однако, отметить, что YAP-опосредованная активация Т-клеток в жестком микроокружении влияет, скорее на пролиферацию и дифференцировку, чем на исполнение цитотоксических функций. В солидных опухолях, несмотря на жесткое микроокружение цитотоксические функции Т-лимфоцитов снижены, что связано, вероятно, с ухудшением презентации антигена [25, 56].

Обсуждение данного механизма проводится в основном в контексте воспалительных и аутоиммунных процессов. Предполагается, что ингибирование цитотоксических функций при переходе от воспаленного микроокружения к невоспаленному защищает ткани от аутоиммунитета, опосредованного Т-клетками [17]. Так, например, на модели мышей было показано, что более быстрое развитие диабета 1-го типа наблюдается у мышей с отсутствием YAP в Т-клетках, который по предположению исследователей, реагируя на мягкую микросреду должен подавлять аутоиммунный процесс [55].

Использование субстратов различной жесткости открывает также возможности для акти-

вазии Т-клеток *ex vivo*, что может способствовать повышению эффективности Т-клеточных терапий [34, 99]. Использование ингибиторов и активаторов YAP в лабораторных условиях и в качестве лекарственных препаратов также может служить методикой модуляции Т-клеточного ответа.

Иммунный синапс

Цитотоксические Т-лимфоциты образуют иммунные синапсы с клетками-мишенями для их уничтожения за счет «окутывания» антиген-презентирующих клеток [65, 66, 70]. Цитолитические факторы, такие как перфорины и гранзимы, высвобождаются непосредственно в синапс, что усиливает уничтожение клеток-мишеней и минимизирует побочный ущерб за счет ограничения диффузии гранзимов и перфоринов. Миозин II и динеин совместно способствуют антероградному транспорту литических гранул [10, 16], причем первый управляет антероградным движением литических гранул от задней части клетки к ядру, а последний отвечает за транспортировку литических гранул вокруг ядра и к синапсу [58, 65].

Было установлено, что синапсы цитотоксических Т-клеток можно разделить на две зоны: периферический ободок, в котором преобладает положительная средняя кривизна, и внутреннюю часть, характеризующуюся отрицательно изогнутыми углублениями, разделенными плоскими или положительно изогнутыми гребнями и рельефами [23]. Имеющиеся данные позволяют утверждать, что усиление цитотоксической функции Т-лимфоцитов связано с волнообразным контуром центральной части иммунологических синапсов из-за образования ряда локальных выпуклостей, которые более чувствительны к перфорины [14, 23].

За счет актомиозина формируются силы, прикладываемые к клетке-мишени, в результате чего увеличивается натяжение мембраны, что способствует образованию пор перфорины, доступу гранзима к цитоплазме клетки-мишени и уничтожению клетки-мишени [65, 66, 70]. Эти силы увеличивают образование пор перфорины также и за счет увеличения натяжения и изменения топографии мембраны целевой клетки. Возникающие противоположно силы натяжения мембраны Т-лимфоцита увеличиваются от периферии к центру и, по всей видимости, достигают максимума в центре, где и происходит высвобождение цитолитических факторов.

Несмотря на данные об активации цитотоксических Т-лимфоцитов за счет напряжения сдвига, реализуемой через Piezo 1 [74], в недавнем исследовании было показано, что при ингибировании данного белкового канала наблюдается увеличение тянущей силы и снижение ремоделирования актина в иммунологических

синапсах [63]. Исследователи связали данные эффекты с угнетением пути сигнализации, проходящему по оси Piezo 1 – Grhl 3 – Rnf 114 [63]. Хотя на первый взгляд это кажется противоречивым, такое сочетание явлений возможно, если предположить, что Piezo 1 в цитотоксических Т-лимфоцитах выполняет роль переключателя. Изначально натяжение мембраны цитотоксического Т-лимфоцита увеличивается вследствие миграции актина к краям иммунологического синапса, что необходимо для реализации киллерной функции. Однако по мере увеличения мембранного натяжения происходит активация Piezo 1, которая служит для ограничения избыточного иммунного ответа и переводит цитотоксический Т-лимфоцит из киллерного состояния в фоновое. В этом случае повышение экспрессии перфорины и гранзима В за счет активации Piezo 1 обеспечивает накопление цитолитических факторов внутри клетки.

Эффективность уничтожения клеток-мишеней обеспечивается за счет кластеризации актиновых нитей. Исследователи утверждают, что кластеры сильнее деформируют клетку-мишень, оставляя при этом больше пространства для деградации литических агентов [66, 89].

На формирование иммунного синапса могут оказывать влияние внешние условия. Так, например, на поверхности с более высокой жесткостью был замедлен транспорт ЦОМТ (Центр организации микротрубочек) к центру иммунной клетки [37]. В геометрически ориентированном пространстве снижается содержание актина в активированных Т-клетках, что может нарушать формирование иммунного синапса [73].

Фармакологические и биоинженерные методики модуляции механочувствительности Т-клеток и их потенциальное значение

Описанные механоиммунологические механизмы, взаимодействуя друг с другом, оказывают широкий спектр разносторонних эффектов. Один и тот же каскад может лежать в основе нескольких механических свойств Т-клеток и определять явления при различных заболеваниях. Важным аспектом практического применения данных знаний является поиск методик модуляции механоиммунологических процессов. Имеющиеся достижения (табл. 1) дают надежду на возможность создания препаратов и модернизацию уже известных методик, однако их применение в рамках клинической медицины все еще требует изучения.

Обнаружен агонист механочувствительного канала Piezo 1 – Yoda 1. Механизм действия данного агониста достоверно неизвестен. Последние данные свидетельствуют о том, что Yoda 1 связывается с Piezo 1 в трансмембранных областях канала между повторами А и В и стабилизирует

ТАБЛИЦА 1. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОИНЖЕНЕРНЫЕ МЕТОДИКИ МОДУЛЯЦИИ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ Т-КЛЕТОК
TABLE 1. PHARMACOLOGICAL AND BIOENGINEERING TECHNIQUES TO MODULATE T CELL MECHANOSENSITIVITY

| Механизм Mechanism | Заболевания Diseases | Фармакологическая методика Pharmacological method | Эффекты Effects |
|--|--|---|--|
| Piezo 1 | Опухоли Tumors | Агонисты: Yoda 1 Наномоторы Au-Zn, Pd-Au. Поток жидкости Agonists: Yoda 1 Nanomotors Au-Zn, Pd-Au Fluid Flow | Усиление активации, пролиферации, дифференцировки. Усиление продукции IL-2, TNF α , IFN γ , гранзима B и перфорина. Активация <i>ex vivo</i> для Т-клеточных терапий. Повышение миграционной способности Enhanced activation, proliferation and differentiation Enhanced production of IL-2, TNF α , IFN γ , granzyme B and perforin. Enhanced expression of NF- κ B, NFAT and AP-1. <i>Ex vivo</i> activation for T cell therapies Increased migration |
| | Аутоиммунные заболевания Autoimmune diseases | Ингибиторы: GsMTx4, Dooku 1, гадолиний, рутениевый красный, A β 1-40, A β 1-42, маргариновая кислота, Тубеймозид I, сальвианоловая кислота Inhibitors: GsMTx4, Dooku 1, gadolinium, ruthenium red, A β 1-40, A β 1-42, margaric acid, Tubeimoside I, salvianolic acid B, escin | Снижение активации, пролиферации, дифференцировки. Снижение продукции IL-2, TNF α , IFN γ , гранзима B и перфорина. Снижение экспрессии NF- κ B, NFAT и AP-1. Снижение миграционной способности Reduced activation, proliferation and differentiation. Reduced production of IL-2, TNF α , IFN γ , granzyme B and perforin. Reduced expression of NF- κ B, NFAT and AP-1. Decreased migration |
| | Реакция «трансплантат против хозяина» Graft-versus-host disease Отторжение трансплантата Transplant rejection | Ингибиторы: вертепорфин, CA3, пептид 17, Super-TDU, TED-347, GNE-7883, IAG933, VT103, цитохалазин D, TDI-0115 и TRUL1 Inhibitors: verteporfin, CA3, peptide 17, Super-TDU, TED-347, GNE-7883, IAG933, VT103, cytochalasin D, TDI-0115 and TRUL1 | Стабилизация цитотоксических Т-лимфоцитов. Стабилизация пролиферации и дифференцировки Т-клеток Stabilization of cytotoxic T lymphocytes. Stabilization of T cell proliferation and differentiation |
| YAP | Аутоиммунные заболевания Autoimmune diseases | Активаторы: PY-60 Activators: PY-60 | Иммуносупрессия. Снижение активации цитотоксических Т-лимфоцитов Immunosuppression. Decreased activation of cytotoxic T lymphocytes |
| | Сахарный диабет Diabetes mellitus | Жесткий субстрат Rigid substrate | Активация <i>ex vivo</i> для Т-клеточных терапий <i>Ex vivo</i> activation for T cell therapies |
| Интегрины (LFA-1) Integrins (LFA-1) | Хронические инфекции Chronic infections | Ингибиторы: BIRT-377, A-286982, BMS-688521, HY-19344A Inhibitors: BIRT-377, A-286982, BMS-688521, HY-19344A | Снижение миграционной способности Decreased migration |
| | Аутоиммунные заболевания Autoimmune diseases | | |

открытые каналы. Исследователи отмечают низкую эффективность Yoda 1 и предполагают возможность наличия неактивных сайтов связывания. Несмотря на это, использование Yoda 1 в качестве методики для *ex vivo* активации Т-клеток может потенциально способствовать повышению эффективности Т-клеточной терапии [35, 84, 90].

Разработаны также ингибиторы Piezo 1. Существует 2 различных механизма блокировки. Один из них реализуется за счет связывания с компонентами мембраны или встраивания в нее, что либо препятствует локальному увеличению поверхностного натяжения мембраны вблизи ионного канала, либо увеличивает сжимающее давление на ионный канал, сдерживая его открытие или способствуя его стабилизации в закрытом состоянии [42, 86, 94, 102]. При этом не происходит непосредственного связывания ингибитора с компонентами Piezo 1. Среди подобных веществ упоминаются гадолиний, рутениевый красный, механотоксин GsMTx4, полученный из яда тарантула, бета-амилоиды A β 1-40 и A β 1-42, а также маргаритовая кислота [42, 86]. Они, как правило, являются неселективными ингибиторами Piezo 1, что означает возможность наличия серьезных побочных эффектов при их применении. Тем не менее их использования в качестве дополнительных компонентов при лечении локализованных аутоиммунных заболеваний, при трансплантациях на поверхности органа или в качестве *ex vivo* метода может быть перспективной методикой для повышения эффективности лечения аутоиммунных процессов, а также снижения взаимных иммунных реакций в системе трансплантат-хозяин.

Другой механизм основан на связывании ингибиторов непосредственно с Piezo 1 [42, 86, 94, 102]. Вещества, действующие подобным способом, как правило, являются антагонистами Yoda 1, при этом довольно часто точный механизм их действия неизвестен. В данную группу входят такие вещества, как Dooku 1, Тубеймозид I, сальвианоловая кислота В и, по всей видимости, эсцин [42, 50, 86]. Обладая большей селективностью по сравнению с веществами предыдущей группы, они имеют больший потенциал при местном использовании, однако вероятность их удачного системного применения остается такой же низкой.

Существуют также и биоинженерные методики. Выше уже упоминалась активация Piezo 1 в Т-клетках посредством наномоторов. В *in vitro* исследованиях на наномоторах Au-Zn в виде трубок и шиповатых наномоторах Pd-Au было показано увеличение активации Т-клеток посредством Piezo 1 [19, 95]. Движение системы в первом случае осуществлялось за счет реакции цинка с водой, в то время как во втором случае

использовали реакцию разложения перекиси водорода. Более дешевым способом представляется воздействие потоком жидкости [31, 42, 74]. Наиболее очевидное применение данной методики — *ex vivo* активация Т-клеток при Т-клеточных терапиях.

Известно множество ингибиторов YAP. Большинство из них влияют на взаимодействие YAP и TEAD. К ним относятся вертепорфин, CA3, Super-TDU, TED-347, GNE-7883, IAG933 [29, 80, 98, 100, 101]. Проникновение данных веществ в клетку, по всей видимости, осуществляется путем пассивной диффузии вследствие их липофильности. Их изучение в контексте иммунных клеток порой приводит к неожиданным результатам. Было показано, что вертепорфин подавляет Th17-клетки, что реализуется через иной механизм, не связанный с YAP [8]. Изучаются также и не прямые ингибиторы YAP. Так, например, TDI-011536 и TRULI рассматриваются в качестве супрессоров LATS киназ [39, 40]. BAY-593, воздействуя на RhoA, способен блокировать сопряжение интегринов и YAP [24]. Существуют и другие вещества, подавляющие действие YAP, а также стратегии его не прямой блокировки [100]. Применение ингибиторов YAP представляет собой перспективное направление в контексте противоопухолевых терапий и лечения хронической инфекции. Их использование в качестве средств, способствующих увеличению цитотоксической активности CD8⁺Т-лимфоцитов может усиливать подавленный иммунитет [46]. За счет угнетения иммуносупрессивной функции Treg-клеток возможно поддержание активности цитотоксической функции на более длительном промежутке времени [61]. Тем не менее остаются непонятными методики избегания избыточного иммунного ответа.

К активаторам YAP относят PY-60. Проникая сквозь мембрану клеток, он ингибирует аннексин A2, препятствующий ядерной транслокации YAP [78]. Это способствует усилению YAP-опосредованного ответа. Изучение данного активатора в отношении иммунных клеток не проводилось. Тем не менее можно предположить, что за счет угнетения цитотоксичности, наблюдаемого при активации YAP [46, 61], лекарственные средства на основе PY-60 могли бы использоваться при лечении аутоиммунных заболеваний, а разработка поддерживающих методик представляется перспективным направлением в контексте трансплантации.

Стоит, однако, отметить, что как ингибиторы, так и активаторы YAP при их применении в составе лекарственных средств могут обладать широким спектром побочных эффектов за счет отсутствия селективности к типу клеток. Важной задачей является поиск методики селективной

доставки, при которой молекулы активатора или ингибитора высвобождались бы вблизи Т-клеток. Разработка подобной методики способствовала бы снижению выраженности побочных эффектов и повышала бы эффективность по отношению к основному применению.

Еще одной логически вытекающей методикой является активация Т-клеток жесткими подложками. Использование жесткости субстрата в качестве лабораторной методики активации Т-клеток может способствовать повышению эффективности Т-клеточных терапий [34, 99]. Интересным вопросом остается возможность модуляции внеклеточного матрикса внутри организма с целью создания благоприятных условий для усиления Т-клеточного ответа. Не понятно, однако, какие условия можно считать благоприятными. Жесткое внеклеточное микроокружение, как было упомянуто выше, способствует пролиферации и дифференцировке Т-клеток, но препятствует исполнению цитотоксических функций [11, 25, 56]. Увеличение жесткости внеклеточного матрикса внутри организма в этом случае приведет к усилению пролиферации и дифференцировки, но не к повышению эффективности Т-клеточного ответа. Более перспективной в этом плане выглядит гипотетическая методика, основанная на модуляции Т-клеточного ответа за счет параллельного введения растворимых молекул, имитирующих жесткий внеклеточный матрикс. Подобный подход позволит, с одной стороны, усилить пролиферацию и дифференцировку Т-клеток.

С другой стороны, за счет растворимости молекул они не станут препятствием для презентации антигенов Т-клеткам. Возможен и другой подход. Исследователи установили, что увеличение жесткости мембраны опухолевой клетки стимулирует цитотоксический иммунный ответ [47]. Целенаправленное уплотнение мембраны опухолевых клеток является одной из перспективных методик повышения эффективности Т-клеточной терапии [47].

Более разработанными представляются ингибиторы и активаторы интегринов, в частности LFA-1 [53, 64, 105]. Одним из последних достижений в этой области является обнаружение ингибирующей активности GDF-15 за счет редукции адгезии Т-клеток [28].

Заключение

Современные достижения в области механоиммунологии указывают на существенную значимость механочувствительности в формировании Т-клеточного иммунного ответа. Высокая степень сопряжения механизмов обеспечивает широкий спектр механических свойств, влияющих на активацию, пролиферацию, дифференцировку и эффекторные функции Т-лимфоцитов (рис. 1). Детальное изучение этих процессов открывает новые возможности для развития медицинских и фармакологических приложений, а также для поиска инновационных биоинженерных подходов к иммунотерапиям.

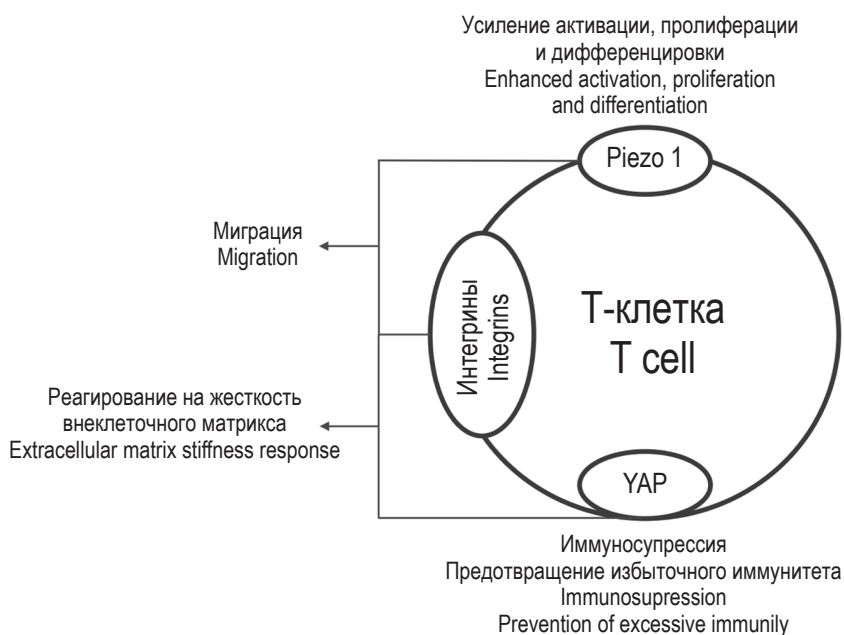


Рисунок 1. Механизмы механочувствительности и их участие в Т-клеточном иммунном ответе

Figure 1. Mechanisms of mechanosensitivity and their involvement in the T cell immune response

Значительный прогресс достигнут в понимании того, как жесткость микроокружения регулирует сигнальные каскады в Т-клетках. Выявлены ключевые медиаторы (интегрины, YAP, транскрипционные факторы, актин), играющие центральную роль в передаче механических стимулов подобной природы. Показана и значимость канала Piezo 1 в механизмах механочувствительности Т-клеток. Регуляция кальциевого потока посредством мембранного натяжения оказывается значимой в миграции и активации под действием напряжения сдвига. Эти открытия создают основу для разработки новых стратегий модуляции иммунного ответа, что особенно важно в контексте аутоиммунных заболеваний, онкологии и регенеративной медицины.

Текущие фармакологические методики предоставляют возможности для создания лекарственных препаратов, способных воздействовать на механочувствительные пути. Применение активаторов и ингибиторов Piezo 1, YAP, LFA-1 может стать основой для иммуномодуляторов, способных подавлять гиперактивированные иммунные ответы при аутоиммунных заболеваниях или, напротив, усилить Т-клеточную активность при терапии онкологий.

Значительный потенциал имеет развитие биоинженерных методик. Последние исследования указывают на возможность разработки искусственных матриц с целью управления активацией Т-лимфоцитов. Современные достижения

в области нанотехнологий расширяют перспективы в создании методик модуляции Т-клеток *ex vivo*.

Несмотря на значительные успехи, остается и ряд нерешенных вопросов. Не в полной мере изучены механизмы механочувствительности Т-клеток в сложных физиологических условиях, приближенных к организму. Обнаруженные *in vitro*, многие механоиммунологические свойства требуют детального изучения на клинически значимых моделях *in vivo*. Кроме того, не исследован и фармакологический аспект. Имеющиеся вещества часто обладают низкой эффективностью и неизвестной фармакокинетикой. Применение ряда из них не было опробовано на Т-клеток и предполагает большое количество побочных эффектов.

Таким образом, механоиммунология представляет собой быстро развивающуюся область. Изучение механизмов механочувствительности иммунных клеток указывает на их возможное участие в патологических процессах и открывает перспективы для модернизации или создания новых подходов к лечению широкого спектра заболеваний. Дальнейшее изучение фармакологических и биоинженерных стратегий механомодуляции иммунных функций может привести к созданию современных лекарственных препаратов и терапевтических методик, учитывающих внутреннюю среду.

Список литературы / References

1. Acuto O. T-cell virtuosity in “knowing thyself”. *Front. Immunol.*, 2024, Vol. 15, 1343575. doi: 10.3389/fimmu.2024.1343575.
2. Alatoon A., ElGindi M., Sapudom J., Teo J.C.M. The T Cell Journey: A Tour de Force. *Adv. Biol.*, 2023, Vol. 7, no. 1, 2200173. doi: 10.1002/adbi.202200173.
3. Angeli V., Lim H.Y. Biomechanical control of lymphatic vessel physiology and functions. *Cell. Mol. Immunol.*, 2023, Vol. 20, no. 9, pp. 1051-1062.
4. Bai J., Yan M., Xu Y., Wang Y., Yao Y., Jin P., Zhang Y., Qu Y., Niu L., Li H. YAP enhances mitochondrial OXPHOS in tumor-infiltrating Treg through upregulating Lars2 on stiff matrix. *J. Immunother. Cancer*, 2024, Vol. 12, no. 11, e010463. doi: 10.1136/jitc-2024-010463.
5. Bergert M., Erzberger A., Desai R.A., Aspalter I.M., Oates A.C., Charras G., Salbreux G., Paluch E.K. Force transmission during adhesion-independent migration. *Nat. Cell. Biol.*, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 524-529.
6. Bertoni A., Alabiso O., Galetto A., Baldanzi G. Integrins in T cell physiology. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 2, 485. doi: 0.3390/ijms19020485.
7. Boesen E.I., Kakalij R.M. Autoimmune-mediated renal disease and hypertension. *Clin. Sci.*, 2021, Vol. 135, no. 17, pp. 2165-2196.
8. Brosinsky P., Leister H., Cheng N., Varelas X., Visekruna A., Luu M. Verteporfin protects against Th17 cell-mediated EAE independently of YAP inhibition. *Eur. J. Immunol.*, 2022, Vol. 52, no. 9, pp. 1523-1526.
9. Cai X., Wang K.C., Meng Z. Mechanoregulation of YAP and TAZ in cellular homeostasis and disease progression. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 673599. doi: 0.3389/fcell.2021.673599.
10. Calvo V., Izquierdo M. Role of actin cytoskeleton reorganization in polarized secretory traffic at the immunological synapse. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 629097. doi: 10.3389/fcell.2021.629097.

11. Cheever A., Townsend M., O'Neill K. Tumor microenvironment immunosuppression: a roadblock to CAR T-cell advancement in solid tumors. *Cells*, 2022, Vol. 11, no. 22, 3626. doi: 10.3390/cells11223626.
12. Chen D.S. Immunity as biophysics at the surface of a T cell. *Immunity*, 2024, Vol. 57, no. 2, pp.193-195.
13. Coste B., Mathur J., Schmidt M., Earley T.J., Ranade S., Petrus M.J., Dubin A.E., Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, 2010, Vol. 330, no. 6000, pp. 55-60.
14. de Jesus M., Settle A.H., Vorselen D., Gaetjens T.K., Galiano M., Wong Y.Y., Fu T.M., Santosa E., Winer B.Y., Tamzalit F., Wang M.S., Bao Z., Sun J.C., Shah P., Theriot J.A., Abel S.M., Huse M. Topographical analysis of immune cell interactions reveals a biomechanical signature for immune cytolysis. *Biorxiv*, 2023, 2023.04.16.537078. doi: 10.1101/2023.04.16.537078.
15. De Marco R.C., Monzo H.J., Ojala P.M. CAR T cell therapy: a versatile living drug. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 7, 6300. doi: 10.3390/ijms24076300.
16. Douanne T., Griffiths G.M. Cytoskeletal control of the secretory immune synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2021, Vol. 71, pp. 87-94.
17. Du H., Bartleson J.M., Butenko S., Alonso V., Liu W.F., Winer D.A., Butte M.J. Tuning immunity through tissue mechanotransduction. *Nat. Rev. Immunol.*, 2023, Vol. 23, no. 3, pp. 174-188.
18. Fang X.Z., Zhou T., Xu J.Q., Wang Y.X., Sun M.M., He Y.J., Pan S.W., Xiong W., Peng Z.K., Gao X.H., Shang Y. Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. *Cell Biosci.*, 2021, Vol. 11, no. 1, 13. doi: 10.1186/s13578-020-00522-z.
19. Fu D., Xie D., Wang F., Chen B., Wang Z., Peng F. Mechanically optimize T cells activation by spiky nanomotors. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, Vol. 10, 844091. doi: 10.3389/fbioe.2022.844091.
20. Ge H., Tian M., Pei Q., Tan F., Pei H. Extracellular matrix stiffness: new areas affecting Cell metabolism. *Front. Oncol.*, 2021, Vol. 11, 631991. doi: 10.3389/fonc.2021.631991.
21. Geng L., Zhang C., He C., Zhang K., Kan H., Mao A., Ma X. Physiological levels of fluid shear stress modulate vascular function through TRPV4 sparklets. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2022, Vol. 54, no. 9, pp. 1268-1277.
22. Geng X., Ho Y. C., Srinivasan R.S. Biochemical and mechanical signals in the lymphatic vasculature. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2021, Vol. 78, no. 16, pp. 5903-5923.
23. Govendir M.A., Kempe D., Sianati S., Cremasco J., Mazalo J.K., Colakoglu F., Golo M., Poole K., Biro M. T cell cytoskeletal forces shape synapse topography for targeted lysis via membrane curvature bias of perforin. *Developmental Cell.*, 2022, Vol. 57, no. 18, pp. 2237-2247.
24. Graham K., Lienau P., Bader B., Prechtl S., Naujoks J., Lesche R., Weiske J., Kuehnlentz J., Brzezinka K., Potze L., Zanconato F., Nicke B., Montebaur A., Bone W., Golfier S., Kaulfuss S., Kopitz C., Pilari S., Steuber H., Hayat S., Kamburov A., Steffen A., Schlicker A., Buchgraber P., Braeuer N., Font N.A., Heinrich T., Kuhnke L., Nowak-Reppel K., Stresemann C., Steigemann P., Walter A.O., Blotta S., Ocker M., Lakner A., von Nussbaum F., Mumberg D., Eis K., Piccolo S., Lange M. Discovery of YAP1/TAZ pathway inhibitors through phenotypic screening with potent anti-tumor activity via blockade of Rho-GTPase signaling. *Cell Chem. Biol.* 2024, Vol. 31, no. 7, pp. 1247-1263.
25. Gunzer M., Schäfer A., Borgmann S., Grabbe S., Zänker K.S., Bröcker E.B., Kämpgen E., Friedl P. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity*, 2000, Vol. 13, no. 3, pp. 323-332.
26. Guo T., He C., Venado A., Zhou Y. Extracellular matrix stiffness in lung health and disease. *Compr. Physiol.*, 2022, Vol. 12, no. 3, pp. 3523-3558.
27. Guo T., Wantono C., Tan Y., Deng F., Duan T., Liu D. Regulators, functions, and mechanotransduction pathways of matrix stiffness in hepatic disease. *Front. Physiol.*, 2023, Vol. 14, 1098129. doi: 10.3389/fphys.2023.1098129.
28. Eiring P., Vashist N., Wedekind F., Gensler S., Fischer B., Dahlhoff J., Mokhtari F., Kuzkina A., Welters M.J.P., Benz T.M., Sorger L., Thiemann V., Almanzar G., Selle M., Thein K., Späth J., Gonzalez M.C., Reitinger C., Ipsen-Escobedo A., Wistuba-Hamprecht K., Eichler K., Filipinski K., Zeiner P.S., Beschorner R., Goedemans R., Gogolla F.H., Hackl H., Rooswinkel R.W., Thiem A., Roche P.R., Joshi H., Pühringer D., Wöckel A., Diessner J.E., Rüdiger M., Leo E., Cheng P.F., Levesque M.P., Goebeler M., Sauer M., Nimmerjahn F., Schubert-Wagner C., von Felten S., Mittelbronn M., Mehling M., Beilhack A., van der Burg S.H., Riedel A., Weide B., Dummer R., Wischhusen J. Tumor-derived GDF-15 blocks LFA-1 dependent T cell recruitment and suppresses responses to anti-PD-1 treatment. *Nat. Commun.*, 2023, Vol. 14, no. 1, 4253. doi: 10.1038/s41467-023-39817-3.
29. Hagenbeek T.J., Zbieg J.R., Hafner M., Mroue R., Lacap J.A., Sodir N.M., Noland C.L., Afghani S., Kishore A., Bhat K.P., Yao X., Schmidt S., Clausen S., Steffek M., Lee W., Beroza P., Martin S., Lin E., Fong R., Di Lello P., Kubala M.H., Yang M.N., Lau J.T., Chan E., Arrazate A., An L., Levy E., Lorenzo M.N., Lee H.J., Pham T.H., Modrusan Z., Zang R., Chen Y.C., Kabza M., Ahmed M., Li J., Chang M.T., Maddalo D., Evangelista M., Ye X., Crawford J.J., Dey A. An allosteric pan-TEAD inhibitor blocks oncogenic YAP/TAZ signaling and overcomes KRAS G12C inhibitor resistance. *Nat. Cancer*, 2023, Vol. 4, no. 6, pp. 812-828.
30. Hasegawa K., Fujii S., Matsumoto S., Tajiri Y., Kikuchi A., Kiyoshima T. YAP signaling induces PIEZO1 to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation. *J. Pathol.*, 2021, Vol. 253, no. 1, pp. 80-93.

31. Hope J.M., Dombroski J.A., Pereles R.S., Lopez-Cavestany M., Greenlee J.D., Schwager S.C., Reinhart-King C.A., King M.R. Fluid shear stress enhances T cell activation through Piezo1. *BMC Biol.*, 2022, Vol. 20, no. 1, 61. doi: 10.1186/s12915-022-01266-7.
32. Humphries J.D., Chastney M.R., Askari J.A., Humphries M.J. Signal transduction via integrin adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2019, Vol. 56, pp. 14-21.
33. Huttenlocher A., Horwitz A.R. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011, Vol. 3, no. 9, a005074. doi: 10.1101/cshperspect.a005074
34. Hyun J., Kim S.J., Cho S.D., Kim H.W. Mechano-modulation of T cells for cancer immunotherapy. *Biomaterials*, 2023, Vol. 297, 122101. doi: 10.1016/j.biomaterials.2023.122101.
35. Jiang W., Wijerathne T.D., Zhang H., Lin Y.C., Jo S., Im W., Lacroix J.J., Luo Y.L. Structural and thermodynamic framework for PIEZO1 modulation by small molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2023, Vol. 120, no. 50, e2310933120. doi: 0.1073/pnas.2310933120.
36. Jiang Y., Yang X., Jiang J., Xiao B. Structural designs and mechanogating mechanisms of the mechanosensitive piezo channels. *Trends Biochem. Sci.*, 2021, Vol. 46, no. 6, pp. 472-488.
37. Jin W., Tamzalit F., Chaudhuri P.K., Black C.T., Huse M., Kam L.C. T cell activation and immune synapse organization respond to the microscale mechanics of structured surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019, Vol. 116, no. 40, pp. 19835-19840.
38. Jung P., Zhou X., Iden S., Bischoff M., Qu B. T cell stiffness is enhanced upon formation of immunological synapse. *Elife*, 2021, Vol. 10, e66643. doi: 0.7554/eLife.66643.
39. Kastan N., Gnedeva K., Alisch T., Petelski A.A., Huggins D.J., Chiaravalli J., Aharanov A., Shakked A., Tzahor E., Nagiel A., Segil N., Hudspeth A.J. Small-molecule inhibition of Lats kinases may promote Yap-dependent proliferation in postmitotic mammalian tissues. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 3100. doi: 10.1038/s41467-021-23395-3.
40. Kastan N.R., Oak S., Liang R., Baxt L., Myers R.W., Ginn J., Liverton N., Huggins D.J., Pichardo J., Paul M., Carroll T.S., Nagiel A., Gnedeva K., Hudspeth A.J. Development of an improved inhibitor of Lats kinases to promote regeneration of mammalian organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2022, Vol. 119, no. 28, e2206113119. doi: 0.1073/pnas.2206113119.
41. Kim T.J. Mechanobiology: A new frontier in biology. *Biology*, 2021, Vol. 10, no. 7, 570. doi: 10.3390/biology10070570.
42. Kinsella J.A., Debant M., Parsonage G., Morley L.C., Bajarwan M., Revill C., Foster R., Beech D.J. Pharmacology of PIEZO1 channels. *Br. J. Pharmacol.*, 2024, Vol. 181, no. 23, pp. 4714-4732.
43. Kolasangiani R., Bidone T.C., Schwartz M.A. Integrin conformational dynamics and mechanotransduction. *Cells*, 2022, Vol. 11, no. 22, 3584. doi: 10.3390/cells11223584.
44. Koo J.H., Guan K.L. Interplay between YAP/TAZ and metabolism. *Cell Metab.*, 2018, Vol. 28, no. 2, pp. 196-206.
45. Lämmermann T., Bader B.L., Monkley S.J., Worbs T., Wedlich-Söldner R., Hirsch K., Keller M., Förster R., Critchley D.R., Fässler R., Sixt M. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 2008, Vol. 453, no. 7191, pp. 51-55.
46. Lebid A., Chung L., Pardoll D.M., Pan F. YAP attenuates CD8 T cell-mediated anti-tumor response. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 580. doi: 10.3389/fimmu.2020.00580.
47. Lei K., Kurum A., Kaynak M., Bonati L., Han Y., Cencen V., Gao M., Xie Y.Q., Guo Y., Hannebelle M.T.M., Wu Y., Zhou G., Guo M., Fantner G.E., Sakar M.S., Tang L. Cancer-cell stiffening via cholesterol depletion enhances adoptive T-cell immunotherapy. *Nat. Biomed. Eng.*, 2021, Vol. 5, no. 12, pp. 1411-1425.
48. Liu B., Kolawole E.M., Evavold B.D. Mechanobiology of T cell activation: to catch a bond. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 37, no. 1, pp. 65-87.
49. Liu C.S.C., Mandal T., Biswas P., Hoque M.A., Bandopadhyay P., Sinha B.P., Sarif J., D'Rozario R., Sinha D.K., Sinha B., Ganguly D. Piezo1 mechanosensing regulates integrin-dependent chemotactic migration in human T cells. *eLife*, 2024, Vol. 12, RP91903. doi: 10.7554/eLife.91903.
50. Liu S., Pan X., Cheng W., Deng B., He Y., Zhang L., Ning Y., Li J. Tubeimoside I antagonizes Yoda1-Evoked Piezo1 channel activation. *Front. Pharmacol.*, 2020, Vol. 11, 768. doi: 10.3389/fphar.2020.00768.
51. Luthold C., Hallal T., Labbé D.P., Bordeleau F. The Extracellular matrix stiffening: a trigger of prostate cancer progression and castration resistance? *Cancers*, 2022, Vol. 14, no. 12, 2887. doi: 10.3390/cancers14122887.
52. Lv D., Fei Y., Chen H., Wang J., Han W., Cui B., Feng Y., Zhang P., Chen J. Crosstalk between T lymphocyte and extracellular matrix in tumor microenvironment. *Front. Immunol.*, 2024, Vol. 15, 1340702. doi: 10.3389/fimmu.2024.1340702.
53. Mancuso R.V., Schneider G., Hürzeler M., Gut M., Zurflüh J., Breitenstein W., Bouitbir J., Reisen F., Atz K., Ehrhardt C., Duthaler U., Gyax D., Schmidt A.G., Krähenbühl S., Weitz-Schmidt G. Allosteric targeting resolves limitations of earlier LFA-1 directed modalities. *Biochem. Pharmacol.*, 2023, Vol. 211, 115504. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115504.
54. Martino F., Perestrelo A.R., Vinarský V., Pagliari S., Forte G. Cellular mechanotransduction: from tension to function. *Front. Physiol*, 2018, Vol. 9, 824. doi: 10.3389/fphys.2018.00824.

55. Meng K.P., Majedi F.S., Thauland T.J., Butte M.J. Mechanosensing through YAP controls T cell activation and metabolism. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 8, e20200053. doi: 10.1084/jem.20200053.
56. Mierke C.T. Extracellular matrix cues regulate mechanosensing and mechanotransduction of cancer cells. *Cells*, 2024, Vol. 13, no. 1, 96. doi: 10.3390/cells13010096.
57. Montironi C., Muñoz-Pinedo C., Eldering E. Hematopoietic versus solid cancers and T cell dysfunction: looking for similarities and distinctions. *Cancers*, 2021, Vol. 13, no. 2, 284. doi: 10.3390/cancers13020284
58. Murugesan S., Hong J., Yi J., Li D., Beach J.R., Shao L., Meinhardt J., Madison G., Wu X., Betzig E., Hammer J.A. Formin-generated actomyosin arcs propel T cell receptor microcluster movement at the immune synapse. *J. Cell Biol.*, 2016, Vol. 215, no. 3, pp. 383-399.
59. Narciso M., Martínez Á., Júnior C., Díaz-Valdivia N., Ulldemolins A., Berardi M., Neal K., Navajas D., Farré R., Alcaraz J., Almendros I., Gavara N. Lung Micrometastases Display ECM Depletion and Softening While Macrometastases Are 30-Fold Stiffer and Enriched in Fibronectin. *Cancers*, 2023, Vol. 15, no. 8, 2404. doi: 10.3390/cancers15082404.
60. Nelson C.M., Xiao B., Wickström S.A., Dufre ne Y.F., Cosgrove D.J., Heisenberg C.P., Dupont S., Shyer A.E., Rodrigues A.R., Trepatt X., Diz-Mu noz A. Mechanobiology: Shaping the future of cellular form and function. *Cell*, 2024, Vol. 187, no. 11, pp. 2652-2656.
61. Ni X., Tao J., Barbi J., Chen Q., Park B.V., Li Z., Zhang N., Lebid A., Ramaswamy A., Wei P., Zheng Y., Zhang X., Wu X., Vignali P., Yang C.P., Li H., Pardoll D., Lu L., Pan D., Pan F. YAP Is Essential for Treg-Mediated Suppression of Antitumor Immunity. *Cancer Discov.*, 2018, Vol. 8, no. 8, pp. 1026-1043.
62. Nicolas N., De Tilly A., Roux E. Blood shear stress during the cardiac cycle and endothelial cell orientation and polarity in the carotid artery of male and female mice. *Front. Physiol.*, 2024, Vol. 15, 1386151. doi: 10.3389/fphys.2024.1386151.
63. Pang R., Sun W., Yang Y., Wen D., Lin F., Wang D., Li K., Zhang N., Liang J., Xiong C., Liu Y. PIEZO1 mechanically regulates the antitumour cytotoxicity of T lymphocytes. *Nat. Biomed. Eng.*, 2024, Vol. 8, no. 9, pp. 1162-1176.
64. Pang X., He X., Qiu Z., Zhang H., Xie R., Liu Z., Gu Y., Zhao N., Xiang Q., Cui Y. Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy. *Sig. Transduct. Target Ther.*, 2023, Vol. 8, no. 1, 1. doi: 10.1038/s41392-022-01259-6.
65. Pathni A.,  zcelikkale A., Rey-Suarez I., Li L., Davis S., Rogers N., Xiao Z., Upadhyaya A. Cytotoxic T lymphocyte activation signals modulate cytoskeletal dynamics and mechanical force generation. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 779888. doi: 10.3389/fimmu.2022.779888.
66. Pathni A., Wagh K., Rey-Suarez I., Upadhyaya A. Mechanical regulation of lymphocyte activation and function. *J. Cell Sci.*, 2024, Vol. 137, no. 13, jcs219030. doi: 10.1242/jcs.219030.
67. Pocaterra A., Romani P., Dupont S. YAP/TAZ functions and their regulation at a glance. *J. Cell Sci.*, 2020, Vol. 133, no. 2, jcs230425. doi: 10.1242/jcs.230425/
68. Pribila J.T., Quale A.C., Mueller K.L., Shimizu Y. Integrins and T cell-mediated immunity. *Annu Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, no. 1, pp. 157-180.
69. Reversat A., Gaertner F., Merrin J., Stopp J., Tasciyan S., Aguilera J., de Vries I., Hauschild R., Hons M., Piel M., Callan-Jones A., Voituriez R., Sixt M. Cellular locomotion using environmental topography. *Nature*, 2020, Vol. 582, no. 7813, pp. 582-585.
70. Rogers J., Bajur A.T., Salaita K., Spillane K.M. Mechanical control of antigen detection and discrimination by T and B cell receptors. *Biophys. J.*, 2024, Vol. 123, no. 15, pp. 2234-2255.
71. R mer A.M.A., Thorseth M.L., Madsen D.H. Immune modulatory properties of collagen in cancer. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 791453. doi: 10.3389/fimmu.2021.791453.
72. Roy N.H., Kim S.H.J., Buffone A.Jr., Blumenthal D., Huang B., Agarwal S., Schwartzberg P.L., Hammer D.A., Burkhardt J.K. LFA-1 signals to promote actin polymerization and upstream migration in T cells. *J. Cell Sci.*, 2020, Vol. 133, no. 17, jcs248328. doi: 10.1242/jcs.248328.
73. Sapudom J., Alatoom A., Tipay P.S., Teo J. Cm. Matrix stiffening from collagen fibril density and alignment modulates YAP-mediated T-cell immune suppression. *Biomaterials*, 2025, Vol. 315, 122900. doi: 10.1016/j.biomaterials.2024.122900.
74. Sarna N.S., Desai S.H., Kaufman B.G., Curry N.M., Hanna A.M., King M.R. Enhanced and sustained T cell activation in response to fluid shear stress. *iScience*, 2024, Vol. 27, no. 6, 109999. doi: 10.1016/j.isci.2024.109999.
75. Schoppmeyer R., van Steen A.C.I., Kempers L., Timmerman A.L., Nolte M.A., Hombrink P., van Buul J.D. The endothelial diapedesis synapse regulates transcellular migration of human T lymphocytes in a CX3CL1- and SNAP23-dependent manner. *Cell Rep.*, 2022, Vol. 38, no. 3, 110243. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110243
76. Secondino S., Canino C., Alaimo D., Muzzana M., Galli G., Borgetto S., Basso S., Bagnarino J., Pulvirenti C., Comoli P., Pedrazzoli P. Clinical trials of cellular therapies in solid tumors. *Cancers*, 2023, Vol. 15, no. 14, 3667. doi: 10.3390/cancers15143667.
77. Seo J., Kim J. Regulation of Hippo signaling by actin remodeling. *BMB Rep.*, 2018, Vol. 51, no. 3, pp. 151-156.
78. Shalhout S.Z., Yang P.Y., Grzelak E.M., Nutsch K., Shao S., Zambaldo C., Iaconelli J., Ibrahim L., Stanton C., Chadwick S.R., Chen E., DeRan M., Li S., Hull M., Wu X., Chatterjee A.K., Shen W., Camargo F.D., Schultz P.G.,

Bollong M.J. YAP-dependent proliferation by a small molecule targeting annexin A2. *Nat. Chem. Biol.*, 2021, Vol. 17, no. 7, pp. 767-775.

79. Smith A., Stanley P., Jones K., Svensson L., McDowall A., Hogg N. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol. Rev.*, 2007, Vol. 218, no. 1, pp. 135-146.

80. Sturbaut M., Bailly F., Coevoet M., Sileo P., Pugnieri M., Liberelle M., Magnez R., Thuru X., Chartier-Harlin M.C., Melnyk P., Gelin M., Allemand F., Guichou J.F., Cotelle P. Discovery of a cryptic site at the interface 2 of TEAD – Towards a new family of YAP/TAZ-TEAD inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 2021, Vol. 226, 113835. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113835.

81. Sun D., Shi X., Li S., Wang X., Yang X., Wan M. CAR-T cell therapy: A breakthrough in traditional cancer treatment strategies (Review). *Mol. Med. Rep.*, 2024, Vol. 29, no. 3, 47. doi: 10.3892/mmr.2024.13171.

82. Sundqvist K.G. T cell motility: how is it regulated? *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 588642. doi: 10.3389/fimmu.2020.588642.

83. Tamzalit F., Wang M.S., Jin W., Tello-Lafoz M., Boyko V., Heddleston J.M., Black C.T., Kam L.C., Huse M. Interfacial actin protrusions mechanically enhance killing by cytotoxic T cells. *Sci. Immunol.*, 2019, Vol. 4, no. 33, eaav5445. doi: 10.1126/sciimmunol.aav5445.

84. Tang H., Zeng R., He E., Zhang I., Ding C., Zhang A. Piezo-Type mechanosensitive ion Channel Component 1 (Piezo 1): A promising therapeutic target and its modulators: Miniperspective. *J. Med. Chem.*, 2022, Vol. 65, no. 9, pp. 6441-6453.

85. Taylor E.B., Wolf V.L., Dent E., Ryan M.J. Mechanisms of hypertension in autoimmune rheumatic diseases. *Br. J. Pharmacol.*, 2019, Vol. 176, no. 12, pp. 1897-1913.

86. Thien N.D., Hai-Nam N., Anh D.T., Baecker D. Piezo1 and its inhibitors: Overview and perspectives. *European J. Med. Chem.*, 2024, Vol. 273, 116502. doi: 10.1016/j.ejmech.2024.116502.

87. Walling B.L., Kim M. LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 952. doi: 10.3389/fimmu.2018.00952.

88. Wang H.J., Wang Y., Mirjavadi S.S., Andersen T., Moldovan L., Vatankhah P., Russell B., Jin J., Zhou Z., Li Q., Cox C.D., Su Q.P., Ju L.A. Microscale geometrical modulation of PIEZO1 mediated mechanosensing through cytoskeletal redistribution. *Nat. Commun.*, 2024, Vol. 15, no. 1, 5521. doi: 10.1038/s41467-024-49833-6.

89. Wang M.S., Hu Y., Sanchez E.E., Xie X., Roy N.H., de Jesus M., Winer B.Y., Zale E.A., Jin W., Sachar C., Lee J.H., Hong Y., Kim M., Kam L.C., Salaita K., Huse M. Mechanically active integrins target lytic secretion at the immune synapse to facilitate cellular cytotoxicity. *Nat. Commun.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 3222. doi: 10.1038/s41467-022-30809-3.

90. Wijerathne T.D., Ozkan A.D., Lacroix J.J. Yoda1's energetic footprint on Piezo1 channels and its modulation by voltage and temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2022, Vol. 119, no. 29, e2202269119. doi: 10.1073/pnas.2202269119.

91. Winkler J., Abisoye-Ogunniyan A., Metcalf K.J., Werb Z. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 5120. doi: 10.1038/s41467-020-18794-x.

92. Wong D.C.P., Ding J.L. The mechanobiology of NK cells – 'Forcing NK to Sense' target cells. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, 2023, Vol. 1878, no. 2, 188860. doi: 10.1016/j.bbcan.2023.188860

93. Woolf E., Grigorova I., Sagiv A., Grabovsky V., Feigelson S. W., Shulman Z., Hartmann T., Sixt M., Cyster J.G., Alon R. Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 10, pp. 1076-1085.

94. Wu J., Lewis A. H., Grandl J. Touch, Tension, and Transduction – The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem. Sci.*, 2017, Vol. 42, no. 1, pp. 57-71.

95. Xie D., Fu D., Fu S., Chen B., He W., Wilson D.A., Peng F. Mechanical activation of immune T cells via a water driven nanomotor. *Adv. Healthc. Mater.*, 2022, Vol. 11, no. 12, 2200042. doi: 10.1002/adhm.202200042.

96. Yang C., Xie R., Cao T., Zhang Y., Xie Y., Fan Q., Wang X., Ye F. Mechanical communication and function regulation of immune cells. *Fundam. Res.*, 2024, S2667325824001523. doi: 10.1016/j.fmre.2024.04.008.

97. Yang X., Lin C., Chen X., Li S., Li X., Xiao B. Structure deformation and curvature sensing of PIEZO1 in lipid membranes. *Nature*, 2022, Vol. 604, no. 7905, pp. 377-383.

98. Yong J., Li Y., Lin S., Wang Z., Xu Y. Inhibitors targeting YAP in gastric cancer: current status and future perspectives. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2021, Vol. 15, pp. 2445-2456.

99. Yuan D. J., Shi L., Kam L.C. Biphasic response of T cell activation to substrate stiffness. *Biomaterials*, 2021, Vol. 273, 120797. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120797.

100. Zagiel B., Melnyk P., Cotelle P. Progress with YAP/TAZ-TEAD inhibitors: a patent review (2018-present). *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2022, Vol. 32, no. 8, pp. 899-912. doi: 10.1080/13543776.2022.2096436.

101. Zhao B., Pobbati A.V., Rubin B.P., Stauffer S. Leveraging Hot Spots of TEAD-coregulator interactions in the design of direct small molecule protein-protein interaction disruptors targeting hippo pathway signaling. *Pharmaceuticals*, 2023, Vol. 16, no. 4, p. 583. doi: 10.3390/ph16040583.

102. Zhou Z., Martinac B. Mechanisms of PIEZO Channel Inactivation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 18, 14113. doi: 10.3390/ijms241814113.

103. Zhu B., Qian W., Han C., Bai T., Hou X. Piezo 1 activation facilitates cholangiocarcinoma metastasis via Hippo/YAP signaling axis. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2021, Vol. 24, pp. 241-252.
104. Zhuang C., Gould J.E., Enniful A., Shao S., Mak M. Biophysical and mechanobiological considerations for T-cell-based immunotherapy. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2023, Vol. 44, no. 6, pp. 366-378.
105. Zimmerman T., Blanco F. Inhibitors Targeting the LFA-1/ICAM-1 Cell-Adhesion Interaction: Design and Mechanism of Action. *Curr. Pharm. Des.*, 2008, Vol. 14, no. 22, pp. 2128-2139.
106. Zuidema A., Wang W., Sonnenberg A. Crosstalk between Cell Adhesion Complexes in Regulation of Mechanotransduction. *BioEssays*, 2020, Vol. 42, no. 11, 2000119. doi: 10.1002/bies.202000119.

Авторы:

Горшков Г.С. — студент, кафедра медицинской и биологической физики ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Быков А.С. — д.м.н., профессор, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Authors:

Gorshkov G.S., Student, Department of Medical and Biological Physics, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Bykov A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of the A. Vorobyov Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Science, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 05.04.2025
Отправлена на доработку 10.05.2025
Принята к печати 08.06.2025

Received 05.04.2025
Revision received 10.05.2025
Accepted 08.06.2025

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ СИМБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ ИММУННОЙ РЕГУЛЯЦИИ, ОПОСРЕДОВАННОЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТОЙ ПРИ COVID-19

Бухарин О.В.¹, Перунова Н.Б.^{1,2}, Тимохина Т.Х.², Костоломова Е.Г.², Паромова Я.И.², Иванова Е.В.¹, Полянских Е.Д.², Марков А.А.²

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук – обособленное структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

² ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Резюме. Современные исследования роли кишечной микробиоты у животных и человека показывают, что микроорганизмы являются важным фактором, определяющим здоровье хозяина, и участвуют в патогенезе различных инфекционных и неинфекционных заболеваний. В настоящее время активно исследуются механизмы формирования функциональной оси «кишечник – легкие» при новой коронавирусной инфекции COVID-19, где желудочно-кишечный тракт может являться входными воротами инфекции, указывая на вовлечение кишечной микробиоты в инфекционный процесс. С одной стороны, изменение микробиоты пациентов (дисбиоз), инфицированных вирусом SARS-CoV-2, является одним из факторов развития вторичной бактериальной инфекции, сепсиса, системного воспаления и полиорганной недостаточности. С другой стороны, нарушение микробиоты кишечника способствует развитию тяжелого течения и летального исхода у пациентов из-за двунаправленной связи кишечной микробиоты через систему иммунитета посредством цитокинов. Показана связь степени тяжести COVID-19 у пациентов с уровнем цитокинов и выявлением в кишечном биоценозе опре-

Адрес для переписки:

Костоломова Елена Геннадьевна
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54.
Тел.: 8 (3452) 20-00-61.
E-mail: lenakost@mail.ru

Address for correspondence:

Elena G. Kostolomova
Tyumen State Medical University
54 Odesskaya St
Tyumen
625023 Russian Federation
Phone: +7 (3452) 20-00-61.
E-mail: lenakost@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова, Т.Х. Тимохина, Е.Г. Костоломова, Я.И. Паромова, Е.В. Иванова, Е.Д. Полянских, А.А. Марков «Перспективы создания новых лечебно-профилактических средств на основе симбиотических штаммов бактерий для коррекции нарушений иммунной регуляции, опосредованной кишечной микробиотой при COVID-19» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 961-972.
doi: 10.15789/1563-0625-PON-2962

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

For citation:

O.V. Bukharin, N.B. Perunova, T.K. Timokhina, E.G. Kostolomova, Ya.I. Paromova, E.V. Ivanova, E.D. Polyanskiy, A.A. Markov “Prospectives of novel therapeutic and prophylactic medications based on symbiotic bacterial strains for correction of immune disorders mediated by intestinal microbiota in COVID-19”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 5, pp. 961-972.
doi: 10.15789/1563-0625-PON-2962

© Bukharin O.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-PON-2962

деленных видов «провоспалительных» или «противовоспалительных» бактерий. Иммунологические нарушения у пациентов с COVID-19 также опосредованы изменением профиля метаболома на фоне дисбиотических нарушений микробиоты. Связь между составом микробиоты кишечника, уровнями цитокинов и воспалительными маркерами позволяет предположить, что микробиом кишечника влияет на развитие и течение коронавирусной инфекции, а «симбиотический потенциал» нормобиоты может быть использован для разработки мер профилактики и реабилитации пациентов. Этому может способствовать развитие исследований в направлении проблемы симбиоза человека и микробиоты. Ряд ключевых механизмов изучения интеграции бифидобактерий и лактобацилл с хозяином, опосредованные системой иммунитета, гормонов и нейромедиаторов, открывают новые перспективы для медицины, включая получение новых пробиотических штаммов различной целевой установки для лечебно-профилактической коррекции нарушенных функций организма. Изучение микросимбиоза, как одного из векторов ассоциативного симбиоза, позволило разработать метод межмикробного распознавания «свой-чужой», где в качестве тестовой распознающей культуры используются бифидобактерии, т. к. для «своих» штаммов характерен синергизм (поддержка), тогда как при встрече с «чужой клеткой» – антагонизм. Именно этот фундаментальный механизм можно использовать при отборе «своих» для хозяина штаммов, пригодных для создания пробиотической композиции.

Ключевые слова: COVID-19, микробиота, ось «кишечник – легкие», симбиоз, бифидобактерии, иммунный ответ, пробиотики

PROSPECTIVES OF NOVEL THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC MEDICATIONS BASED ON SYMBIOTIC BACTERIAL STRAINS FOR CORRECTION OF IMMUNE DISORDERS MEDIATED BY INTESTINAL MICROBIOTA IN COVID-19

Bukharin O.V.^a, Perunova N.B.^{a,b}, Timokhina T.K.^b, Kostolomova E.G.^b, Paromova Ya.I.^b, Ivanova E.V.^a, Polyanskiy E.D.^b, Markov A.A.^b

^a Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Centre, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

^b Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. Recent studies on the role of intestinal microbiota in animals and humans show that the microorganisms are an important determinant of host health, participating in the pathogenesis of various infectious and non-infectious diseases. Currently, the effects of functional gut-lung axis are being actively investigated in the new coronavirus (COVID-19) infection. Gastrointestinal tract may be the point of entry for infection, suggesting involvement of intestinal microbiota in the infectious process. On the one hand, the changes in gut microbiota (dysbiosis) in SARS-CoV-2 patients may be among the factors contributing to development of secondary bacterial infection, sepsis, systemic inflammation and multi-organ failure. On the other hand, impaired gut microbiota contributes to severe clinical course and mortality in patients due to bidirectional coupling of the gut microbiota with immune system via cytokine network. The studies have shown a link between the severity of COVID-19 in patients, cytokine levels, and presence of distinct types of pro- and anti-inflammatory bacteria in the intestinal biotope. Immune abnormalities in COVID-19 patients are also mediated by altered metabolome profile associated with dysbiotic microbiota. The relations between gut microbiota composition, cytokine levels and inflammatory markers suggests that the gut microbiome may influence the progression of coronavirus infection. Therefore, the “symbiotic potential” of normobiotic microbiota may be used to develop prevention and rehabilitation strategies for the patients. This approach may be facilitated by the studies of human-microbiota symbiosis. A number of key mechanisms for studying the

integration of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* with the host mediated by the immune system, hormones and neurotransmitters are opening new perspectives for medicine, including development of differently targeted probiotic strains for therapeutic and preventative correction of impaired functions within the organism. The studies of microsymbiogenesis, being a vector of associative symbiosis have enabled a technical approach for intermicrobial “friend or foe identification”, where bifidobacteria are used as a diagnostic culture, since “friendly” strains are characterised by synergism (support). By contrary, encountering the “foreign cells” leads to antagonism. This fundamental mechanism may be used for choosing the “host-friendly” bacteria strains eligible for design of a probiotic compositions.

Keywords: COVID-19, microbiota, gut-lung axis, symbiosis, Bifidobacteria, immune response, probiotic

Introduction

The emergence of the new COVID-19 coronavirus infection has posed the problems connected to quick diagnostics and provision of health care to patients. Currently, intensive study of the clinical and epidemiological features of the disease and the development of new means of its prevention and treatment continues. In this regard, it is of interest to discuss the role of microbiota in the new COVID-19 coronavirus infection and the possibility of using symbiotic relations between humans and microbiota in the development of therapeutic and preventative measures.

The relation of patients’ gut microbiota with new COVID-19 coronavirus infection

Currently, the association of the gut microbiota with various human pathologies is receiving particular attention from researchers [20, 61, 62] due to the COVID-19 pandemic. A number of recent publications indicate that the severity of the course and consequences of COVID-19 are associated with the intestinal microbiota of infected patients [2, 16, 71].

SARS-CoV-2 virus can travel from the lungs to gastrointestinal biotopes [58]. It was found that coronavirus RNA was detected not only in respiratory secretions but also in the faeces of patients for more than one month after the onset of the disease [75]. In addition to acute respiratory syndrome, many patients with COVID-19 had extrapulmonary manifestations (nausea, vomiting, loss of appetite, diarrhoea) [14, 63], liver dysfunction and exacerbation of chronic inflammatory bowel disease [32]. Moreover, in some cases, signs of intestinal disorders in patients appeared even before pneumonia was detected [42].

The gastrointestinal tract is thought to play a key role in the development of infection, in particular through higher expression of ACE2 receptors on intestinal enterocytes compared to lung tissue cells [28, 40, 57, 76]. The binding of the virus to human ACE2 indicates that significant amounts of SARS-CoV-2 virus capable of regulating amino acid

transport, affecting the quantitative and qualitative composition of the intestinal microbiota and inducing inflammation may be present in the intestine, especially in colonocytes [30, 64]. All this confirms that the gastrointestinal tract may be the point of entry of infection and indicates the involvement of the intestinal microbiota in the infectious process in the new COVID-19 coronavirus infection and the formation of a functional gut-lung axis [4, 65]. The link between the gastrointestinal tract and the respiratory tract has also been shown in studies on the effect of respiratory viral infections on the composition of the intestinal microbiota with the subsequent development of intestinal dysbiosis [27]. Thus, patients with COVID-19 had significant microecological disorders in the large intestine compared to the control group, characterised by an increase in the proportion of opportunistic microorganisms associated with a decrease in the level of representatives of normal microbiota [21, 74]. It is noted that the composition of the gut microbiome was significantly altered in patients with COVID-19 compared to patients without the coronavirus infection, regardless of whether they were taking medication. Gut dysbiosis persisted even after SARS-CoV-2 was eliminated, and respiratory symptoms disappeared. A pilot study by Chinese scientists found changes in the gut microbiome in patients with COVID-19 compared with the control group, characterised by an increase in the number of fungal pathogens of the genus *Candida* and *Aspergillus* [3, 82].

To date, disruption of the gut microbiota is thought to contribute to the severe course and fatal outcome of novel COVID-19 coronavirus infection because of the bidirectional coupling of the gut microbiota with the immune and respiratory systems [3]. The formation of microecological disorders leads to increased permeability of the large intestine and, as a consequence, appears to be one of the factors in the development of secondary bacterial infection, sepsis, systemic inflammation and multi-organ failure [24, 52, 56]. Large intestinal dysbiosis has also been found to be associated with various chronic human

conditions such as asthma, arthritis, obesity and type 2 diabetes [4, 31, 67]. Previously, bacterial translocation from the gut to the lungs has been identified in sepsis and acute respiratory distress syndrome [17].

Immune regulation impairment mediated by intestinal microbiota in COVID-19

Changes in the microbiota of patients infected with SARS-CoV-2 virus are naturally accompanied by immunological rearrangements and the suppression of T-cell immunity [66, 81]. A number of researchers have shown a correlation between the severity of COVID-19 in patients and the level of cytokines, which, in turn, have been associated with the detection of certain types of “pro-inflammatory” or “anti-inflammatory” bacteria in the intestinal biotope [37, 43, 46, 51, 78], confirming the role of the microbiota in immune dysregulation. The composition of patients’ gut microbiota has been found to be associated with plasma concentrations of aspartate aminotransferase (AST), chemokine receptor (CXCL10), CRP and lactate dehydrogenase (LDH) [78]. On the other hand, the induction of mediators of the inflammatory cascade further aggravates gut dysbiosis by disrupting the immune homeostasis of the biotope and the relationship between the resident microbiota and the gut immune system, leading to excessive pathological inflammation or chronic inflammatory diseases. This is supported by a study of blood samples from COVID-19 patients which showed a correlation between gut dysbiosis, the increased quantity of inflammatory mediators and the severity of systemic inflammation [5, 36, 78].

Immunological disorders in patients with COVID-19 are also mediated by changes in the metabolome profile that occur naturally against the background of dysbiotic microbiota disorders [19]. Short-chain fatty acids (SCFAs), bile acids, amino acids, carbohydrates, and neurotransmitters are known to be among the significant immunoregulatory metabolites of the microbiota [34, 48]. Recent studies have demonstrated the ability of butyrate produced by the gut microbiota to affect the membrane receptor ACE2, inactivate viral spike protein and inhibit SARS-CoV-2 virus replication [41]. A decrease in or disappearance of butyrate-producing bacteria in the biotope, along with an increase in pro-inflammatory mediators (C-reactive protein, IL-6 and sIL2R), has been found in patients in severe and critical conditions [59]. Other studies have shown the ability of ursodeoxycholate produced by bacteria of the genus *Collinsella* to block virus attachment to ACE2 receptors [53] and inhibit pro-inflammatory cytokines [38], preventing the development of cytokine storm [1]. The blocking of cytokine storm was also found on the model of *Bacteroidetes* bacteria

through inhibition of toll-like receptor 4 (TLR4) and signalling pathways related to the ACE2 receptor [22, 70]. The disruption of the biosynthesis of SCFAs and L-isoleucine, associated with high levels of CRP and CXCL10 in plasma, was attributed to the disappearance of the bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* [44, 77, 79]. It was found that amino acids produced by bacteria were positively correlated with high levels of pro-inflammatory cytokines (CXCL9, CXCL10, IFN γ and IL-6) and negatively correlated with low levels of cytokines IL-9 and IL-17 in COVID-19. The content of biogenic amines had a positive correlation with low levels of cytokines CCL22, IL-12 and IL-13, but negatively correlated with high levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-10) [48]. Other microbial neurotransmitters such as tryptophan and polygamma-glutamic acid (gamma-PGA) stimulated dendritic cells to polarise CD4⁺ cells towards Th1 [29].

L.B. Giron et al. found a decrease in citrulline (a marker of intestinal function), an increase in succinic acid (a marker of dysbiosis) and an increase in the kynurenine/tryptophan ratio in severe COVID-19. Citrulline was inversely correlated with IL-6, while succinic acid level and kynurenine/tryptophan ratio were positively correlated with IL-6 concentration [26].

Disruption of intestinal barrier integrity is considered to be one of the key inducers of systemic inflammation in COVID-19, as it promotes translocation of microbial cells or their components into the systemic bloodstream and stimulation of proinflammatory cytokine secretion, and may lead to the development of a cytokine storm [55, 72]. Lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycan (PGN), zonulin, β -glucan and lipopolysaccharide binding protein (LBP) have been found to be indicators of intestinal barrier dysfunction in the plasma of COVID-19 patients associated with the regulation of immune response [25]. It is known that zonulin, β -glucan and LBP are positively correlated with factors of systemic inflammation and immune activation, including CRP, IL-6 and IL-10. In addition, increased permeability and microbial translocation may contribute to microbiota-mediated myeloid inflammation. As expected, levels of monocyte and neutrophil inflammatory markers (soluble CD14 (sCD14) and myeloperoxidase (MPO)) were elevated in the group of patients with severe COVID-19 compared to the group of patients with mild COVID-19 and the control group. In addition, plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines IFN γ , IL-6, IL-8, MCP-1, macrophage inflammatory protein MIP-1 α , MIP-1 β , and TNF α were elevated in COVID-19 patients [55].

Role of normal microbiota in the formation of biotope immune homeostasis

It is known that the physiological role of the gut microbiota, and, first of all, of the normal microbiota (bifido- and lactobacilli) is largely related to the ability of prokaryotes to regulate the development and function of the innate and adaptive human immune system [49]. Intestinal microsymbionts influence the secretion of antimicrobial peptides, pro- and anti-inflammatory cytokines, compete for nutrients and habitat, thus contributing to the maintenance of homeostasis [47]. One of the mechanisms of microbiota immune regulation is the ability to influence the production of a certain type of regulatory molecules – cytokines as growth factors and stimulation/suppression of their synthesis [15, 39]. Some pathogenic and opportunistic bacteria secrete enzymes that allow microorganisms to cleave basic types of organic macromolecules. It is known that signalling molecules of the intestinal microbiota (short-chain fatty acids such as butyrate, acetate, propionate, and secondary bile acids) are able to regulate pro- and anti-inflammatory responses in the human body [50]. Immune homeostasis of the intestine is regulated by T-reg cells which are ultimately controlled by members of the normal human microbiota (bifido- and lactobacilli) through the toll-like receptor (TLR) system and nucleotide binding receptors (NOD) [60]. Inactivation of cytokines (antipeptide activity) [3], which are the product of activated T-lymphocytes, macrophages, dendritic cells, may entail significant disturbances in the mechanisms of innate and adaptive immunity. The balance of these regulatory molecules is important for human homeostasis, as cytokines participate in the regulation of the immune response during infection [12]. The production of cytokines in response to the presence of microorganisms implies not only indirect (through the regulation of immunity), but also direct contact of bacteria with these signalling molecules. This fact has significance in the development of complications in the new COVID-19 coronavirus infection, since one of the mechanisms of pathogenesis is the generation of a cytokine storm. The excessive immune response to the virus (cytokine storm) eventually causes multi-organ failure and patient mortality; therefore, a balanced immune response is needed, where an over- or under-reactive immune system response may equally exacerbate complications such as pneumonia and ARDS in new COVID-19 coronavirus infection. Healthy gut microbiome may be critical for maintaining optimal immune system function.

The management of microecological disorders of intestinal microbiota via bifidobacteria and lactobacilli normalises immune reactions and may be one of

the ways to prevent complications, as well as reduce the risks of SARS-CoV-2 disease. Thus, administration of probiotic strains such as *Bifidobacterium lactis* to healthy elderly volunteers resulted in a significant increase in the proportion of mononuclear leukocytes and NK cells [23]. It is known that the composition of intestinal microbiota, primarily normobiota (bifido- and lactobacilli), has a great influence on the effectiveness of pulmonary immunity [6]. Animal experiments have shown that the ability to eliminate pathogens in the lungs was impaired in mice deprived of gut microbiota [18]. Disruption of the gut microbiota (dysbiosis) by the widespread use of antibiotics may also have an effect similar to that observed in population studies showing that inappropriate and uncontrolled use of antibacterial drugs such as penicillins, cephalosporins, macrolides and quinolones correlates with an increased risk of lung cancer in humans [7].

The use of probiotic medicines based on *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* cultures has demonstrated positive results in the realisation of anti-inflammatory and immunoregulatory response of the organism [73]. It was found that the administration of some strains of probiotic bacteria (*Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* and *Bifidobacterium breve*) to experimental animals promotes the proliferation of T-reg-lymphocytes, suppressing inflammatory and allergic reactions in the organism [20], and administration of lactobacilli (*Lacticaseibacillus casei* Shirota or *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG) to patients with cystic fibrosis leads to improvement of their condition [73].

Prospects for the development of targeted probiotics

It is now assumed that probiotic bacteria can be used for preventative or therapeutic purposes of inducing hormonal and immune changes in the body, since the participation of normobiotics (on the model of lactobacilli) in the regulation of the production of the neuropeptide hormone, oxytocin, has been proved [54, 69]. These studies are of interest because oxytocin is considered to be one of the possible candidates for the treatment of COVID-19. Oxytocin is known to be able to exert a dual action: to mobilise the immune defence potential and suppress excessive reactions of innate immunity, to limit pro-inflammatory (cytokine storm) and oxidative stress reactions by reducing cytokine levels. It has been suggested that even if oxytocin does not have a direct antiviral action, it still has sufficient mechanisms that may make it effective against COVID-19 through immunomodulatory, cardioprotective, antidiabetic and anabolic functions [35]. A number of studies have shown that some strains of normobiota (living cells

and their components) are able to stimulate oxytocin and have immunoregulatory activity [54].

Of particular interest for COVID-19 treatment and prevention is nitric oxide (NO), which is a key signalling molecule that acts as a modulator of the host response in viral infections [68, 80]. At the same time, the microbiota is one of the sources of nitric oxide production directly [45] or indirectly through the induction of immune cells [10].

One of the problems arising in the use of biological medicines (synbiotics, probiotics, etc.) is the gradual decrease in the level of their antagonistic activity [11, 26], which ultimately affects the therapeutic and preventive efficacy of drugs. Also, one of the reasons for the low levels of effectiveness or its absence of probiotics is their foreignness to microorganisms [13]. Currently, as an alternative, for the correction of human dysbiosis, it is proposed to use one's own strains of bifidobacteria (autostrains), that are biocompatible, due to which they effectively form a biofilm with other representatives of the indigenous microbiota under the conditions of microsymbiogenesis, in contrast to industrial strains of bacteria, which are not always able to colonise the human intestine [33].

When creating a consortium of microorganisms of probiotic action, bacterial strains are also selected without taking into account their biocompatibility in the composition, which can lead to suppression of microorganism viability and loss of their practically significant properties.

Two described biological universal phenomena of a fundamental nature contribute greatly to the solution of these problems: 1) associative symbiosis [9]; 2) bacterial persistence [8].

The study of microsymbiogenesis as one of the vectors of associative symbiosis allowed developing a method of intermicrobial "friend or foe" identification, where bifidobacteria are used as a diagnostic culture, since "friendly" strains are characterised by synergism (support), whereas encountering a "foreign cell" leads to antagonism. This fundamental mechanism may be used for choosing the "host-friendly" bacteria strains eligible for the creation of a probiotic composition. In this regard, one of the priority directions in the design of microbial compositions of pro- and synbiotics may be the use of the phenomenon of microbial "friend or

foe" identification, which has proven itself well for the assessment of foreignness of *E. coli* strains [12].

As for another fundamental phenomenon, persistent potential of bacteria which fulfils the role of a "microbial biotarget", these adaptation characteristics may be used to solve an equally important task, the assessment of biocompatibility of microbial cultures, since preliminary studies have shown their full suitability for the specified purpose. Based on the method of intermicrobial identification, the principle of biocompatibility of probiotic cultures of microorganisms was formulated based on the oppositional (amplification/suppression) phenomenon of regulatory relations of microsymbionts, where it is possible to apply quantitative determination of the degree of biocompatibility of cultures based on the adaptive potential (biofilm formation and anti-lysozyme test) of bacteria. Such a two-in-one combination – inclusion of biocompatibility assessment of microsymbionts with simultaneous determination of "friend-foe" – can form the basis for selection of probiotic strains and formation of new drug compositions based on them [10, 12].

Conclusion

Thus, modern studies of the role of intestinal microbiota in animals and humans show that the intestinal microbiota is an important factor determining health, influencing immunity, participating in the pathogenesis of various infectious and non-infectious diseases. The pronounced contribution of the intestinal microsymbiogenesis is realised through the maintenance of a number of physiological functions and the formation of homeostasis of the host organism. The association between gut microbiota composition, cytokine levels and inflammatory markers in COVID-19 patients suggests that the gut microbiome influences the severity of the course of coronavirus infection. A number of key mechanisms for studying the integration of bifidobacteria and lactobacilli with the host, mediated by the system of immunity, hormones and neurotransmitters, open new perspectives for medicine, including obtaining new probiotic strains of different targeting for therapeutic and prophylactic correction of disturbed body functions.

References

1. Abdulrab S., Al-Maweri S., Halboub E. Ursodeoxycholic acid as a candidate therapeutic to alleviate and/or prevent COVID-19-associated cytokine storm. *Med. Hypotheses*, 2020, Vol. 143, 109897. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109897.
2. Ahlawat S., Asha, Sharma K.K. Immunological co-ordination between gut and lungs in SARS-CoV-2 infection. *Virus Res.*, 2020, Vol. 286, 198103. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198103.
3. Aktas B., Aslim B. Gut-lung axis and dysbiosis in COVID-19. *Turk. J. Biol.*, 2020, Vol. 44, no. 3, pp. 265-272.

4. Aleman F.D.D., Valenzano D.R. Microbiome evolution during host aging. *PLoS Pathog.*, 2019, Vol. 1, no. 7, e1007727. doi: 10.1371/journal.ppat.1007727.
5. Aptekar I.A., Kostolomova E.G., Sukhovey Yu.G., Aptekar V.I., Abramova E.V. Change in the functional activity of fibroblasts in patients with coronavirus infection (history of SARS-CoV-2). *Russian Osteopathic Journal*, 2024, Vol. 1, pp. 67-77. (In Russ.)
6. Belkaid Y., Harrison O.J. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity*, 2017, Vol. 46, no. 4, pp. 562-576.
7. Bingula R., Filaire M., Radosevic-Robin N., Bey M., Berthon J.Y., Bernalier-Donadille A., Vasson M.P., Filaire E. Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. *J. Oncol.*, 2017, Vol. 2017, 5035371. doi: 10.1155/2017/5035371.
8. Boursi B., Mamtani R., Haynes K., Yang YX. Recurrent antibiotic exposure may promote cancer formation – Another step in understanding the role of the human microbiota? *Eur. J. Cancer*, 2015, Vol. 51, no. 17, pp. 2655-2664.
9. Bukharin O.V., Semenov A.V., Cherkasov S.V. Antagonistic activity of probiotic bacteria. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, Vol. 12, no. 4, pp. 347-352. (In Russ.)
10. Bukharin O.V. Persistence of pathogenic bacteria. Moscow: Meditsina, 199. 365 p.
11. Bukharin O.V., Lobakova E.S., Nemtseva N.V., Cherkasov S.V. Associative symbiosis. Ekaterinburg: UD RAS, 2007. 264 p.
12. Bukharin O.V., Perunova N.B., Ivanova E.V. Bifidoflora in human associative symbiosis. Ekaterinburg: UrD of the RAS, 2014. 212 p.
13. Bukharin O.V., Stadnikov A.A., Perunova N.B. Oxytocin and microbiota role in regulation of pro- and eukaryote interactions in infection. Ekaterinburg: UrD of the RAS, 2018. 247 p.
14. Chervinets Yu.V., Cervinets V.M., Mironov A.Yu. Symbiotic relationships of lactobacilli and microorganisms of the gastrointestinal tract. Tver: Tver State Medical University, 2016. 214 p.
15. Cheung K.S., Hung I.F.N., Chan P.P.Y., Lung K.C., Tso E., Liu R., Ng Y.Y., Chu M.Y., Chung T.W.H., Tam A.R., Yip C.C.Y., Leung K.H., Fung A.Y., Zhang R.R., Lin Y., Cheng H.M., Zhang A.J.X., To K.K.W., Chan K.H., Yuen K.Y., Leung W.K. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*, 2020, Vol. 159, no. 1, pp. 81-95.
16. Chung H., Pamp S.J., Hill J.A., Surana N.K., Edelman S.M., Troy E.B. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell*, 2012, Vol. 149, no. 7, pp. 1578-1593.
17. Dhar D., Mohanty A. Gut microbiota and Covid-19 – possible link and implications. *Virus Res.*, 2020, Vol. 285, 198018. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198018.
18. Dickson R.P., Singer B.H., Newstead M.W., Falkowski N.R., Erb-Downward J.R., Standiford T.J., Huffnagle G.B. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Nat. Microbiol.*, 2016, Vol. 1, no. 1, 16113. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.113.
19. Fagundes C.T., Amaral F.A., Vieira A.T., Soares A.C., Pinho V., Nicoli J.R., Vieira L.Q., Teixeira M.M., Souza D.G. Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 3, pp. 1411-1420.
20. Fan Y., Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021, Vol. 19, no. 1, pp. 55-71.
21. Feleszko W., Jaworska J., Rha R.D., Steinhausen S., Avagyan A., Jaudszus A., Ahrens B., Groneberg D.A., Wahn U., Hamelmann E. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2007, Vol. 37, no. 4, pp. 498-505.
22. Gaibani P., D'Amico F., Bartoletti M., Lombardo D., Rampelli S., Fornaro G., Coladonato S., Siniscalchi A., Re M.C., Viale P., Brigidi P., Turrone S., Giannella M. The gut microbiota of critically ill patients with COVID-19. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021 Vol. 11, 670424. doi: 10.3389/fcimb.2021.670424.
23. Geva-Zatorsky N., Sefik E., Kua L., Pasman L., Tan T.G., Ortiz-Lopez A., Yanortsang T.B., Yang L., Jupp R., Mathis D., Benoist C., Kasper D.L. Mining the human gut microbiota for immunomodulatory organisms. *Cell*, 2017, Vol. 168, no. 5, pp. 928-943.e11.
24. Gill H.S., Rutherford K.J., Cross M.L., Gopal P.K. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, Vol. 74, no. 6, pp. 833-839.
25. Gill H.S., Rutherford K.J., Cross M.L. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J. Clin. Immunol.*, 2001, Vol. 21, no. 4, pp. 264-271.
26. Giron L.B., Dweep H., Yin X., Wang H., Damra M., Goldman A.R., Gorman N., Palmer C.S., Tang H.Y., Shaikh M.W., Forsyth C.B., Balk R.A., Zilberstein N.F., Liu Q., Kossenkov A., Keshavarzian A., Landay A., Abdel-

Mohsen M. Plasma Markers of Disrupted Gut Permeability in Severe COVID-19 Patients. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 686240. doi: 10.3389/fimmu.2021.686240.

27. Glushanova N.A., Shenderov B.A. Relationships between the probiotic and host indigenous lactobacilli under the conditions of mixed cultivation in vitro. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2005, no. 2, pp. 56-61. (In Russ.)

28. Groves H.T., Cuthbertson L., James P., Moffatt M.F., Cox M.J., Tregoning J.S. Respiratory disease following viral lung infection alters the murine gut microbiota. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 182. doi: 10.3389/fimmu.2018.00182.

29. Gupta A., Madhavan M.V., Sehgal K., Nair N., Mahajan S., Sehrawat T.S., Bikdeli B., Ahluwalia N., Ausiello J.C., Wan E.Y., Freedberg D.E., Kirtane A.J., Parikh S.A., Maurer M.S., Nordvig A.S., Accili D., Bathon J.M., Mohan S., Bauer K.A., Leon M.B., Krumholz H.M., Uriel N., Mehra M.R., Elkind M.S.V., Stone G.W., Schwartz A., Ho D.D., Bilezikian J.P., Landry D.W. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 7, pp. 1017-1032.

30. Haase S., Haghikia A., Wilck N., Müller D.N., Linker R.A. Impacts of microbiome metabolites on immune regulation and autoimmunity. *Immunology*, 2018, Vol. 154, no. 2, pp. 230-238.

31. Hashimoto T., Perlot T., Rehman A., Trichereau J., Ishiguro H., Paolino M., Sigl V., Hanada T., Hanada R., Lipinski S., Wild B., Camargo S.M., Singer D., Richter A., Kuba K., Fukamizu A., Schreiber S., Clevers H., Verrey F., Rosenstiel P., Penninger J.M. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature*, 2012, Vol. 487, no. 7408, pp. 477-481.

32. Hufnagl K., Pali-Schöll I., Roth-Walter F., Jensen-Jarolim E. Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma. *Semin. Immunopathol.*, 2020, Vol. 42, no. 1, pp. 75-93.

33. Iacucci M., Cannatelli R., Labarile N., Mao R., Panaccione R., Danese S., Kochhar G.S., Ghosh S., Shen B. Endoscopy in inflammatory bowel diseases during the COVID-19 pandemic and post-pandemic period. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, 2020, Vol. 5, no. 6, pp. 598-606.

34. Il'in V.K., Suvorov A.N., Kiriukhina N.V., Usanova N.A., Starkova L.V., Boiarintsev V.V., Karaseva A.B. Autochthonous probiotics in prevention of infectious and inflammatory diseases of a human in the altered habitats. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2013, Vol. 2, pp. 56-62. (In Russ.)

35. Jabczyk M., Nowak J., Hudzik B., Zubelewicz-Szkodzińska B. Microbiota and Its Impact on the Immune System in COVID-19-A Narrative Review. *J. Clin. Med.*, 2021 Vol. 10, no. 19, 4537. doi: 10.3390/jcm10194537.

36. Jia W., Xie G., Jia W. Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2018, Vol. 15, no. 2, pp. 111-128.

37. Kasabri V., Shawakri E., Akour A., Naffa R., Khawaja N., Al-Sarraf I., Bzour J. Cross-sectional correlates of increased IL-18 but reduced fetuin-A and oxytocin with adiposity and blood indices in metabolic syndrome patients with and without prediabetes. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.*, 2018, Vol. 9, no. 12, pp. 329-338.

38. Katz-Agranov N., Zandman-Goddard G. Autoimmunity and COVID-19 – The microbiotal connection. *Autoimmun. Rev.*, 2021, Vol. 20, no. 8, 102865. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102865.

39. Khan M., Mathew B.J., Gupta P., Garg G., Khadanga S., Vyas A.K., Singh A.K. Gut dysbiosis and IL-21 response in patients with severe COVID-19. *Microorganisms*, 2021, Vol. 9, no. 6, 1292. doi: 10.3390/microorganisms9061292.

40. Koptuyg A., Sukhovei Y., Kostolomova E., Unger I., Kozlov V. Novel strategy in searching for natural compounds with anti-aging and rejuvenating potential. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 9, 8020. doi: 10.3390/ijms24098020.

41. Kostolomova E.G., Timokhina T.K., Perunova N.B., Polyanskikh E.D., Sakharov R.A., Komarova A.V. *In vitro* evaluation of immunomodulatory activity of *Bifidobacterium bifidum* 791 in the cell model of innate and adaptive immunity. *Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 213-218. (In Russ.) doi: 10.46235/1028-7221-1133-IVE.

42. Kostolomova E.G., Lozovaya P.B., Polyanskiy E.D., Timokhina T.Kh., Paromova Ya.I. Studying the anti-inflammatory activity of *Bifidobacterium bifidum* supernatants and chicken embryo cells on a model of opisthochic invasion. *Russian Journal of Immunology*, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 181-186. (In Russ.) doi: 10.46235/1028-7221-16675-STA.

43. Li J., Richards E.M., Handberg E.M., Pepine C.J., Raizada M.K. Butyrate Regulates COVID-19-relevant genes in gut epithelial organoids from normotensive rats. *Hypertension*, 2021, Vol. 77, no. 2, pp. 13-16.

44. Lin L., Jiang X., Zhang Z., Huang S., Zhang Z., Fang Z., Gu Z., Gao L., Shi H., Mai L., Liu Y., Lin X., Lai R., Yan Z., Li X., Shan H. Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection. *Gut*, 2020, Vol. 69, no. 6, pp. 997-1001.

45. Litvak Y., Byndloss M.X., Bäumlér A.J. Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science*, 2018, Vol. 362, no. 6418, eaat9076. doi: 10.1126/science.aat9076.

46. Mao X., Gu C., Ren M., Chen D., Yu B., He J., Yu J., Zheng P., Luo J., Luo Y., Wang J., Tian G., Yang Q. l-Isoleucine Administration Alleviates Rotavirus Infection and Immune Response in the Weaned Piglet Model. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1654. doi: 10.3389/fimmu.2018.01654.
47. Markov A.A., Kostolomova E.G., Timokhina T.Kh., Solovyev G.S., Paromova Ya.I., Polyanskih E.D., Voronin K.A. Effect of *Bifidobacterium bifidum* supernatant on the morphological and functional characteristics of human fibroblasts in real time during an *in vitro* experiment. *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 3, pp. 581-586. doi: 10.15789/1563-0625-EOB-2720.
48. Mizutani T., Ishizaka A., Koga M., Ikeuchi K., Saito M., Adachi E., Yamayoshi S., Iwatsuki-Horimoto K., Yasuhara A., Kiyono H., Matano T., Suzuki Y., Tsutsumi T., Kawaoka Y., Yotsuyanagi H. Correlation analysis between gut microbiota alterations and the cytokine response in patients with coronavirus disease during hospitalization. *Microbiol. Spectr.*, 2022, Vol. 10, no. 2, e0168921. doi: 10.1128/spectrum.01689-21.
49. Moens E., Veldhoen M. Epithelial barrier biology: good fences make good neighbours. *Immunology*, 2012, Vol. 135, no. 1, pp. 1-8.
50. Nagata N., Takeuchi T., Masuoka H., Aoki R., Ishikane M., Iwamoto N., Sugiyama M., Suda W., Nakanishi Y., Terada-Hirashima J., Kimura M., Nishijima T., Inooka H., Miyoshi-Akiyama T., Kojima Y., Shimokawa C., Hisaeda H., Zhang F., Yeoh Y.K., Ng S.C., Uemura N., Itoi T., Mizokami M., Kawai T., Sugiyama H., Ohmagari N., Ohno H. Human gut microbiota and its metabolites impact immune responses in COVID-19 and its complications. *Gastroenterology*, 2023, Vol. 164, no. 2, pp. 272-288.
51. Negi S., Das D.K., Pahari S., Nadeem S., Agrewala J.N. Potential role of gut microbiota in induction and regulation of innate immune memory. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2441. doi: 10.3389/fimmu.2019.02441.
52. Negi S., Pahari S., Bashir H., Agrewala J.N. Gut microbiota regulates mInCLE mediated activation of lung dendritic cells to protect against *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1142. doi: 10.3389/fimmu.2019.01142.
53. Nejadghaderi S.A., Nazemalhosseini-Mojarad E., Asadzadeh Aghdai H. Fecal microbiota transplantation for COVID-19; a potential emerging treatment strategy. *Med. Hypotheses*, 2021, Vol. 147, 110476. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110476.
54. Ostaff M.J., Stange E.F., Wehkamp J. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 10, pp. 1465-1483.
55. Poochi S.P., Easwaran M., Balasubramanian B., Anbuselvam M., Meyyazhagan A., Park S., Bhotla H.K., Anbuselvam J., Arumugam V.A., Keshavarao S., Kanniyappan G.V., Pappusamy M., Kaul T. Employing bioactive compounds derived from *Ipomoea obscura* (L.) to evaluate potential inhibitor for SARS-CoV-2 main protease and ACE2 protein. *Food Front.*, 2020, Vol. 1, no. 2, pp. 168-179.
56. Poutahidis T., Kearney S.M., Levkovich T., Qi P., Varian B.J., Lakritz J.R., Ibrahim Y.M., Chatzigiagkos A., Alm E.J., Erdman S.E. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 10, e78898. doi: 10.1371/journal.pone.0078898.
57. Prasad R., Patton M.J., Floyd J.L., Fortmann S., DuPont M., Harbour A., Wright J., Lamendella R., Stevens B.R., Oudit G.Y., Grant M.B. Plasma microbiome in COVID-19 subjects: an indicator of gut barrier defects and dysbiosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 16, 9141. doi: 10.3390/ijms23169141.
58. Proctor L.M. The Human Microbiome Project in 2011 and beyond. *Cell Host Microbe*, 2011, Vol. 10, no. 4, pp. 287-291.
59. Qi F., Qian S., Zhang S., Zhang Z. Single cell RNA sequencing of 13 human tissues identify cell types and receptors of human coronaviruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2020, Vol. 526, no. 1, pp. 135-140.
60. Qian Q., Fan L., Liu W., Li J., Yue J., Wang M., Ke X., Yin Y., Chen Q., Jiang C. Direct evidence of active SARS-CoV-2 replication in the intestine. *Clin. Infect. Dis.* 2021, Vol. 73, no. 3, pp. 361-366.
61. Reinold J., Farahpour F., Fehring C., Dolff S., Konik M., Korth J., van Baal L., Hoffmann D., Buer J., Witzke O., Westendorf A.M., Kehrmann J. A. Pro-Inflammatory Gut Microbiome Characterizes SARS-CoV-2 Infected Patients and a Reduction in the Connectivity of an Anti-Inflammatory Bacterial Network Associates With Severe COVID-19. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021, Vol. 11, 747816. doi: 10.3389/fcimb.2021.747816.
62. Round J.L., Mazmanian S.K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 9, no. 5, pp. 313-323.
63. Saad M.J., Santos A., Prada P.O. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. *Physiology*, 2016, Vol. 31, no. 4, pp. 283-293.
64. Sampson T.R., Debelius J.W., Thron T., Janssen S., Shastri G.G., Ilhan Z.E., Challis C., Schretter C.E., Rocha S., Gradinaru V., Chesselet M.F., Keshavarzian A., Shannon K.M., Krajmalnik-Brown R., Wittung-Stafshede P., Knight R., Mazmanian S.K. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell*, 2016, Vol. 167, no. 6, pp. 1469-1480, e12.

65. Sarkesh A., Daei Sorkhabi A., Sheykhsaran E., Alinezhad F., Mohammadzadeh N., Hemmat N., Bannazadeh Baghi H. Extrapulmonary clinical manifestations in COVID-19 patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2020, Vol. 103, no. 5, pp. 1783-1796.
66. Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo C., Aihara H., Geng Q., Auerbach A., Li F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, 2020, Vol. 581, no. 7807, pp. 221-224.
67. Song Y., Liu P., Shi X.L., Chu Y.L., Zhang J., Xia J., Gao X.Z., Qu T., Wang M.Y. SARS-CoV-2 induced diarrhoea as onset symptom in patient with COVID-19. *Gut*, 2020, Vol. 69, no. 6, pp. 1143-1144.
68. Sun Z., Song Z.G., Liu C., Tan S., Lin S., Zhu J., Dai F.H., Gao J., She J.L., Mei Z., Lou T., Zheng J.J., Liu Y., He J., Zheng Y., Ding C., Qian F., Zheng Y., Chen Y.M. Gut microbiome alterations and gut barrier dysfunction are associated with host immune homeostasis in COVID-19 patients. *BMC Med.*, 2022, Vol. 20, no. 1, 24. doi: 10.1186/s12916-021-02212-0.
69. Tai N., Wong F.S., Wen L. The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes mellitus and obesity. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2015, Vol. 16, no. 1, pp. 55-65.
70. Thibonnier M., Conarty D.M., Preston J.A., Plesnicher C.L., Dweik R.A., Erzurum S.C. Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology*, 1999, Vol. 140, no. 3, 1301-1319.
71. Varian B.J., Poutahidis T., DiBenedictis B.T., Levkovich T., Ibrahim Y., Didyk E., Shikhman L., Cheung H.K., Hardas A., Ricciardi C.E., Kolandaivelu K., Veenema A.H., Alm E.J., Erdman S.E. Microbial lysate upregulates host oxytocin. *Brain Behav. Immun.*, 2017, Vol. 61, pp. 36-49.
72. Vatanen T., Kostic A.D., d'Hennezel E., Siljander H., Franzosa E.A., Yassour M., Kolde R., Vlamakis H., Arthur T.D., Hämäläinen A.M., Peet A., Tillmann V., Uibo R., Mokurov S., Dorshakova N., Ilonen J., Virtanen S.M., Szabo S.J., Porter J.A., Lähdesmäki H., Huttenhower C., Gevers D., Cullen T.W., Knip M. DIABIMMUNE Study Group; Xavier R.J. Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. *Cell*, 2016, Vol. 165, no. 4, pp. 842-853.
73. Viana S.D., Nunes S., Reis F. ACE2 imbalance as a key player for the poor outcomes in COVID-19 patients with age-related comorbidities – Role of gut microbiota dysbiosis. *Ageing Res. Rev.*, 2020, Vol. 62, 101123. doi: 10.1016/j.arr.2020.101123.
74. Wang B., Zhang L., Wang Y., Dai T., Qin Z., Zhou F., Zhang L. Alterations in microbiota of patients with COVID-19: potential mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct. Target Ther.*, 2022, Vol. 7, no. 1, 143. doi: 10.1038/s41392-022-00986-0.
75. West C.E., Dzidic M., Prescott S.L., Jenmalm M.C. Bugging allergy; role of pre-, pro- and synbiotics in allergy prevention. *Allergol. Int.*, 2017, Vol. 66, no. 4, pp. 529-538.
76. Wu C., Xu Q., Cao Z., Pan D., Zhu Y., Wang S., Liu D., Song Z., Jiang W., Ruan Y., Huang Y., Qin N., Lu H., Qin H. The volatile and heterogeneous gut microbiota shifts of COVID-19 patients over the course of a probiotics-assisted therapy. *Clin. Transl. Med.*, 2021, Vol. 11, no. 12, e643. doi: 10.1002/ctm2.643.
77. Wu Y., Guo C., Tang L., Hong Z., Zhou J., Dong X., Yin H., Xiao Q., Tang Y., Qu X., Kuang L., Fang X., Mishra N., Lu J., Shan H., Jiang G., Huang X. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, 2020, Vol. 5, no. 5, pp. 434-435.
78. Xiao F., Tang M., Zheng X., Liu Y., Li X., Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*, 2020, Vol. 158, no. 6, pp. 1831-1833.e3.
79. Yao Y., Cai X., Fei W., Ye Y., Zhao M., Zheng C. The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2022, Vol. 62, no. 1, pp. 1-12.
80. Yeoh Y.K., Zuo T., Lui G.C., Zhang F., Liu Q., Li A.Y., Chung A.C., Cheung C.P., Tso E.Y., Fung K.S., Chan V., Ling L., Joynt G., Hui D.S., Chow K.M., Ng S.S.S., Li T.C., Ng R.W., Yip T.C., Wong G.L., Chan F.K., Wong C.K., Chan P.K., Ng S.C. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*, 2021, Vol. 70, no. 4, pp. 698-706.
81. Zhang F., Wan Y., Zuo T., Yeoh Y.K., Liu Q., Zhang L., Zhan H., Lu W., Xu W., Lui G.C.Y., Li A.Y.L., Cheung C.P., Wong C.K., Chan P.K.S., Chan F.K.L., Ng S.C. Prolonged impairment of short-chain fatty acid and L-isoleucine biosynthesis in gut microbiome in patients with COVID-19. *Gastroenterology*, 2022, Vol. 162, no. 2, pp. 548-561.e4.
82. Zhao Y., Liu Y., Li S., Peng Z., Liu X., Chen J., Zheng X. Role of lung and gut microbiota on lung cancer pathogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2021, Vol. 147, no. 8, pp. 2177-2186.
83. Zhdanova E.V., Rubtsova E.V., Kostolomova E.G. Clinical and immunological characteristics of post-COVID syndrome. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2024, Vol. 23, no. 2, pp. 46-54. (In Russ.)
84. Zhdanova E.V., Rubtsova E.V., Kostolomova E.G. Human body resistance dynamics in the post-covid period. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2024, Vol. 14, no. 4, pp. 747-755. doi: 10.15789/2220-7619-HBR-17659.
85. Zhou B., Pang X., Wu J., Liu T., Wang B., Cao H. Gut microbiota in COVID-19: new insights from inside. *Gut Microbes*, 2023, Vol. 15, no. 1, 2201157. doi: 10.1080/19490976.2023.2201157.

86. Zhou Y., Shi X., Fu W., Xiang F., He X., Yang B., Wang X., Ma W.L. Gut Microbiota Dysbiosis Correlates with Abnormal Immune Response in Moderate COVID-19 Patients with Fever. *J. Inflamm. Res.*, 2021, Vol. 14, pp. 2619-2631.

87. Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Safronova E.A., Zurochka V.A., Zuikova A.A., Sarapultsev G.P., Zabkov O.I., Mosunov A.A., Verkhovskaya M.D., Ducardt V.V., Fomina L.O., Kostolomova E.G., Ostankova Y.V., Kudryavtsev I.V., Totolian A.A. Alterations in T cell immunity over 6–12 months post-COVID-19 infection in convalescent individuals: a screening study. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2024, Vol. 14, no. 4, pp. 756-768. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-AIT-17646.

Авторы:

Бухарин О.В. — д.м.н., академик РАН, главный научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярной генетики Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленное структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Перунова Н.Б. — д.м.н., профессор РАН, заместитель директора по научной работе, ведущий научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярной генетики Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленное структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург; главный научный сотрудник лаборатории микробиома, регенеративной медицины и клеточных технологий Университетского научно-исследовательского института медицинских биотехнологий и биомедицины, ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Тимохина Т.Х. — д.б.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии Института фармации ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Костоломова Е.Г. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии Института фармации; научный сотрудник лаборатории геномики, протеомики и метаболомики Университетского научно-исследовательского института медицинских биотехнологий и биомедицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Паромова Я.И. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Authors:

Bukharin O.V., PhD, MD (Medicine), Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Head, Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetics, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Centre, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Perunova N.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Research, Leading Researcher, Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetics, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Centre, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg; Chief Researcher, Laboratory of Microbiome, Regenerative Medicine and Cell Technologies, University Research Institute of Medical Biotechnologies and Biomedicine, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Timokhina T.Kh., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Microbiology, Institute of Pharmacy, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Institute of Pharmacy; Researcher, Laboratory of Genomics, Proteomics and Metabolomics, University Research Institute of Medical Biotechnologies and Biomedicine, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Paromova Ya.I., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Institute of Pharmacy, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Иванова Е.В. — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник с исполнением обязанностей заведующего лабораторией инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленное структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Полянских Е.Д. — студент Института материнства и детства ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Марков А.А. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории геномики, протеомики, метаболомики, директор Университетского научно-исследовательского института медицинских биотехнологий и биомедицины; доцент кафедры медицинской профилактики и реабилитации Института общественного здоровья и цифровой медицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Ivanova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Head, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Centre, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Polyanskikh E.D., Student, Institute of Maternity and Childhood, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Markov A.A., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Genomics, Proteomics, Metabolomics, Director, University Research Institute of Medical Biotechnologies and Biomedicine; Associate Professor, Department of Medical Prevention and Rehabilitation, Institute of Public Health and Digital Medicine, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Поступила 15.02.2025
Отправлена на доработку 18.03.2025
Принята к печати 10.07.2025

Received 15.02.2025
Revision received 18.03.2025
Accepted 10.07.2025

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОКИСЛЕННОГО ДЕКСТРАНА ПРИ НАРУШЕНИЯХ СПЕРМАТОГЕНЕЗА ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ГЕНЕЗА

Чурина Е.Г.^{1,2}, Уразова О.И.¹, Новикова Е.Г.^{3,4}, Селятицкая В.Г.³,
Троицкий А.В.³, Быстрова Т.Н.³

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

² ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

³ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

⁴ ООО «Региональный Медико-Диагностический Центр», г. Новосибирск, Россия

Резюме. В статье обобщены экспериментальные и клинические данные о фармакологических свойствах окисленного декстрана. Основной акцент сделан на иммунологическом механизме действия окисленного декстрана, в частности на его способности селективно активировать тканевые макрофаги, в том числе тестикулярные макрофаги, которые непосредственно участвуют в сперматогенезе. В экспериментальной части работы на модели нарушения сперматогенеза у крыс индуцированного введением эндотоксина *Escherichia coli*, показано, что окисленный декстран значительно снижает патоморфологические изменения в семенниках. При этом подобный эффект связан с активацией тканевых макрофагов и выделения ими соответствующих цитокинов, которые направлены на купирование воспалительного процесса и нормализацию микроциркуляторной гемодинамики. Представленные экспериментальные данные коррелируют с данными о высокой клинической эффективности окисленного декстрана при нарушениях сперматогенеза и мужском бесплодии. В клинической части работы по влиянию ректального введения окисленного декстрана у пациентов с тяжелыми нарушениями сперматогенеза показано, что окисленный декстран существенно увеличивает объем эякулята, концентрацию сперматозоидов в эякуляте и общее количество сперматозоидов. При этом окисленный декстран также способствует снижению количества лейкоцитов при анализе спермограмм и существенно снижает агрегацию сперматозоидов, что свидетельствует о купировании хронич-

Адрес для переписки:

Чурина Елена Георгиевна
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2
Тел.: 8 (913) 806-07-00.
E-mail: lena1236@yandex.ru

Address for correspondence:

Elena G. Churina
Siberian State Medical University
2 Moskovsky Trakt
Tomsk
634050 Russian Federation
Phone: +7 (913) 806-07-00.
E-mail: lena1236@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, Е.Г. Новикова, В.Г. Селятицкая, А.В. Троицкий, Т.Н. Быстрова «Иммунологические механизмы терапевтической эффективности окисленного декстрана при нарушениях сперматогенеза инфекционно-воспалительного генеза» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 973-984.
doi: 10.15789/1563-0625-IMO-3137

© Чурина Е.Г. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.G. Churina, O.I. Urazova, E.G. Novikova, V.G. Selyatitskaya, A.V. Troitsky, T.N. Bystrova "Immunological mechanisms of therapeutic efficacy of oxidized dextran in spermatogenesis disorders of infectious and inflammatory genesis", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 5, pp. 973-984.
doi: 10.15789/1563-0625-IMO-3137

© Churina E.G. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IMO-3137

ческого инфекционно-воспалительного процесса у андрологических больных с бесплодием. Авторы связывают данные экспериментальных и клинических исследований в рамках единой концепции активации тканевых макрофагов и возможностью макрофагов менять свой фенотип в зависимости от микроокружения и особенностей течения инфекционно-воспалительного процесса. Такой подход подтверждается также клиническими данными о влиянии фенотипов макрофагов на лекарственную резистентность и тяжесть течения внутриклеточных инфекций, в частности туберкулеза. Анализ экспериментальных и клинических данных позволяет авторам предложить теоретическую модель механизма терапевтической эффективности окисленного декстрана при внутриклеточных инфекциях, которые наиболее часто встречаются в андрологической практике и являются триггерным фактором фатальных нарушений сперматогенеза, приводящих к мужскому бесплодию. Представленные авторами экспериментальные и клинические данные позволяют рассматривать окисленный декстран как весьма эффективное средство для лечения внутриклеточных инфекций, в том числе урогенитальных инфекций, вызывающих мужское бесплодие.

Ключевые слова: окисленный декстран, нарушения сперматогенеза, воспаление, инфекции, механизм действия, активация макрофагов, фенотипы макрофагов

IMMUNOLOGICAL MECHANISMS OF THERAPEUTIC EFFICACY OF OXIDIZED DEXTRAN IN SPERMATOGENESIS DISORDERS OF INFECTIOUS AND INFLAMMATORY GENESIS

Churina E.G.^{a,b}, Urazova O.I.^a, Novikova E.G.^{c,d}, Selyatitskaya V.G.^c, Troitsky A.V.^c, Bystrova T.N.^c

^a Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

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

^c Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

^d JSC Regional Medical Diagnostic Center, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The article summarizes experimental and clinical data on the immunological properties of oxidized dextran. The study addresses pathophysiological effects of oxidized dextran, in particular, its ability to selectively activate tissue macrophages, including testicular macrophages, which are directly involved in spermatogenesis. In experimental part of the work, a rat model of spermatogenesis disorders was produced by injection of *Escherichia coli* endotoxin. We have shown that oxidized dextran significantly reduces pathomorphological changes in the testes. At the same time, such effect is associated with the activation of tissue macrophages and release of corresponding cytokines, which exert anti-inflammatory effects and normalize microcirculatory hemodynamics. The presented experimental data correlate with the sufficient results on the high clinical efficacy of oxidized dextran in spermatogenesis disorders and male infertility. Clinical part of this work concerned the effects of rectal administration of oxidized dextran in patients with severe spermatogenesis disorders. It was shown that oxidized dextran significantly increases the volume of ejaculate, the concentration of spermatozoa in the ejaculate, and the total number of spermatozoa. The authors link the data of experimental and clinical studies within the framework of a single concept of tissue macrophage activation and the ability of macrophages to change their phenotype depending on the microenvironment and characteristics of the infectious and inflammatory process. This approach is also confirmed by clinical data on the effect of macrophage phenotypes on drug resistance and severity of intracellular infections, in particular, tuberculosis. Analysis of experimental and clinical data allows the authors to propose a theoretical model for the mechanism of therapeutic effectiveness of oxidized dextran in intracellular infections. The bulk of data presented by the authors allow us to consider oxidized dextran as a quite effective tool for the treatment of intracellular infections, including urogenital infections causing male infertility.

Keywords: oxidized dextran, spermatogenesis disorders, inflammation, infections, mechanism of action, macrophage activation, macrophage phenotypes

Введение

В настоящее время среди этиологических факторов нарушения сперматогенеза инфекционно-воспалительные процессы рассматриваются как наиболее распространенные. Причем это относится не только к урогенитальным инфекциям, но также и к любым хроническим инфекционным процессам, вызываемых как бактериями и патогенными грибами, так и вирусами. Уже установлена корреляция мужской фертильности с герпесом, который исходно протекает в хронической форме [3]. Имеются данные о нарушениях сперматогенеза после перенесенных острых респираторных вирусных инфекций, включая COVID-19 [1, 2]. В ряду внутриклеточных инфекций, оказывающих негативное влияние на сперматогенез, следует отметить, прежде всего, туберкулез и кандидоз [4, 10, 11]. Несмотря на морфологическое разнообразие инфекционных агентов, вызывающих нарушения сперматогенеза, от простейших вирусов до патогенных грибов можно выделить их общий характер влияния на иммунологический статус организма. В частности, речь идет о хронических воспалительных процессах, протекающих на фоне повышенной сенсibilизации с аутоиммунным компонентом в сочетании со снижением естественных механизмов иммунобиологической резистентности к инфекциям, в частности снижением активности клеточного звена иммунитета. Последнее, в основном, связано со снижением фагоцитарной активности макрофагов и незавершенностью фагоцитоза вследствие блокирования инфекционным агентом фагосома-лизосомального слияния в макрофагах. Если учесть, что макрофаги способны в зависимости от микроокружения менять свой фенотип с М1- (индукция преимущественно провоспалительных цитокинов) на М2-фенотип (индукция преимущественно противовоспалительных цитокинов), то становится очевидным, что поляризация макрофагального звена клеточного иммунитета может быть ключевым звеном при нарушениях сперматогенеза инфекционно-воспалительного генеза. При этом механизмы нарушения сперматогенеза могут носить как системный характер под влиянием цитокинового профиля крови, так и локальный статус на уровне герминативного эпителия яичек. Как известно, тестикулярные макрофаги являются важным звеном в процессе сперматогенеза, напрямую влияющими на сперматогенез. И в этом аспекте поляризация фенотипов тестикулярных макрофагов под действием измененного в результате инфекционно-воспалительного процесса системного характера цитокинового профиля может играть

доминирующую роль в нарушении сперматогенеза [14]. Если учесть, что оксид азота является стимулятором выработки тестостерона клетками Лейдига, то очевидно, что снижение активности популяции макрофагов в целом и тестикулярных макрофагов в частности является основным патофизиологическим механизмом хронизации инфекционно-воспалительного процесса и его негативного влияния на сперматогенез [14]. В связи с этим поиск эффективных и селективных активаторов макрофагов является весьма перспективным с патофизиологической точки зрения. В качестве перспективного фармакологического кандидата на роль активатора макрофагов с динамической поляризацией макрофагов для нас представлял интерес окисленный декстран. Окисленная форма декстрана проявляет высокую противовоспалительную активность, но при этом она не только усиливает фагоцитарную активность макрофагов, но и дополнительно повышает частоту фагосома-лизосомальных слияний в макрофагах, что крайне важно для эффективной борьбы с внутриклеточными инфекциями. Окисленная форма декстрана является основным биологически активным компонентом препарата «Андроксперт», который по имеющимся клиническим наблюдениям является эффективным средством лечения калькулезного простатита и восстановления сперматогенеза, особенно на фоне перенесенных инфекционно-воспалительных заболеваний [5]. Окисленная форма декстрана показала высокую лечебно-профилактическую активность в экспериментах *in vivo*, при системном воспалительном процессе, индуцированном внутрибрюшинным введением бактериального эндотоксина (липополисахарид (ЛПС) *Escherichia coli*) [9]. Есть данные, подтверждающие эффективность окисленного декстрана при туберкулезе, кандидозе и вирусных заболеваниях. Вместе с тем в настоящее время отсутствует единая концепция относительно механизма фармакологических эффектов окисленного декстрана. Предполагается, что триггерные механизмы активации макрофагов окисленным декстраном опосредованы через β -глюкановые рецепторы, локализованные в цитоплазматической мембране. Однако этот механизм может иметь место на уровне резидентных макрофагов и макрофагов, циркулирующих в крови. На уровне семенников возможен дополнительный механизм активации тестикулярных макрофагов за счет взаимодействия окисленного декстрана с асиалогликопротеиновыми (галактозными) рецепторами макрофагов, так как окисленный декстран наряду с карбонильными группами содержит и карбоксильные группы по типу сиало-

вых кислот. В качестве модели исследования особенностей поляризации фенотипов макрофагов при хроническом инфекционно-воспалительном процессе нами использованы иммунобиологические данные, полученные у больных туберкулезом, включая лекарственно резистентные формы. Данная модель позволяет наиболее полно, во взаимосвязи с фенотипами макрофагов, оценить основные патофизиологические особенности течения хронического инфекционно-воспалительного процесса с внутриклеточной персистенцией возбудителя заболевания, к которым относится не только *Mycobacterium tuberculosis*, но также и *Candida albicans*, *Ureaplasma species*, *Mycoplasma haemofelis*, а также практически все вирусы.

Цель данной работы — обобщить экспериментальные и клинические данные по фармакологическим свойствам окисленного декстрана в рамках концепции поляризации макрофагов для обоснования механизма лечебного действия окисленного декстрана при нарушениях сперматогенеза.

Материалы и методы

I. Клиническое исследование по поляризации макрофагов у больных туберкулезом

В качестве материала для исследования использовали образцы венозной крови 47 больных туберкулезом, 17 из которых имели лекарственно резистентную форму. Для выделения моноцитов из цельной крови с целью трансформации их в макрофаги использовали методику центрифугирования в градиенте фикола плотностью 1,077 г/см³, с последующим иммуномагнитным разделением CD14⁺ клеток. Моноциты культивировали в полной питательной среде X-VIVO 10 с гентамицином и феноловым красным с добавлением колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF) (5 нг/мл) в концентрации 1 × 10⁶ клеток/мл с таким содержанием стимуляторов, таких как интерлейкин (IL) 4 (10 нг/мл) и интерферон γ (IFN γ) (100 нг/мл). Иммунофенотипирование макрофагов проводили с использованием моноклональных антител к CD80, CD86, HLA-DR, CD163, CD204 и CD206 на проточном цитометре Beckman Coulter CytoFLEX LX. Полученные данные анализировали с помощью программного приложения CytExpert 2.0. Исходный уровень IL-4 (10 нг/мл; PerproTech, США) и IFN γ (100 нг/мл; PerproTech, США) — стимулировали уровни секреции IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β определяли с помощью иммуноферментного анализа ELISA. Полученные результаты были проанализированы с использованием статистических методов.

II. Клиническое исследование по оценке терапевтической эффективности окисленного декстрана в качестве селективного активатора макрофагов

В исследование включены 52 пациента с жалобами на отсутствие зачатия в паре более 1 года и с латентной фазой хронического простатита, когда отсутствовали общие признаки воспалительного процесса (температурная реакция, в анализах крови: лейкоцитоз, острофазные показатели), но было отмечено увеличение количества лейкоцитов в секрете простаты и эякуляте, ассоциированного с патоспермией. Возраст: 32±2,2 года.

Больные были обследованы по общепринятой схеме, включая информацию по сбору жалоб, данных анамнеза, общего осмотра и физикальных методов: были оценены основные витальные функции органов дыхания, кровообращения, желудочно-кишечного тракта (у всех они были — пределах возрастной нормы), а также — трансректальное пальцевое исследование простаты и пальпаторное исследование мошонки (в рамках объективного урологического обследования).

Пациенты были разделены на две репрезентативные группы: 1-я группа больных получала окисленный декстран ректально по схеме 1 раз в сутки в течение 10 дней, далее 20 дней через день; 2-я группа (группа сравнения) получала аналогичным образом плацебо в форме ректальных свечей, состоящих из масла какао.

Через 2 месяца от начала терапии пациенты сдавали спермограмму.

Оценку параметров эякулята выполняла международная сеть независимых клиничко-диагностических лабораторий в г. Новосибирске «СИТИ-ЛАБ» по рекомендациям ВОЗ 2010 года [7]: были описаны и проанализированы показатели спермограммы, отмеченные динамикой их величин в ходе лечебного процесса: объем эякулята (мл), концентрация сперматозоидов (млн/мл), общее количество сперматозоидов в эякуляте (млн), количество лейкоцитов (млн/мл), выраженность агглютинации сперматозоидов (в усл. ед.).

Исследование было одобрено 31.05.2021 (Выписка из протокола заседания ЛЭК ООО «Региональный Медико-Диагностический Центр», № 2/2021 от 31.05.2021).

Пациенты были включены в исследование с информированного согласия и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (ВМА, Эдинбург, Шотландия, 2000), с учетом изъясняющего примечания п. 29, одобренного Генеральной ассамблеей ВМА (Вашингтон, 2002).

Методы статистической обработки выбраны в зависимости от типа случайных величин. Для оценки типа распределения признаков использовали критерий Шапиро—Уилка. Результаты ана-

лиза непрерывных величин представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее и m – стандартная ошибка среднего. Значения качественных признаков представлены в виде наблюдаемых частот и процентов. В случаях нормального распределения, а также равенства дисперсий, для сравнения средних использовали t -критерий Стьюдента. Равенство дисперсий оценивали по F -критерию Фишера. При сравнении связанных выборок использовали парный t -критерий Стьюдента. Критический уровень статистической значимости принимали за 0,05. Сравнение качественных признаков в небольших группах наблюдений проводили, применяя критерий χ^2 Пирсона для четырехпольных таблиц сопряженности. Обработку и графическое представление данных осуществляли с помощью компьютерных программ Statistica 12.0 корпорации StatSoft (США) и Microsoft Office Excel, 2017 г. (США).

III. Экспериментальное исследование по оценке эффективности окисленного декстрана на модели ЛПС индуцированного нарушения сперматогенеза у крыс

Исследование выполнено на половозрелых особях крыс-самцов линии Wistar массой 180 – 200 г. Животные были разделены на 3 группы исследования по 5 животных:

1-я группа – крысы-самцы с однократным интраперитонеальным введением 2 мл 0,9%-ного раствора NaCl,

2-я группа – крысы-самцы с однократным интраперитонеальным введением ЛПС *E. coli* из расчета 50 мкг/кг массы тела,

3-я группа – крысы-самцы с однократным интраперитонеальным введением ЛПС *E. coli* из расчета 50 мкг/кг массы тела и интраперитонеальным введением 2 мл 2%-ного раствора окисленного декстрана.

Животных выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза на 3-и сутки после введения тестируемых веществ с соблюдением принципов гуманности директив Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации и в соответствии с требованиями правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Объектом гистологического исследования являлись фрагменты семенников крыс линии Wistar, которые фиксировали в нейтральном 10% буферном растворе формалина с последующей пробоподготовкой, изготовлением парафиновых блоков и гистологических стекол со срезами ткани семенников, окрашенными гематоксилином и эозином.

Визуализацию структурных изменений семенников осуществляли методом прямой свето-

вой микроскопии при увеличении $\times 200$. Морфометрическую оценку гистологических структур осуществляли в поперечных срезах извитых семенных канальцев с наиболее продвинутыми стадиями сперматогенеза в 10 произвольно взятых полях зрения при увеличении $\times 400$ с использованием морфометрической сетки на 100 точек площадью $3,64 \times 10^4$ мкм². При этом осуществляли подсчет численной плотности (N_{ai}) сперматозоидов в просвете канальца, ранних и поздних сперматид, сперматоцитов, сперматогоний, клеток Сертоли, клеток Лейдига, а также численную плотность (N_{ai}) сосудов перитубулярной зоны семенников, объемную плотность (V_v) интерстиция между извитыми семенными канальцами и объемную плотность (V_v) клеточной инфильтрации.

Исследование гистологических образцов осуществляли с помощью цифрового лабораторного светового оптического иммерсионного флуоресцентного поляризационного фазового микроскопа Olympus CX43 (Япония) с программным обеспечением для анализа изображений и фотоархивирования. Фотосъемку препаратов производили цифровой камерой MOTICAM S6 (Япония) с последующей обработкой изображения.

Помимо этого, определяли индекс созревания сперматогенных клеток – отношение суммы юных (сперматогонии, сперматоциты) и зрелых форм (сперматиды, сперматозоиды) сперматогенного эпителия.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программ Statistica и Excel. Оценку достоверности статистических различий между показателями аналогичных параметров осуществляли с использованием t -критерия Стьюдента. Достоверными считали отличия при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты

В I части клинического исследования было установлено, что тяжесть туберкулезного процесса зависит от поляризации макрофагов. Так, при исследовании цитокинового профиля макрофагов продемонстрировано снижение количества клеток, экспрессирующих маркер активации HLA-DR, при трансформации *in vitro* CD14⁺ моноцитов крови в макрофаги у больных туберкулезом, что свидетельствует о функциональной фенотипической поляризации макрофагов в направлении M2, а также в направлении M2. Нарушение способности клеток к презентации антигена. Эта способность не зависит от условий индукции клеток *in vitro* (M1-активация IFN γ или M2-активация IL-4), клинической формы заболевания или чувствительности к лекарственным средствам. Мы обнаружили, что нестимулиро-

ванная и индуцированная $IFN\gamma$ (M1-активация) и IL-4 (M2-активация) *in vitro* секреция IL-10 и провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6) макрофагами у больных туберкулезом была выше, чем у здоровых доноров. В то же время секреция TGF- β *in vitro* менялась разнонаправленно в зависимости от типа индукции макрофагов; секреция увеличивалась при M1-стимуляции и снижалась при M2-стимуляции клеток. Самый высокий уровень нестимулированной *in vitro* секреции IL-10 и TGF- β наблюдался у больных ДТБ. Кроме того, у больных ЛТБ и лекарственно-чувствительным туберкулезом (ЛЧ-ТБ) при трансформации макрофагов *in vitro* высокая секреция иммуносупрессивных цитокинов IL-10 и TGF- β положительно коррелирует с повышенной экспрессией скэвенджер-рецепторов CD163, CD204, CD206 на клетках, что соответствует регуляторному M2-фенотипу макрофагов. У больных ИТБ с лекарственно-устойчивым туберкулезом при трансформации макрофагов *in vitro* наблюдается высокий уровень экспрессии скэвенджер-рецепторов и молекул костимуляции CD80/CD86

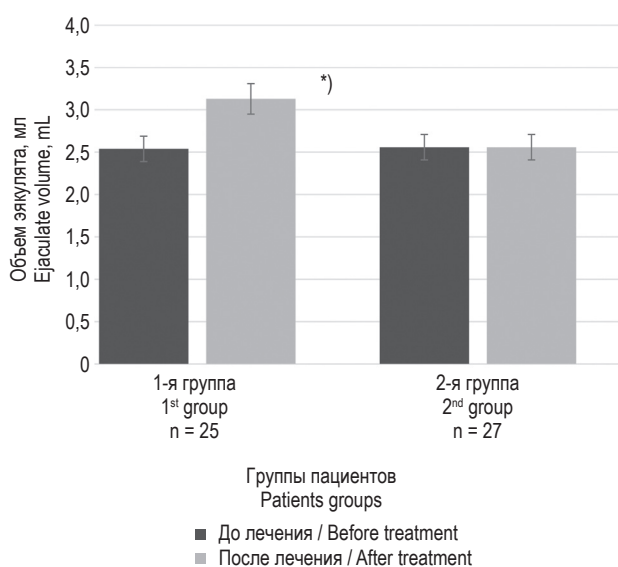


Рисунок 1. Динамика показателя объема эякулята (мл) при оценке результатов спермограммы в группах больных к окончанию лечения

Примечание. 1-я группа больных получала окисленный декстран ректально по схеме 1 раз в сутки в течение 10 дней, далее 20 дней через день; 2-я группа (группа сравнения) получала аналогичным образом плацебо в форме ректальных свечей, состоящих из масла какао.

Figure 1. Dynamics of the ejaculate volume index (ml) when evaluating the results of a spermogram in groups of patients at the end of treatment

Note. The 1st group of patients received oxidized dextran rectally according to the scheme 1 time per day for 10 days, then every other day for 20 days; the 2nd group (comparison group) similarly received a placebo in the form of rectal suppositories consisting of cocoa butter.

на клетках в связи с гиперсекрецией цитокинов с провоспалительным действием (IL-1 β , IL-6), и противовоспалительная (IL-10, TGF- β) активность свидетельствует о поляризации дифференцировки макрофагов в субпопуляцию клеток с M1- и M2-фенотипами. Таким образом, было подтверждено, что поляризационный иммунопатогенез дифференцировки макрофагов *in vitro* в клетки с противовоспалительным (M2) или смешанным (M1/M2) фенотипом при туберкулезе легких обусловлен секрецией макрофагами профильных про- и противовоспалительных цитокинов, активность которых зависит от клинической формы заболевания, а также чувствительности к препарату.

Конечно, прежде всего, данный феномен относится к циркулирующей в системном кровотоке популяции макрофагов. Однако следует учитывать, что цитокиновый профиль сыворотки крови может напрямую влиять на активность резидентных макрофагов в органах и тестикулярных макрофагов в частности и полученные результаты могут объяснить степень нарушения сперматогенеза в зависимости от тяжести заболевания у больных туберкулезом с учетом активности клеточного звена иммунитета.

Во II части клинического исследования было установлено, что окисленная форма декстрана, являющаяся селективным рецептор-опосредованным активатором макрофагов, входящая в состав препарата «Андрокссперт», является весьма эффективным средством восстановления сперматогенеза у больных калькулезным простатитом. Как известно, в генезе калькулезного простатита инфекционно-воспалительный процесс является классическим триггерным механизмом воспаления предстательной железы, которое в динамике приводит к нарушению сперматогенеза и фертильности.

Объем эякулята среди больных 1-й группы увеличился с $2,54 \pm 0,15$ до $3,13 \pm 0,18$ (мл), что составило 23,23 %; * $p < 0,05$ (рис. 1).

Показатель концентрации сперматозоидов вырос с $26,40 \pm 4,18$ до $41,12 \pm 5,37$ (млн/мл) – на 55,75%; $p < 0,05$ (рис. 2), что привело к увеличению общего количества сперматозоидов в эякуляте на 88,5%, с $65,47 \pm 8,41$ до $123,41 \pm 12,33$ (млн шт.); * $p < 0,05$ (рис. 3).

Количество лейкоцитов в этой же группе уменьшилось в 2,8 раза: с $1,25 \pm 0,17$ до $0,44 \pm 0,10$ (млн/мл) – на 64,80%; * $p < 0,05$ (рис. 4).

Показатель выраженности агглютинации сперматозоидов сократился в 3 раза: с $0,52 \pm 0,07$ до $0,17 \pm 0,03$ – на 0,35 усл. ед., что ставило 67,31 %; * $p < 0,05$ (рис. 5).

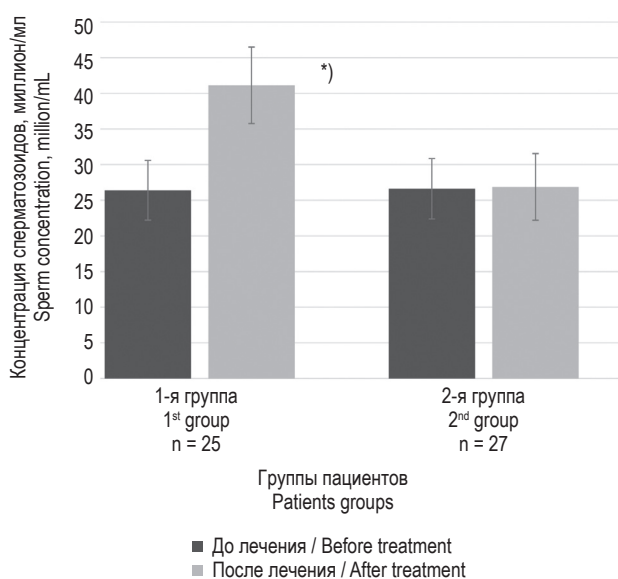


Рисунок 2. Динамика показателя концентрации сперматозоидов (млн/мл) при оценке результатов спермограммы в группах больных к окончанию лечения

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Dynamics of the indicator of sperm concentration (million/mL) when evaluating the results of a spermogram in groups of patients at the end of treatment

Note. As for Figure 1.

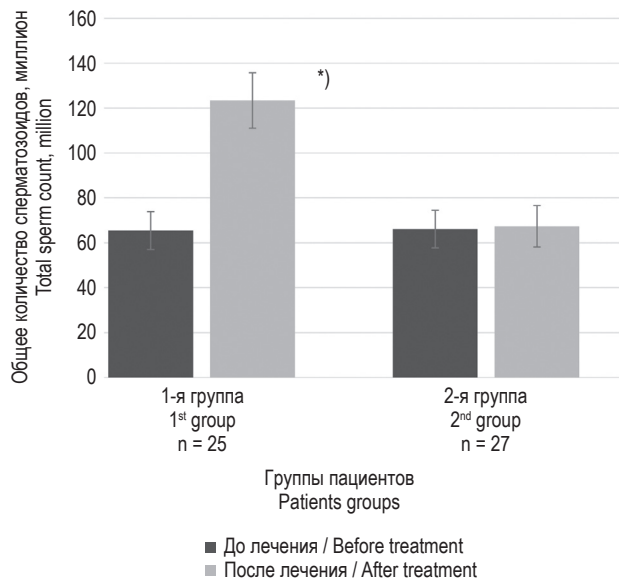


Рисунок 3. Динамика показателя общего количества сперматозоидов (млн) при оценке результатов спермограммы в группах больных к окончанию лечения

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Dynamics of the indicator of the total number of spermatozoa (million) when evaluating the results of a spermogram in groups of patients at the end of treatment

Note. As for Figure 1.

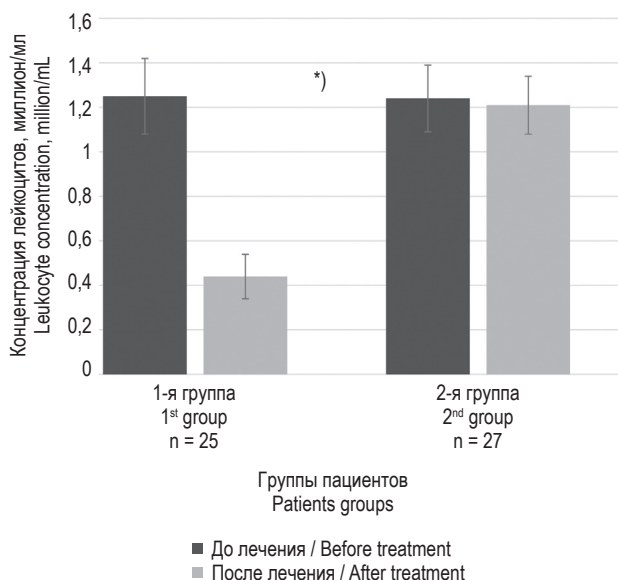


Рисунок 4. Динамика показателя количества лейкоцитов (млн/мл) при оценке результатов спермограммы в группах больных к окончанию лечения

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 4. Dynamics of the indicator of the number of leukocytes (million/mL) when evaluating the results of a spermogram in groups of patients at the end of treatment

Note. As for Figure 1.

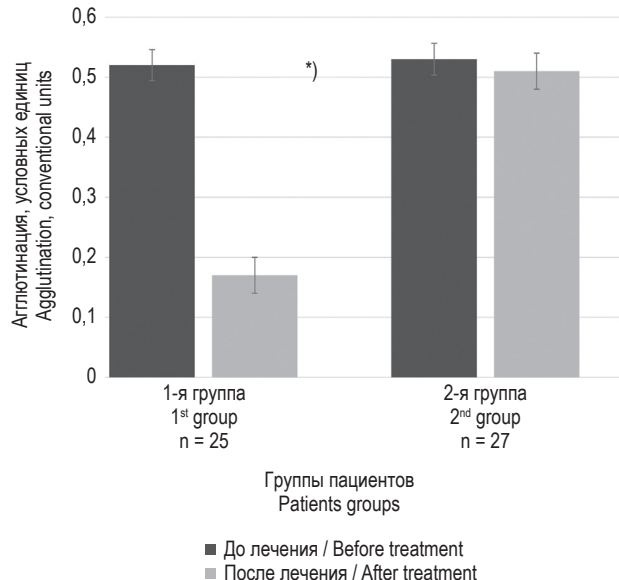


Рисунок 5. Динамика показателя агглютинации семенной жидкости (усл. ед.) при оценке результатов спермограммы в группах больных к окончанию лечения

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 5. Dynamics of seminal fluid agglutination index (conditional units) when evaluating spermogram results in groups of patients at the end of treatment

Note. As for Figure 1.

Обсуждение

Положительное влияние свечей «АНДРО-ЭКСПЕРТ SV1» на сперматогенез у мужчин с хроническим простатитом, ассоциированным с вторичным бесплодием, обусловлено, вероятно, не только противовоспалительной активностью окисленного декстрана, но и его опосредованным «гонадотропоподобным действием». Этот эффект связан не со стимуляцией пролиферации сперматогониев, а с улучшением трофики тканей репродуктивных органов. При инфекционно-воспалительных процессах и индуцированном ими хроническом воспалении нарушается нормальная трофика тканей простаты и тестикул и, как следствие, — изменение эякулята и нарушение сперматогенеза. Ключевыми патогенетическими факторами патоспермии являются образование микротромбов в капиллярном русле тестикул, гипоксия и генерация клетками большого количества активных форм кислорода, оказывающих повреждающее действие на клеточные мембраны. В условиях такого микроокружения нормальный сперматогенез невозможен. Окисленный декстран через гликановые рецепторы активирует макрофаги, локализованные в венозно-лимфатическом русле малого таза, включая активацию тестикулярных макрофагов. В результате такой активации тестикулярные макрофаги способны более эффективно фагоцитировать патогенные микроорганизмы, поддерживающие хроническое воспаление, экспрессировать и выделять во внеклеточную среду противовоспалительные цитокины, в том числе и тканевые протеиназы, которые обладают тромболитическим действием и восстанавливают нормальную гемодинамику в капиллярах, устраняя гипоксию и снижая выработку токсичных активных форм кислорода [13]. Кроме того, установлено, что активированные макрофаги яичек выделяют 2,5-гидроксистерол, стерол, который может быть преобразован в тестостерон клетками Лейдига [12] и тем самым улучшать их сперматогенную функцию.

Одним из показателей жизнеспособности сперматозоидов является степень их агглютинации, которая зависит от качества семенной жидкости и иммунного статуса самих сперматозоидов. Достоверное снижение агглютинации, наряду с улучшением вышеперечисленных показателей, свидетельствуют о повышении секреторной активности половых желез, улучшении процесса сперматогенеза и повышении мужской фертильности в целом.

Уменьшение количества лейкоцитов в семенной жидкости больных этой же группы к окон-

чанию курса свидетельствует о наличии противовоспалительной активности окисленного декстрана, которая была показана нами ранее в экспериментах на животных (при моделировании гиперплазии простаты и бронхолегочной патологии) [6, 9] и обусловлена, главным образом, активацией макрофагов.

В экспериментальной части исследования на модели нарушения сперматогенеза, у крыс линии Wistar, индуцированного ЛПС *E. coli* было установлено, что окисленный декстран обладает высокой профилактической активностью, снижая морфологические критерии нарушения сперматогенеза (табл. 1).

Оценивая интегрально гистологическую картину по всем 3 группам животных и представленные в таблице 1 морфометрические данные можно однозначно утверждать, что через 3 суток после интраперитонеального введения ЛПС *E. coli* у крыс наблюдается отчетливая тенденция к снижению всех основных параметров сперматогенеза в сочетании с элементами асептического воспаления в виде отека интерстиции, полнокровия и клеточной инфильтрации. Данные изменения носят умеренный характер ввиду того, что в эксперименте использовалась низкая доза ЛПС *E. coli*, которая не приводит к фатальным нарушениям сперматогенеза, но позволяет оценить динамику патологического процесса при его коррекции окисленным декстраном. Так, у крыс 3-й группы, которым сразу же после интраперитонеального введения ЛПС *E. coli* вводили 2%-ный раствор окисленного декстрана в сравнении с животными 2-й группы, все показатели сперматогенеза были выше. Подобная тенденция наиболее отчетливо проявляется по показателю численной плотности сперматозоидов в просвете канальца, который в 3-й группе животных практически приближается к значению показателя в 1-й группе и значительно выше, чем у животных 2-й группы. При этом следует отметить, что у животных 3-й группы, в сравнении с животными 2-й группы, морфологические проявления гемодинамических нарушений в виде отека интерстиции выражены в меньшей степени. Однако показатели объемной плотности клеточной инфильтрации интерстиция между извитыми семенными канальцами и численной плотности сосудов межканальцевой зоны семенников у животных 3-й группы, напротив несколько выше, чем у животных 2-й группы, что может свидетельствовать об улучшении местного кровотока и активации резидентных тестикулярных макрофагов в ответ на индуцированное интраперитонеальное введение ЛПС *E. coli*. Подобная динамика может сви-

ТАБЛИЦА 1. СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕМЕННИКОВ БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ В/Б ВВЕДЕНИЯ ЛПС *E. coli* И ИХ ПРОФИЛАКТИКА В/Б ВВЕДЕНИЕМ 2%-НОГО РАСТВОРА ОКИСЛЕННОГО ДЕКСТРАНА ($M \pm m$)

TABLE 1. STRUCTURAL CHANGES IN THE TESTES OF WHITE RATS AFTER INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF *E. coli* LPS AND THEIR PREVENTION BY INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF A 2% SOLUTION OF OXIDIZED DEXTRAN 40 kDa ($M \pm m$)

| Параметры Options | | Группы исследования Study groups | | |
|--|--|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | | 1-я группа 1 st group | 2-я группа 2 nd group | 3-я группа 3 rd group |
| Численная плотность, Nai Numerical density, Nai | извитых семенных канальцев convoluted seminiferous tubules | 30,83±1,37 | 29,94±1,86 | 32,98±1,86 |
| | клеток Сертоли sertoli cell | 20,89±1,26 | 17,52±1,24 ^α | 18,87±1,45 |
| | клеток Лейдига leydig cells | 11,23±1,39 | 10,75±1,15 | 13,87±1,47 ^β |
| | сперматоцитов spermatocytes | 38,74±1,26 | 29,80±1,25 ^α | 37,29±1,47 ^β |
| | сперматогоний spermatogonia | 48,97±1,35 | 39,71±1,53 | 49,34±1,38 |
| | сперматид spermatid | 33,14±1,52 | 24,81±1,46 ^α | 27,79±1,74 ^α |
| | сперматозоидов в просвете канальца spermatozoa in the lumen of the tubule | 300,87±15,23 | 239,71±11,35 ^α | 299,64±13,32 ^β |
| | сосудов перитубулярной зоны семенников vessels of the peritubular zone of the testes | 7,98±0,62 | 9,28±0,74 | 11,21±1,23 ^α |
| Объемная плотность, Vv Bulk density, Vv | межканальцевой интерстициальной ткани intertubular interstitial tissue | 8,25±0,87 | 12,74±1,24 ^α | 10,47±1,20 ^β |
| | клеточной инфильтрации интерстиция между извитыми семенными канальцами cellular infiltration of the interstitium between the convoluted seminiferous tubules | — | 5,64±0,32 | 7,12±0,46 ^β |

Примечание. ^α – достоверность отличий величин аналогичных параметров от показателей 1-й группы; ^β – достоверность отличий величин аналогичных параметров между показателями 2-й и 3-й групп. При $p \leq 0,05$.

Note. ^α, reliability of differences in the values of similar parameters from the indicators of group 1; ^β, reliability of differences in the values of similar parameters between indicators of groups 2 and 3. At $p \leq 0.05$.

детельствовать о том, что окисленный декстран в условиях эксперимента проявляет умеренное противовоспалительное действие, которое ранее было детально изучено на различных моделях *in vivo*. Надо отметить, что в данной модели *in vivo* нарушение сперматогенеза носит не прямой, а в большей степени, опосредованный характер, вследствие острой иммунологической реакции

на интраперитонеальное введение ЛПС *E. coli* по типу системного асептического воспаления.

Выводы

Полученные экспериментальные и клинические данные позволяют оценить возможность использования окисленного декстрана в качестве перспективного средства профилактики

и коррекции нарушений сперматогенеза, обусловленных действием инфекционных агентов бактериальной и/или вирусной этиологии. В качестве наиболее вероятного иммунологического механизма эффективности окисленного декстрана при нарушениях сперматогенеза можно рассматривать его способность к рецепторопосредованной активации макрофагов, которая может сопровождаться их фенотипической поляризацией, определяющей положительную

динамику клинического течения хронических инфекционно-воспалительных процессов, ассоциированных с андрологической патологией. Однако механизмы реализации положительных протективных свойств окисленного декстрана в отношении нарушений сперматогенеза, обусловленного повреждением ткани семенников патологическими агентами инфекционной этиологии, нуждаются в дальнейшем комплексном подробном изучении.

Список литературы / References

1. Адамян Л.В., Елагин В.В., Киселева Ю.Ю., Вечорко В.И., Степанян А.А., Дашко А.А., Дорошенко Д.А. Влияние COVID-19 и других вирусных инфекций на мужскую фертильность (обзор литературы) // Проблемы репродукции, 2020. Т. 26, № 6. С. 77-82. [Adamyan L.V., Elagin V.V., Kiseleva Yu.Yu., Vechorko V.I., Stepanian A.A., Dashko A.A., Doroshenko D.A. Impact of COVID-19 and other viral infections on male fertility (literature review). *Problemy reproduktivnoy = Russian Journal of Human Reproduction*, 2020, Vol. 26, no. 6, pp. 77-82 (In Russ.)]
2. Демяшкин Г.А., Коган Е.А., Ходжаян А.Б., Демура Т.А., Гевандова М.Г., Щекин В.И., Зорин И.А., Болдырев Д.В. Влияние SARS-CoV-2-инфекции на мужскую и женскую репродуктивную систему (метаанализ) // Медицинский вестник Северного Кавказа, 2020. Т. 15, № 4. С. 582-586. [Demyashkin G.A., Kogan E.A., Hodzhayan A.B., Demura T.A., Gevandova M.G., Shhekin V.I., Zorin I.A., Boldyrev D.V. Effect of SARS-CoV-2 infections on the male and female reproductive system (meta-analysis). *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*, 2020, Vol. 15, no. 4, pp. 582-586. (In Russ.)]
3. Ковалык В.П., Гомберг М.А., Брагина Е.Е., Юрлов К.И., Куц А.А. Роль герпесвирусов при мужском бесплодии // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение, 2021. Т. 5, № 3. С. 123-129. [Kovalyk V.P., Gomberg M.A., Bragina E.E., Yurlov K.I., Kushch A.A. The role of herpes viruses in male infertility. *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Meditsinskoye obozreniye = Russian Medical Journal. Medical Review*, 2021, Vol. 5, no. 3, pp. 123-129. (In Russ.)]
4. Кульчавеня Е.В. Туберкулез предстательной железы и сексуальные проблемы при туберкулезе // Вестник урологии, 2014. № 3. С. 20-49. [Kulchavenya E.V. Tuberculosis of the prostate and sexual problems in tuberculosis. *Vestnik urologii = Bulletin of Urology*, 2014, no. 3, pp. 20-49. (In Russ.)]
5. Новикова Е.Г., Троицкий А.В., Ука Г.У. Применение ректальных свечей с окисленным декстраном при калькулезном простатите // Урология, 2021. № 6. С. 127-129. [Novikova E.G., Troitskiy A.V., Uka G.U. The use of rectal suppositories with oxidised dextran for calculous prostatitis. *Urologiya = Urologiya*, 2021, no. 6, pp. 127-129. (In Russ.)]
6. Новикова Е.Г., Троицкий А.В., Ука Г.У., Селятицкая В.Г. Экспериментальное исследование эффективности ректальных свечей с окисленным декстраном при гиперплазии предстательной железы // Урология, 2021. № 5. С. 59-61. [Novikova E.G., Troitskiy A.V., Uka G.U., Selyaticzkaya V.G. Experimental study on the efficiency of rectal suppositories with oxidized dextran in patients with benign prostatic hyperplasia. *Urologiya = Urologiya*, 2021, no. 5, pp. 59-61. (In Russ.)]
7. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека / Пер. с англ. Н.П. Макарова; Науч. ред. рус. пер. Л.Ф. Курило. 5-е изд. М.: Капитал Принт, 2012. 291 с. [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen/ Translated from English by N.P. Makarova; Scientific editor of the Russian translation L.F. Kurilo. 5th ed]. Moscow: Kapital Print, 2012. 291 p.
8. Сапожкова Ж.Ю., Милованова Г.А., Пацап О.И. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. Маркеры и методы. Часть II // Лабораторная и клиническая медицина. Фармация, 2021. Т. 1, № 2. С. 65-79. [Sapozhkova Zh.Yu., Milovanova G.A., Patsap O.I. Laboratory diagnostics of male infertility. Biomarkers and methods. Part II. *Laboratornaya i klinicheskaya meditsina. Farmatsiya = Laboratory and Clinical Medicine. Pharmacy*, 2021, Vol. 1, no. 2, pp. 65-79. (In Russ.)]
9. Троицкий А.В., Черданцева Л.А., Быстрова Т.Н., Новикова Е.Г., Ука Г.У., Гришин О.В., Лядов Е.А. Перспективы применения окисленного декстрана для профилактики вирусных пневмоний и фиброза легких // Медицинский альянс, 2021. Т. 9, № 4. С. 45-53. [Troitskiy A.V., Cherdantseva L.A., Bystrova T.N., Novikova E.G., Uka G.U., Grishin O.V., Lyadov E.A. Prospects for the use of oxidized dextran for the prevention of viral pneumonia and pulmonary fibrosis. *Meditsinskiy alyans = Medical Alliance*, 2021, Vol. 9, no. 4, pp. 45-53. (In Russ.)]

10. Щербань М.Н. Влияние противотуберкулезной и простатотропной терапии на репродуктивную систему мужчин, страдающих туберкулезом легких // Сибирский медицинский журнал, 2008. № 2. С. 42-44. [Shcherban M.N. Influence of antitubercular and prostatotropic therapies on reproductive system of men with tuberculosis of lungs. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2008, no. 2, pp. 42-44. (In Russ.)]
11. Burrello N., Salmeri M., Perdichizzi A., Bellanca S., Pettinato G., D'Agata R., Vicari E., Calogero A.E. Candida albicans experimental infection: effects on human sperm motility, mitochondrial membrane potential and apoptosis. *Reprod. Biomed. Online*, 2009, Vol. 18, no. 4, pp. 496-501.
12. Lukyanenko Y.O., Chen J.J., Hutson J.C. Production of 25-hydroxycholesterol by testicular macrophages and its effects on Leydig cells. *Biol. Reprod.*, 2001, Vol. 64, no. 3, pp. 790-796.
13. Figueiredo A.F.A., Wnuk N.T., Vieira C.P., Gonçalves M.F.F., Brener M.R.G., Diniz A.B., Antunes M.M., Castro-Oliveira H.M., Menezes G.B., Costa G.M.J. Activation of C-C motif chemokine receptor 2 modulates testicular macrophages number, steroidogenesis, and spermatogenesis progression. *Cell Tissue Res.*, 2021, Vol. 386, no. 1, pp. 173-190.
14. Yu W., Zheng H., Lin W., Tajima A., Zhang Y., Zhang X., Zhang H., Wu J., Han D., Rahman N.A., Korach K.S., Gao G.F., Inoue I., Li X. Estrogen promotes Leydig cell engulfment by macrophages in male infertility. *J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 124, no. 6, pp. 2709-2721.

Авторы:

Чурина Е.Г. — д.м.н., профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры природных соединений, медицинской и фармацевтической химии ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия

Уразова О.И. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Новикова Е.Г. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории эндокринологии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»; врач — уролог-андролог ООО «Региональный Медико-Диагностический Центр» г. Новосибирск, Россия

Authors:

Churina E.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University; Professor, Department of Natural Compounds, Medical and Pharmaceutical Chemistry, National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

Urazova O.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Novikova E.G., PhD (Medicine), Senior Researcher, Endocrinology Laboratory, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine; Urologist-Andrologist, JSC Regional Medical and Diagnostic Center, Novosibirsk, Russian Federation

Селятицкая В.Г. — д.б.н., профессор, директор Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Троицкий А.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории биосовместимых наночастиц, наноматериалов и средств адресной доставки ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Быстрова Т.Н. — научный сотрудник лаборатории биосовместимых наночастиц, наноматериалов и средств адресной доставки ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Selyatitskaya V.G., PhD, MD (Biology), Professor, Director, Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Troitsky A.V., PhD (Medicine), Leading Researcher, Head, Laboratory of Biocompatible Nanoparticles, Nanomaterials and Targeted Delivery Systems, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Bystrova T.N., Researcher, Laboratory of Biocompatible Nanoparticles, Nanomaterials and Targeted Delivery Systems, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 09.11.2024

Отправлена на доработку 19.11.2024

Принята к печати 22.03.2025

Received 09.11.2024

Revision received 19.11.2024

Accepted 22.03.2025

ТАРГЕТНАЯ ВАКЦИНАЦИЯ ПРОТИВ СТРЕПТОКОККА ГРУППЫ А: РЕКОМБИНАНТНАЯ ВАКЦИНА С ФРАГМЕНТАМИ ScpA И SpeA

Дуплик Н.В., Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Богатырева К.П.,
Гупалова Т.В., Бормотова Е.А., Королева И.В., Суворов А.Н.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель – разработка вакцины против стрептококков группы А (*S. pyogenes*, СГА) – возбудителя широкого спектра инфекций различной степени тяжести. Для клонирования генов рекомбинантных белков использовали экспрессионные вектора рЕТ27 и рQE30. Для иммунизации использовали аффинно-очищенные полипептиды. Самок мышей иммунизировали дважды подкожно полипептидами в дозе 20 мкг/мышь с адьювантом Alum (2:1) с интервалом в 3 недели. Образцы иммунных сывороток исследовали методом ИФА. Для оценки специфической защитной эффективности иммунного ответа через 3 недели после последней инъекции мышей внутрибрюшинно заражали СГА М1 серотипа в дозе 5×10^7 КОЕ/мышь. Защитную эффективность вакцинации оценивали путем сравнения скорости бактериального клиренса у вакцинированных и контрольных животных, о чем судили по бактериальной нагрузке в селезенке через 3 и 15 часов после заражения. Конструкция вакцины представляет собой гибридную молекулу, состоящую из фрагментов, полученных из двух ключевых белков СГА: пептидазы С5а (ScpA) и экзотоксина SpeA. Используя биоинформатический анализ, мы идентифицировали и выбрали для включения в состав рекомбинантного белка Т- и В-клеточные эпитопы в консервативных регионах, общих для разных серотипов СГА. Посредством стратегии интеграции этих фрагментов предполагается усилить защиту от штаммов СГА, несущих экзотоксин, особенно тех, которые связаны с инвазивными инфекциями. Оценка иммуногенности на моделях мышей продемонстрировала сильный гуморальный иммунный ответ после парентеральной вакцинации, направленный на оба компонента гибридной молекулы. Последующая оценка защитной эффективности против внутрибрюшинного введения СГА выявила ускорение бактериального клиренса у вакцинированных животных, при этом фрагмент SpeA проявлял значительный защитный эффект. Представленные результаты демонстрируют потенциал полученной рекомбинантной химерной вакцины как многообещающего кандидата для разработки вакцины против стрептококков груп-

Адрес для переписки:

Дуплик Надежда Владленовна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (931) 306-08-47.
E-mail: nadezhdaduplik@gmail.com

Address for correspondence:

Nadezhda V. Duplik
Institute of Experimental Medicine
12 Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197376 Russian Federation
Phone: +7 (931) 306-08-47.
E-mail: nadezhdaduplik@gmail.com

Образец цитирования:

Н.В. Дуплик, Г.Ф. Леонтьева, Т.А. Крамская,
К.П. Богатырева, Т.В. Гупалова, Е.А. Бормотова,
И.В. Королева, А.Н. Суворов «Таргетная вакцинация
против стрептококка группы А: рекомбинантная
вакцина с фрагментами ScpA и SpeA» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 985-1000.
doi: 10.15789/1563-0625-TGA-3138

© Дуплик Н.В. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.V. Duplik, G.F. Leontieva, T.A. Kramskaya,
K.P. Bogatireva, T.V. Gupalova, E.A. Bormotova,
I.V. Koroleva, A.N. Suvorov "Targeting Group A Streptococcus
with a Recombinant Chimeric Vaccine: Integrating ScpA
and SpeA Fragments", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 5,
pp. 985-1000.
doi: 10.15789/1563-0625-TGA-3138

© Duplik N.V. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-TGA-3138

пы А, удовлетворяющей острую потребность в эффективных профилактических стратегиях против патологий, вызванных СГА.

Ключевые слова: стрептококк группы А, С5а-пептидаза, экзотоксин SpeA, рекомбинантная химерная вакцина, иммуногенность, протективность

TARGETING GROUP A STREPTOCOCCUS WITH A RECOMBINANT CHIMERIC VACCINE: INTEGRATING ScpA AND SpeA FRAGMENTS

Duplik N.V., Leontieva G.F., Kramskaya T.A., Bogatireva K.P., Gupalova T.V., Bormotova E.A., Koroleva I.V., Suvorov A.N.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Our objective was to develop a vaccine against group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*, GAS), the causative agent of a broad spectrum of infections with varying severity. The expression vectors pET27 and pQE30 were used to clone genes encoding recombinant proteins, which were subsequently affinity-purified. Female mice were immunized subcutaneously twice with the purified polypeptides (20 µg/mouse) formulated with Alum adjuvant (2:1) at three-week intervals. Immune sera were analyzed using ELISA to evaluate antigen-specific responses. Three weeks after the final immunization, mice were challenged intraperitoneally with GAS M1 serotype at a dose of 5×10^7 CFU/mouse. Vaccination efficacy was determined by comparing bacterial clearance in vaccinated *versus* control animals, assessed by bacterial loads in the spleen at 3 and 15 hours post-infection. The vaccine candidate is a hybrid recombinant protein comprising fragments from two essential GAS virulence factors: C5a peptidase (ScpA) and SpeA exotoxin. T and B cell epitopes from conserved regions, common across multiple GAS serotypes, were identified and included into the construct using bioinformatics tools. The integration of these epitopes is designed to confer broad-spectrum protection against GAS strains carrying exotoxin, particularly those linked to invasive infections. Immunogenicity studies in mice revealed a robust humoral immune response targeting both components of the hybrid protein. Further evaluation of protective efficacy demonstrated accelerated bacterial clearance in vaccinated animals, with the SpeA fragment playing a significant protective role. These findings emphasize the potential of this recombinant chimeric vaccine as a promising candidate for the prevention of group A streptococcal infections, addressing the critical need for effective prophylactic strategies against GAS-associated diseases.

Keywords: group A *Streptococcus*, C5a peptidase, exotoxin SpeA, recombinant chimeric vaccine, immunogenicity, protectivity

The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Project No. 122020300194-0).

Introduction

Group A *Streptococcus* (*S. pyogenes*, GAS) is widely distributed and is responsible for a spectrum of diseases in humans, exhibiting diverse clinical presentations and varying degrees of severity [18, 23, 28, 36]. These include tonsillitis, pharyngitis, acute respiratory infections, otitis, impetigo, scarlet fever, erysipelas, rheumatic fever, glomerulonephritis, and

vasculitis. Less common manifestations encompass necrotizing fasciitis and myositis, enteritis, focal lesions within internal organs, and toxic shock syndrome. According to estimates from the World Health Organization (WHO), GAS infections afflict over 100 million individuals annually, culminating in more than half a million deaths each year due to associated diseases [45].

While GAS remains susceptible to antibiotics, antibiotic therapy alone is insufficient as a primary treatment for rheumatic fever and rheumatic heart disease. It merely reduces the duration of the illness and alleviates symptoms. Furthermore, the

widespread use of antibiotics has contributed to the emergence of antimicrobial resistance in GAS [8, 9, 15, 27, 32, 46], further complicating the situation and underscoring the need for new vaccine-based prevention strategies [10, 37].

As of now, licensed vaccines targeting Group A *Streptococcus* (GAS) antigens are not available; however, significant efforts are underway towards their development [25]. The M protein, a key virulence factor of GAS, represents a primary target for vaccine research and development. Numerous vaccine candidates, predominantly centered around the M protein or its N- and/or C-terminal regions, have been under investigation. Encouragingly, certain candidates, such as a 6-, 26-, and 30-valent M protein-based vaccines, have demonstrated promising outcomes in preclinical assessments and early-stage clinical trials [14, 30].

Other Group A *Streptococcus* (GAS) surface proteins are also being studied as vaccine candidates. These include proteins such as streptococcal pyrogenic exotoxin (SpeA), fibronectin binding proteins (FBI), *Streptococcus pyogenes* cell wall proteinase (SpyCEP), streptococcal C5a peptidase (ScpA), arginine deiminase (ADI), trigger factor (TF), and streptolysin O (SLO). To date, most of these developments remain at the preclinical research stage [20, 43, 44].

The phenomenon of antigenic drift under the influence of the immune system, leading to constant variability in the antigenic properties of bacteria, necessitates the inclusion of conserved segments of bacterial molecules in vaccines and/or the development of multispecific vaccine compositions. In this regard, the use of recombinant proteins opens up prospects for the development of effective universal vaccine preparations. These pre-designed proteins can ensure good immunogenicity of the vaccine and reduce the risk of immune evasion [40].

Unlike multicomponent vaccines, chimeric vaccines simplify manufacturing processes by eliminating the need to separately produce individual vaccine components. This not only reduces production costs but also improves the efficiency of vaccine production overall. In addition, chimeric constructs can be tailored to target specific factors of the immune system, such as inducing neutralizing antibodies or enhancing T cell immunity.

Incorporation of specific amino acid regions into chimeric proteins may reduce the risk of toxicity compared to full-length proteins derived from pathogenic bacteria, which may be inherently toxic. Additionally, chimeric proteins offer versatility and can be used in combination vaccines targeting multiple pathogens, highlighting their potential in the fight against co-infectious diseases.

In this article, we present the results of a study of a combined recombinant molecule consisting of a fragment of peptidase C5a and the erythrogenic toxin SpeA of *S. pyogenes* (Dick toxin). Through the strategic integration of these moieties, we expect to achieve enhanced protection against exotoxin-carrying GAS strains, especially those associated with invasive infections. The structure of this chimeric recombinant molecule, designated ScpA-SpeA, was determined through preliminary bioinformatics analysis. The recombinant ScpA-SpeA protein included conserved and immunogenic epitopes of the surface serine protease ScpA and the erythrogenic toxin SpeA.

Following two subcutaneous immunization of mice with the chimeric recombinant molecule, a systemic humoral immune response was elicited. Analysis of specific serum IgG revealed the presence of antibodies targeting both components of the combined molecule in circulation. Furthermore, quantitative assessment of *S. pyogenes* content in the spleens of mice after intraperitoneal infection demonstrated a significantly higher rate of bacterial elimination from the bloodstream of vaccinated mice compared to that in control, non-immunized animals.

The implications of these results are discussed in the context of the potential utility of the developed construct for the prevention of GAS infections.

Materials and methods

Bacterial strains, culture media, and growth conditions

The *Escherichia coli* strains M15 and BL21 sourced from the collection of the Institute of Experimental Medicine (St. Petersburg, Russia) were utilized in this study. *E. coli* M15 cells were cultivated in LB medium (Luria Broth) supplemented with kanamycin at a final concentration of 25 µg/mL, and incubated at 37 °C with vigorous agitation overnight. For the production of recombinant protein, *E. coli* M15 transformants were cultured in Terrific Broth medium (prepared according to Maniatis) supplemented with ampicillin (100 µg/mL) and kanamycin (25 µg/mL), and incubated at 37 °C with vigorous agitation.

Similarly, *E. coli* BL21 cells were cultured in LB medium at 37 °C with vigorous agitation overnight. For the production of recombinant protein, *E. coli* BL21 transformants were cultured in Terrific Broth medium (prepared according to Maniatis) supplemented with ampicillin (100 µg/mL), and incubated at 37 °C with vigorous agitation.

Streptococcus pyogenes serotype M1, obtained from the collection of the Institute of Experimental Medicine (St. Petersburg, Russia), was cultured in THB (Todd-Hewitt Broth) medium (HiMedia, India) for

24 hours at 37 °C under aerobic conditions. Bacterial cells were subsequently washed three times with PBS by centrifugation at 3500 rpm for 20 minutes and concentrated if necessary. The resulting suspension was utilized for peritoneal infection.

Method for quantitative determination of bacteria

To quantitatively assess bacterial concentration, 10 µL of 10-fold dilutions of the sample were inoculated onto the surface of 5% blood agar in triplicate. The inoculated plates were then incubated for 24 hours at 37 °C. For dilutions where colony counting is feasible, the average number of colonies formed was determined. Considering the dilution factor, this number was extrapolated to represent the bacterial concentration per milliliter of the original sample. The bacterial concentration was expressed in colony-forming units per milliliter (CFU/mL) of the sample.

Animal procedures

Female inbred Balb/c mice, aged 10 weeks, were obtained from the Rappolovo laboratory animal nursery in the Leningrad region, Russia. The mice were housed under standard laboratory conditions with ad libitum access to food and water.

Experimental procedures adhered to the principles outlined in EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and were conducted in accordance with guidelines and under the supervision of the local biomedical ethics committee. Approval for these experiments was obtained during an ethics committee meeting held on January 28, 2021, as documented in Meeting Minutes 1/21.

Non-terminal procedures were performed under ether anesthesia. Animals were euthanized under ether anesthesia before cervical dislocation. The health status of the live vaccine-challenged mice was monitored and recorded once a day for ten days post-vaccination. No animal showed any signs of illness following vaccine strain infection. No animals died (without euthanasia) as a result of the experimental procedures.

Immunization protocols

Proteins were administered subcutaneously into the dorsal area of mice at a dose of 20 µg/mouse, with two injections given at a three-week interval. Prior to injection, the protein was emulsified in 0.2 mL of PBS along with 0.1 mL of Imject Alum (Thermo Scientific, USA). Blood samples were collected from the submandibular vein on day 18 and on day 39 and centrifuged at 1500×g for 10 minutes. The collected sera were then stored at -20 °C.

Study of the protective effectiveness of vaccination

To assess the specific protective efficacy of the immune response, mice were intraperitoneally infected 3 weeks after the final injection with GAS at a dose of 5×10^7 CFU/mouse.

Spleens were collected in 3 and 15 hours post infection and homogenized in PBS using a Retsch MM-400 vibrating ball mill. Serial 10-fold dilutions of the homogenates were prepared in PBS, and aliquots of the dilutions were plated on solid nutrient medium (Columbia agar with 5% human red blood cells). The plates were then incubated at 37 °C for 14-16 hours, and colonies were subsequently counted under a microscope. The bacterial load in CFU per organ was calculated and expressed as log₁₀.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA analysis was conducted following a previously described protocol [12]. Maxisorb 96-well plates (Nunc; Denmark) were coated with 0.5 µg/mL of the corresponding protein in 0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.3, overnight at 4 °C. Samples (100 µL) were added to duplicate wells in a series of two-fold dilutions and incubated for 1 hour at 37 °C. Following each step, the plates were washed with blocking buffer (0.05% Tween 20 in PBS). Serum and reagents were diluted using the same buffer. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Sigma, USA) were added at a volume of 100 µL per well. After incubation at 37 °C for 1 hour, the plates were developed with 100 µL per well of TMB substrate (BD Bioscience, The Netherlands). Color development was observed after 20 minutes of incubation, and the reaction was halted by adding 30 µL of 50% sulfuric acid. ELISA endpoint titers were determined as the highest dilution yielding an optical density at 450 nm (OD₄₅₀) greater than the mean OD₄₅₀ plus 3 standard deviations of the negative control wells.

Bioinformatics analysis

Analysis of Group A Streptococcus (GAS) DNA and proteins was conducted utilizing the NCBI non-redundant (nr) database and the BLAST tool [5], both of which are freely accessible resources. DNA primer design was facilitated by the Primer 3.0 computer program. Protein sequence analysis for B cell and T cell epitopes was performed using the Immune Epitope Analysis Database and Resource (IEDB), a freely available tool.

Genetic engineering procedures

A chimeric gene, *scpA-speA*, 1536 bp in length, was chemically synthesized with built-in BamHI and HindIII restriction sites and initially cloned into the vector plasmid DNA pAL2-T (Evrogen, Russia).

Fragments of the *scpA* and *speA* genes were obtained via polymerase chain reaction (PCR) using the primers listed in Table 1. The primer sequences were designed to incorporate BamHI and SacI restriction endonuclease sites for efficient cloning.

Subsequently, the resulting *scpA-speA* gene and *scpA* gene fragment were cloned into the expression vector pQE-30 (The QIAexpress System, Qiagen,

TABLE 1. OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS

| Primer name | Sequence |
|-------------|--|
| Scpafor | TCC TGG ATC CGA ACA AAC CGT AGA AAC TCC AC |
| Scparev | TCT TGG AGC TCG GCT GTT TTG ACC GTA GCA GT |
| spefor | GGA TCC AAG CCA ACT TCA CAG ATC TAG T |
| sperev | GTA AGC TTC AAT TTG GCT TGT GTT TGA |

USA). Additionally, the *speA* gene fragment was cloned into the expression vector pET-27.

Purification of recombinant proteins

Cultures of *E. coli* strains M15 and BL21 were grown in Terrific Broth medium and induced by the addition of an IPTG solution. Following induction, cells were lysed using an ultrasonic disintegrator (Soniprep 150plus, MSE, UK). The resulting cell lysate was then applied to a Ni-Sepharose column for the purification of recombinant proteins. Following purification and determination of protein concentration using the Lowry method, the product was stored at -20 °C.

Immunoblotting analysis

Immunoblotting was performed according to standard protocols. Briefly, protein samples were separated by SDS-PAGE using a 12% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane using a semi-dry transfer system. The membrane was then blocked with 5% non-fat milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TST) for 1 hour at room temperature. After blocking, the membrane was incubated with primary antibodies (sera obtained from mice immunized with recombinant protein ScpA, SpeA or ScpA-SpeA) against the target protein overnight at 4 °C. Following primary antibody incubation, the membrane was washed three times with TST and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Sigma, USA) for 1 hour at room temperature. After three additional washes with TST, protein bands were visualized using staining HRP substrate – 3, 3'-diaminobenzidine (DAB).

Statistical data analysis

Data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test, and statistical significance (p-value) was determined using a Student's t-test. Results are presented as mean ± SEM. Statistical analysis was conducted using the statistical module of GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). p-values < 0.05 were considered significant.

Results

The chimeric recombinant molecule investigated in this study was engineered from two components

corresponding to the immunogenic regions of streptococcal proteins. It comprised a fragment of peptidase C5a (ScpA), an enzyme expressed on the bacterial surface that cleaves and deactivates human complement factor C5a, and a segment of the SpeA gene encoding the erythrogenic toxin of group A streptococci. Both proteins are recognized as virulence factors for group A streptococci.

The efficacy of antibacterial polypeptide vaccines is widely acknowledged to hinge upon the quality and specificity of the induced immune response. The specificity of a vaccine can be broadened by incorporating conserved regions into the vaccine molecule that are shared across a diverse array of serotypes of pathogenic bacteria.

With these considerations in mind, a preliminary bioinformatic analysis was conducted, facilitating the identification of conserved regions within the amino acid sequences of ScpA and SpeA. These regions were found to harbor T and B cell-dependent epitopes, thereby enhancing the potential specificity and efficacy of the vaccine.

The amino acid sequences used for bioinformatic analysis were retrieved from the NCBI Protein database [26] using the following accession numbers: WP_011055051.1, WP_011054794.1. These sequences correspond to the proteins ScpA and SpeA from GAS strain MGAS315. The NCBI Protein database version used was the latest available at the time of retrieval. Conserved regions of the proteins were selected based on sequence alignment using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [5] with a conservation threshold of 100% identity.

The selected ScpA and SpeA protein sequences corresponded to the ScpA and SpeA sequences at positions 42–366 and 57–229, respectively (Figure 1).

Subsequently, within the identified regions, analysis using the IEDB immune epitope database revealed the presence of top-ranking B cell epitopes, alongside T cell-dependent epitopes that exhibited a predicted strong binding affinity to MHC II molecules (Figure 2).

During the construction of the vaccine molecule, functionally active regions were intentionally excluded from the sequences of streptococcal proteins. Specifically, the conserved active site of

ScpA, characterized by three amino acid residues (Ser-Asp-His), was altered due to the absence of serine residue No. 512 [39]. Additionally, the selected SpeA structure lacked Glu-33, which is essential for the formation of a zinc binding site by the SpeA protein, necessary for MHC class II recognition [3].

These alterations were made to prevent the retention of functional activity in the vaccine molecules. The two amino acid sequences were linked together using the linker region GGGGGSSS (Table 2).

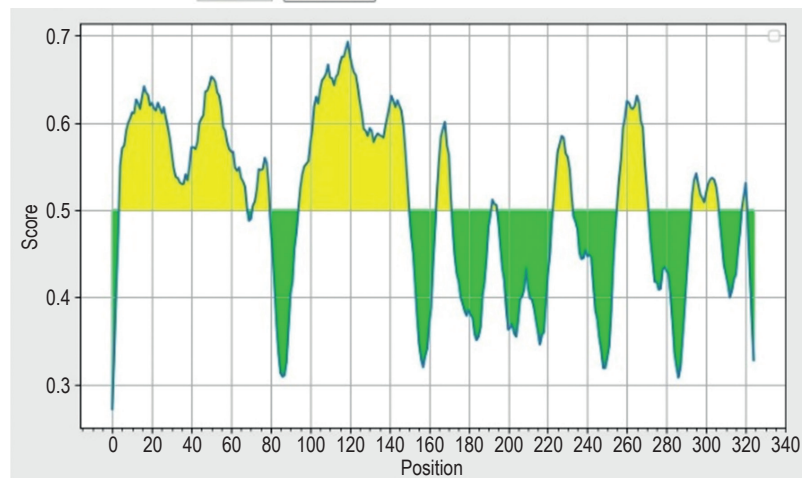
The amino acid sequence of the chimeric recombinant protein ScpA-SpeA was translated into

ScpA

Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 Results Input Sequences

1 EQAVETPQPT AVSEEVPSK ETKTPOTDD AEETIADDAN DLAPQAPAKT ADTPATSKAT
61 IRDLNDPSQV KTLQEKAGKG AGTVVAVIDA GFDKNHEAWR LDTKTKARYQ SKEDLEKAKK
121 EHGITYGEWV NDKVAYYHDY SKDGKTAVDQ EHGTHVSGIL SGNAPSETKE PYRLEGAMPE
181 AQLLLMRVEI VNGLADYARN YAOAIRDAVN LGAKVINMSF GNAALAYANL PDETKKAFDY
241 AKSKGVSVIT SAGNDSFGG KTRLPLADHP DYGVVGTAA ADSTLTVASY SPDKQLTETA
301 MVKTDQDDK EMPVLSTNRF EPNKA

Center position: 4 Threshold: 0.500 Recalculate



Average: 0.507 Minimum: 0.272 Maximum: 0.693

Predicted peptides:

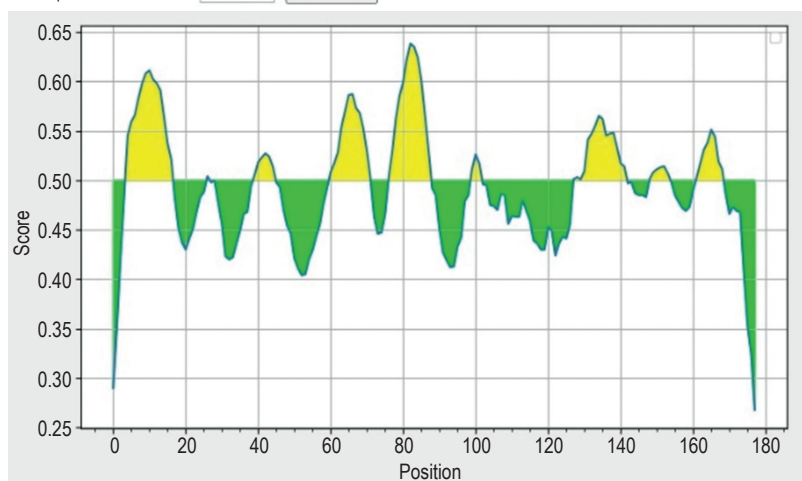
| No. | Start | End | Peptide | Length |
|-----|-------|-----|--|--------|
| 1 | 5 | 69 | ETPQPTAVSEEVPSKETKTPQTP DDAEETIADDANDLAPQAPAKTAD TPATSKATIRDLNDPSQ | 65 |
| 2 | 72 | 80 | TLQEKAGKG | 9 |
| 3 | 95 | 151 | NHEAWRLDTKTKARYQSKEDLEK AKKEHGITYGEWVNDKVAYYHDY SKDGKTAVDQE | 57 |
| 4 | 165 | 172 | PSETKEPY | 8 |
| 5 | 193 | 195 | GLA | 3 |
| 6 | 224 | 233 | ALAYANLPDE | 10 |

SpeA

Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 Results Input Sequences

1 GDPVTHENKV SVDQLLSDL IYVNSGPNYD KLTTELKQE MATLFDKQV DIYGVVEYHL
61 CYLCENAERS ACYGGVTNH EGNHLEIPK IVVKVSDIGI QLSFDIETN KKMVTAQELD
121 YKVRKYLTDN KQLYTNGPSK YETGVYKFIK KNKESFWDF FPEPEFTOSK YLMISLIS

Center position: 4 Threshold: 0.500 Recalculate



Average: 0.492 Minimum: 0.268 Maximum: 0.638

Predicted peptides:

| No. | Start | End | Peptide | Length |
|-----|-------|-----|-----------------|--------|
| 1 | 5 | 17 | THENKSVSDQLLS | 13 |
| 2 | 27 | 27 | P | 1 |
| 3 | 40 | 45 | EMATLF | 6 |
| 4 | 61 | 72 | CYLCENAERSAC | 12 |
| 5 | 77 | 88 | VTNHEGNHLEIP | 12 |
| 6 | 100 | 102 | IQS | 3 |
| 7 | 128 | 142 | TDNKQLYTNGPSKYE | 15 |

Figure 1. Bepipred liner epitope prediction of ScpA and SpeA

ScpA

MHC-II Binding Prediction Results Input Sequences

| # | Name | Sequence |
|---|------------|---|
| 1 | Sequence 1 | EQAVETPQPTAVSEEVPSKETKTPQTPDDAEETIADDANDLAPQAPAKT ADTPATSKATIRDLDNPSQVKTLEKAGKAGTVAVIDAGFDKNHEAWR LTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGITYGEVWVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQ EHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVEIVNGLADYARN YAQAIRDAVNLAGKVINMFSFGNAALAYANLPDETKKAFDYAKSKGVSIVT SAGNDSSFQKTRLPADHPDYGVVGTAAADSTLTVASYPDKQLTETA MVKTDQDQKPNVLTSTRFEPNKA |

Prediction method: netmhciipan_el 4.1 | High score = good binders

Download result [\[x\]](#)

Citations

| Allele | # | Start | End | Length | Core Sequence | Peptide Sequence | Score | Percentile Rank |
|----------------|---|-------|-----|--------|---------------|------------------|--------|-----------------|
| HLA-DRB3*02:02 | 1 | 194 | 208 | 15 | YARNYAQAI | LADYARNYAQAIRDA | 0.9510 | 0.01 |
| HLA-DRB3*02:02 | 1 | 193 | 207 | 15 | YARNYAQAI | GLADYARNYAQAIRD | 0.9323 | 0.04 |
| HLA-DRB1*07:01 | 1 | 234 | 248 | 15 | FDYAKSKGV | TKKAFDYAKSKGVSIV | 0.9655 | 0.04 |
| HLA-DRB1*07:01 | 1 | 235 | 249 | 15 | FDYAKSKGV | KKAFDYAKSKGVSIV | 0.9725 | 0.04 |
| HLA-DRB1*07:01 | 1 | 233 | 247 | 15 | FDYAKSKGV | ETKKAFDYAKSKGVS | 0.9537 | 0.06 |
| HLA-DRB1*07:01 | 1 | 237 | 251 | 15 | YAKSKGVSIV | AFDYAKSKGVSIVTS | 0.9553 | 0.06 |
| HLA-DRB1*07:01 | 1 | 236 | 250 | 15 | YAKSKGVSIV | KAFDYAKSKGVSIVT | 0.9566 | 0.06 |
| HLA-DRB3*02:02 | 1 | 195 | 209 | 15 | YARNYAQAI | ADYARNYAQAIRDAV | 0.9071 | 0.07 |
| HLA-DRB3*01:01 | 1 | 125 | 139 | 15 | WVNDKVAYY | TYGEWVNDKVAYYHD | 0.9361 | 0.07 |
| HLA-DRB3*01:01 | 1 | 126 | 140 | 15 | WVNDKVAYY | YGEWVNDKVAYYHDY | 0.9326 | 0.08 |
| HLA-DRB3*02:02 | 1 | 192 | 206 | 15 | YARNYAQAI | NGLADYARNYAQAIR | 0.8265 | 0.14 |
| HLA-DRB3*01:01 | 1 | 127 | 141 | 15 | WVNDKVAYY | GEWVNDKVAYYHDYS | 0.8447 | 0.14 |
| HLA-DRB3*01:01 | 1 | 124 | 138 | 15 | WVNDKVAYY | ITYGEWVNDKVAYYH | 0.8499 | 0.14 |
| HLA-DRB1*07:01 | 1 | 232 | 246 | 15 | FDYAKSKGV | DETKKAFDYAKSKGV | 0.8894 | 0.19 |
| HLA-DRB1*15:01 | 1 | 131 | 145 | 15 | VAYYHDYSK | NDKVAYYHDYSKDGK | 0.8389 | 0.37 |
| HLA-ORB1*07:01 | 1 | 238 | 252 | 15 | YAKSKGVSIV | FDYAKSKGVSIVTSA | 0.8245 | 0.41 |
| HLA-DRB4*01:01 | 1 | 32 | 46 | 15 | IADDANDLA | EETIADDANDLAPQA | 0.5842 | 0.46 |
| HLA-DRB5*01:01 | 1 | 106 | 120 | 15 | YQSKEDLEK | KARYQSKEDLEKAKK | 0.6335 | 0.48 |
| HLA-DRB4*01:01 | 1 | 80 | 94 | 15 | TVVAVIDAG | GAGTVVAVIDAGFDK | 0.5398 | 0.57 |

SpeA

MHC-II Binding Prediction Results Input Sequences

| # | Name | Sequence |
|---|------------|--|
| 1 | Sequence 1 | GDPVTHENVKSDQLLSDLIYVSGPUYDKLTELKKNQEMATLFDKDNV DIYGVVEYHLCYLCENAERSACIYGGVTNHEGNHLEIPKKIVKVSIDGI QSLSFDIETNKKMVTAEQELDYKVRKYLTDNKQLYTNGPSKYETGIYKIFIP KNKESFWDFPEPEFTQSKYLMISL |

Prediction method: netmhciipan_el 4.1 | High score = good binders

Download result [\[x\]](#)

Citations

| Allele | # | Start | End | Length | Core Sequence | Peptide Sequence | Score | Percentile Rank |
|----------------|---|-------|-----|--------|---------------|------------------|--------|-----------------|
| HLA-DRB3*02:02 | 1 | 17 | 31 | 15 | LIYVSGPN | SHDLIYVSGPNYDK | 0.9216 | 0.05 |
| HLA-DRB5*01:01 | 1 | 26 | 40 | 15 | YDKLKTTELK | GNPYDKLKTTELKNQ | 0.8637 | 0.06 |
| HLA-DRB5*01:01 | 1 | 25 | 39 | 15 | YDKLKTTELK | SGPNYDKLKTTELKNQ | 0.8281 | 0.10 |
| HLA-DRB3*02:02 | 1 | 16 | 30 | 15 | LIYVSGPN | LSHDLIYVSGPNYD | 0.8652 | 0.11 |
| HLA-DRB5*01:01 | 1 | 141 | 155 | 15 | YIKFIPKKNK | YETGYIKFIPKNKES | 0.8100 | 0.12 |
| HLA-DRB5*01:01 | 1 | 142 | 156 | 15 | YIKFIPKKNK | ETGYIKFIPKNKESF | 0.7957 | 0.13 |
| HLA-DRB4*01:01 | 1 | 111 | 125 | 15 | VTAQELDYK | KKMVTAEQELDYKVRK | 0.7749 | 0.19 |
| HLA-DRB3*02:02 | 1 | 18 | 32 | 15 | LIYVSGPN | HDLIYVSGPNYDKL | 0.7853 | 0.22 |
| HLA-DRB5*01:01 | 1 | 140 | 154 | 15 | YIKFIPKKNK | KYETGYIKFIPKNKE | 0.7213 | 0.25 |
| HLA-DRB5*01:01 | 1 | 24 | 38 | 15 | YDKLKTTELK | VSGPNYDKLKTTELKN | 0.7215 | 0.25 |
| HLA-DRB5*01:01 | 1 | 27 | 41 | 15 | YDKLKTTELK | PNYDKLKTTELKNQEM | 0.7114 | 0.28 |
| HLA-DRB4*01:01 | 1 | 110 | 124 | 15 | VTAQELDYK | NKKMVTAEQELDYKVR | 0.6903 | 0.30 |
| HLA-DRB3*02:02 | 1 | 15 | 29 | 15 | LIYVSGPN | LLSHDLIYVSGPNY | 0.6911 | 0.38 |
| HLA-DRB1*03:01 | 1 | 123 | 137 | 15 | YLTDNKQLY | VRKYLTDNKQLYTNG | 0.8882 | 0.39 |
| HLA-DRB3*01:01 | 1 | 123 | 137 | 15 | YLTDNKQLY | VRKYLTDNKQLYTNG | 0.6810 | 0.45 |
| HLA-DRB1*03:01 | 1 | 122 | 136 | 15 | YLTDNKQLY | KVRKYLTDNKQLYTN | 0.8619 | 0.50 |
| HLA-DRB3*01:01 | 1 | 122 | 136 | 15 | YLTDNKQLY | KVRKYLTDNKQLYTN | 0.6354 | 0.59 |
| HLA-DRB5*01:01 | 1 | 143 | 157 | 15 | YIKFIPKKNK | TGYIKFIPKNKESFW | 0.5779 | 0.65 |
| HLA-DRB4*01:01 | 1 | 88 | 102 | 15 | VVKVSIKGI | PKKIVVVKVSIKGIQS | 0.5057 | 0.69 |
| HLA-DRB1*03:01 | 1 | 124 | 138 | 15 | YLTDNKQLY | RKYLTDNKQLYTNGP | 0.8218 | 0.69 |
| HLA-DRB4*01:01 | 1 | 109 | 123 | 15 | VTAQELDYK | TNKKMVTAEQELDYK | 0.4959 | 0.76 |
| HLA-DRB4*01:01 | 1 | 112 | 126 | 15 | VTAQELDYK | KMVTAEQELDYKVRKY | 0.4828 | 0.80 |
| HLA-DRB3*01:01 | 1 | 121 | 135 | 15 | YLTDNKQLY | YKVRKYLTDNKQLYT | 0.5360 | 0.81 |
| HLA-DRB3*01:01 | 1 | 124 | 138 | 15 | YLTDNKQLY | RKYLTDNKQLYTNGP | 0.5295 | 0.82 |

Figure 2. The IEDB immune epitope database analysis of ScpA and SpeA

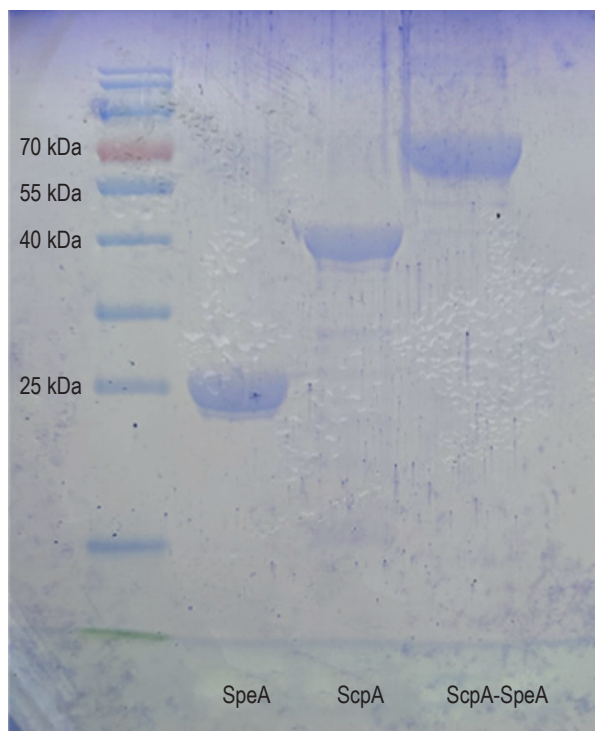


Figure 3. SDS-PAGE of recombinant polypeptides

a nucleotide sequence optimized for expression in *E. coli*. The synthesis of the nucleotide sequence of the gene encoding the chimeric protein, the principle of its cloning into the pQE-30 plasmid, the selection of transformant clones, the preparation of the chimeric

recombinant protein, and its purification are detailed in the “Materials and methods” section. The resulting chimeric recombinant protein ScpA-SpeA exhibited a molecular weight of 70 ± 0.5 kDa (Figure 3).

Strains producing components included in the chimeric protein ScpA-SpeA were constructed, and recombinant ScpA and SpeA proteins were obtained as described in the “Materials and methods” section (Figure 3).

In an experiment conducted on Balb/c mice, the immunogenicity of the chimeric recombinant protein was assessed in comparison to its constituent fragments, ScpA and SpeA. The experimental protocol is illustrated in Figure 4.

Mice were subcutaneously immunized with the three proteins, and the IgG antibody levels in the blood serum were evaluated using ELISA after single and double immunization. ELISA analysis of the humoral immune response revealed that both the GAS chimeric proteins and recombinant analogs of its components, when administered twice, induced the accumulation of IgG antibodies in the blood serum. Importantly, the immune response to the chimeric molecule resulted in the production of antibodies specific to both components of the chimera – C5a and SpeA. Furthermore, antibodies to C5a and SpeA in the ELISA assay interacted with the chimeric molecule immobilized on the bottom of the plate (Figure 5).

The ELISA findings were corroborated through immunoblotting (Figure 6A). The results indicate

TABLE 2. AMINO ACID SEQUENCES OF RECOMBINANT POLYPEPTIDES

| Recombinant polypeptide | Amino acid sequences |
|-------------------------|--|
| ScpA-SpeA | MRGSHHHHHHGSEQAVETPQPTAVSEEVPSSKETKTPQTPDDAEETIADDANDLAPQAPAKTADT PATSKATIRDLNDPSQVKTLQEAKGKAGTVVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAK KEHGITYGEWVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQLL LMRVEIVNGLADYARNYAQAIRDAVNLGAKVINMSFGNAALAYANLPDETCKAFDYAKSKGVSIVTS AGNDSSFGGKTRLPLADHPDYGVTGTPAAADSTLTVASYSPPDKQLTETAMVKTDDQDKEMPVLS TNRFEPNKAGGGGGSSSGDPVTHENVKSVDQLLSDHDIYNVSGPNYDKLKTTELKNQEMATLFDK KNVDIYGVEYYHLCYLCENAERSACIYGGVTNHEGNHLEIPKKIVVKV SIDGIQSLSFDIETNKKMVT AQELDYKVRKYLT DNKQLYTNGPSKYETGYIKFIPKNKESFWDFDFPEPEFTQSKYLMISLIS |
| ScpA | MRGSHHHHHHGSTPQPTAVSEEAPSSKETKTPQTPDDAGETVADDANDLAPQAPAKTADTPATSK ATIRDLNDPSQVKTLQEAKGKAGTVVAVIDAGFDKNHEAWRLTDKTKARYQSKEDLEKAKKEHGI TYGEWVNDKVAYYHDYSKDGKTAVDQEHGTHVSGILSGNAPSETKEPYRLEGAMPEAQLLLMRVE IVNGLADYARNYAQAIRDAINL GAKVINMSFGNAALAYANLPDETCKAFDYAKSKGVSIVTSAGNDSS FGGKTRLPLADHPDYGVTGTPAAADSTLTVASYSPPDKQLTEILKLN |
| SpeA | MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMAMDIGINSDPSQLHRSSLVKNLQNIYFLYEGDPVTHENVKSVDQLL SHDLIYNVSGPNYDKLKTTELKNQEMATLFDKKNVDIYGVEYYHLCYLCENAERSACIYGGVTNHEG NHLEIPKKIVVKV SIDGIQSLSFDIETNKKMVT AQELDYKVRKYLT DNKQLYTNGPSKYETGYIKFIPK NKESFWDFDFPEPEFTQSKYLMYKDNETLDSNTSQIRKLAAALEHHHHHH |

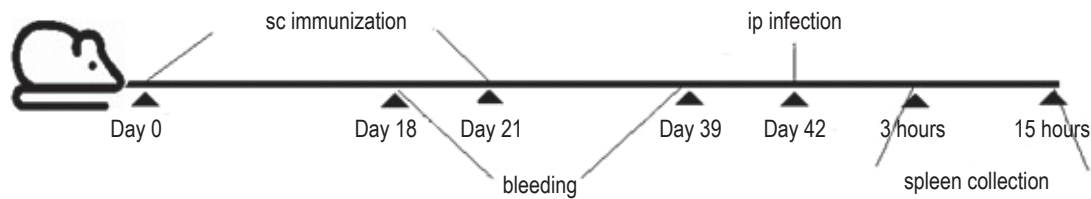


Figure 4. Schematic representation of the immunization protocol for mice followed by evaluation of the protective efficacy of the induced immune response

Note. For detailed procedures, refer to the “Materials and methods” section.

that the serum of mice immunized with the chimeric protein harbors antibodies capable of binding not only to the chimeric protein itself but also to the recombinant fragments of the peptidase ScpA and SpeA. Additionally, sera obtained from mice immunized with individual components of the combined protein exhibited binding to it in immunoblotting (Figure 6B).

A comparative investigation into the protective efficacy of the chimeric protein and its individual recombinant components against *S. pyogenes* infection was conducted through intraperitoneal administration of a suspension of GAS serotype M1 at a dose of 5×10^7 per mouse, followed by monitoring the bacterial count in the spleen of mice at 3 and 15 hours post-infection (Figure 7).

Mice subjected to standard immunization were intraperitoneally infected with a bacterial suspension. *S. pyogenes* load in the spleens was assessed at 3 and 15 hours post-infection. For detailed procedures, refer to the Materials and methods section. Bacterial load were expressed as log10 and presented as mean \pm SEM on the ordinate axis, (*) – $p < 0.05$.

After 15 hours following the onset of infection, a notable increase in the rate of clearance of intraperitoneally administered GAS was observed in mice vaccinated with both the GAS chimera and its components – SpeA and ScpA.

Thus, it has been demonstrated that the combined protein ScpA-SpeA, comprising fragments of C5a peptidase and erythrogenic toxin, displays immunogenicity upon subcutaneous administration twice to mice, eliciting a robust humoral immune response. IgG antibodies, specific to the chimeric protein itself, as well as its individual components, accumulated in the blood serum. Following intraperitoneal infection caused by GAS serotype M1, accelerated elimination of streptococcus from the bodies of mice immunized with the chimeric protein and its individual components was reliably observed.

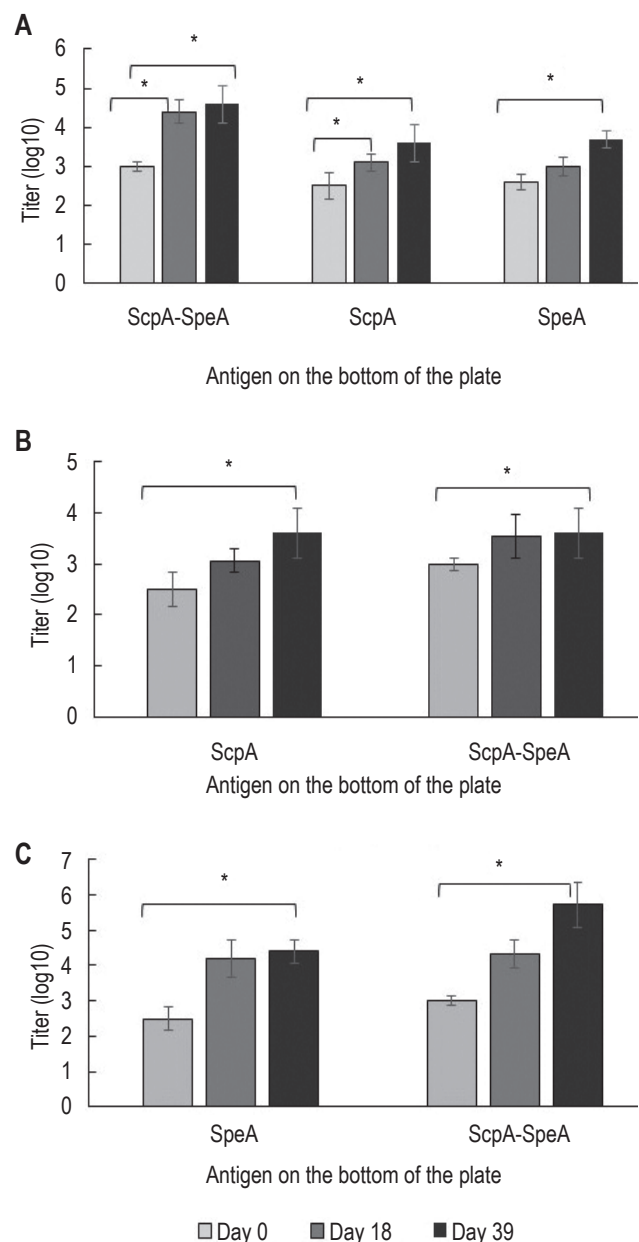


Figure 5. Sera analysis post-immunization: specific IgG response to ScpA-SpeA molecule detected in ELISA

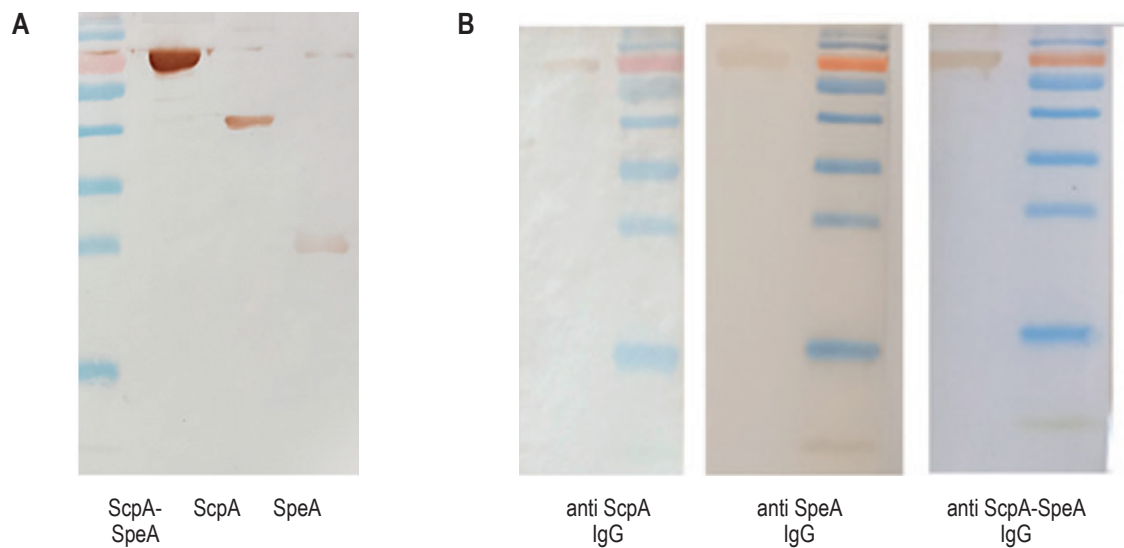


Figure 6. Immunoblotting analysis of serum specificity

Note. A, electrophoresis was performed on a 12% polyacrylamide gel (PAGE) to separate the proteins ScpA-SpeA, ScpA, and SpeA, followed by transfer to nitrocellulose paper and treatment with serum obtained from mice immunized with the chimeric protein ScpA-SpeA. B, the chimeric protein ScpA-SpeA was subjected to 12% PAGE electrophoresis in triplicate, followed by transfer to nitrocellulose paper and treatment with sera obtained from mice immunized with proteins ScpA, SpeA, and the chimeric ScpA-SpeA, respectively. For detailed procedures, refer to the Materials and methods section.

Discussion

The World Health Organization (WHO) has articulated the need to create an effective vaccine against Group A Streptococcus (GAS), which has led to increased research in this area [45]. The investigation of the M protein and its components as vaccine candidates has advanced to the stage of clinical trials [30]. Additionally, progress has been

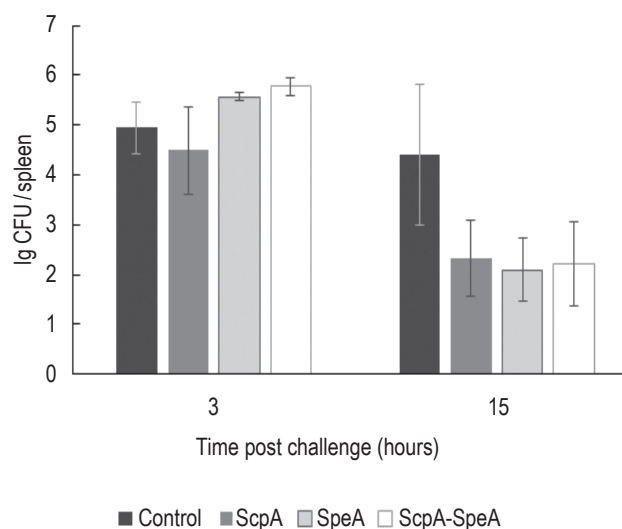


Figure 7. Assessment of protective efficacy of the immune response

made in the development of other non-M protein vaccines [20, 43, 44].

To ensure reliable neutralization or elimination of GAS, researchers frequently test multicomponent combinations of various streptococcal proteins [4, 11, 33, 34, 35]. An alternative to mixing vaccine proteins into a single formulation is the production of combined recombinant proteins. These are composed of specially selected fragments of various GAS proteins that possess specific properties such as varied specificity, immunogenicity, conservativeness and safety.

We constructed a two-component protein consisting of tandem fragments of two GAS proteins: C5a peptidase (ScpA) and SpeA. Both proteins have been extensively studied as vaccine candidates due to their critical roles as major virulence factors for GAS [29].

Protein fragments were carefully selected to include conserved regions of the molecules containing T and B cell epitopes. This approach ensures the elicitation of a robust immune response following vaccination.

The production of composite recombinant vaccine formulations represents a prominent avenue in the advancement of protein vaccine manufacturing technologies [6].

Among protein GAS vaccines, polyvalent recombinant formulations comprising tandem variable sequences of N-terminal fragments of the M protein from various GAS serotypes occupy the forefront. However, given that the literature has described over

200 M serotypes of *S. pyogenes* to date, the feasibility of developing a vaccine capable of targeting all serological variants of GAS appears challenging [1].

Expansion of the serological specificity of the vaccine preparation can be achieved by including conserved protein regions in the vaccine molecule that are present in all or the most virulent and epidemiologically relevant strains of streptococci. The C5a peptidase shows a significant degree of conservation and is found in all members of the different GAS serotypes. C5a peptidase is a surface protein of GAS that plays an important role in immune evasion by cleaving the host chemotactic peptide C5a and interfering with the development of the host inflammatory response [17, 21].

The amino acid sequence of C5a peptidase shares 98% similarity between *S. pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*, suggesting the potential for vaccine-mediated prevention, including against Group B streptococcus (GBS) infections [20]. Conversely, SpeA, encoded by temperate bacteriophages, is prevalent in the genome of the majority of GAS strains, contributing to the invasive properties of streptococci [19, 24].

Incorporation of SpeA, a known streptococcal pyrogenic exotoxin produced by GAS, into the vaccine molecule is expected to provide protection against the risk of invasive infections.

Regions exhibiting a high degree of homology, characterized by significant sequence conservation or alignment scores, were identified in the amino acid sequences of ScpA and SpeA using the BLAST tool. These regions were incorporated into the corresponding proteins of GAS serotypes associated with increased virulence across various clinical settings (serotypes M1, M3, M12, M18, M89).

The composite molecule was formulated to mitigate the risk of enzymatic activity associated with ScpA and the mitogenic activity linked to SpeA. Notably, the selected conservative fragment of ScpA lacked amino acid sequences responsible for the formation of the enzyme's active center [39].

A mutation was introduced into the nucleotide sequence encoding the SpeA fragment to induce an amino acid substitution at Glu 33. This mutation, as indicated by Baker et al. (2001), results in a significant reduction in the mitogenic properties of the toxin [3].

According to bioinformatics analysis, the recombinant polypeptides ScpA and SpeA, as well as the linear sequence of the studied combined molecule, contained a substantial number of B- and T-dependent epitopes essential for eliciting a robust T-dependent immune response. This was corroborated by the results of immune response assessments following the first and second immunizations.

Just two weeks after the initial subcutaneous administration, IgG antibodies to the test antigens were detected in the blood of mice. Subsequent immu-

nizations led to increased antibody levels (Figure 5), indicating the T-dependent nature of the immune response to all test antigens.

Specific IgG targeting epitopes of ScpA and SpeA were observed in the blood of mice immunized with the chimeric protein (Figure 5). This was demonstrated in ELISA assays, where both the chimeric protein and its components were adsorbed onto the plate surface.

The data were corroborated by the results of immunoblotting. In immunoblotting, IgG antibodies present in the serum of mice vaccinated with the chimeric molecule showed binding affinity not only to the chimera but also to both individual polypeptides ScpA and SpeA (Figure 6A). IgG antibodies targeting ScpA and SpeA interacted with the chimeric protein molecule (Figure 6B). For practical application of the ScpA-SpeA vaccine molecule, additional assessment of the safety of antibodies formed against spatial determinants resulting from the secondary and tertiary folding of this artificial protein will be necessary.

The protective efficacy of the induced immune response was evaluated using a model of peritoneal GAS infection in CBA mice. GAS M1 serotype expressing SpeA was selected for the assessment of the vaccine protectivity. For this purpose we have chosen the peritoneal infection model. The reason for this choice was based on the inability of rodent models to establish significant oropharyngeal colonization of GAS or exhibit symptomatic infection. Since GAS is a human-specific pathogen, the lack of a native animal model for studying GAS pathogenesis has also posed challenges for GAS vaccine development [2].

The protective efficacy of vaccination was evaluated by assessing the rate of bacterial clearance from the bodies of vaccinated and control animals, as indicated by the bacterial load in the spleen. A comparative analysis of the protective effectiveness was conducted not only for the chimeric vaccine but also for its individual components.

Three hours post intraperitoneal administration, no significant differences were observed in the spleen infection levels among the studied groups, although there was a trend towards accelerated bacterial elimination in mice vaccinated with ScpA (Figure 7). However, after 15 hours, a significant reduction in bacterial load was evident in the spleens of mice across all three immunized groups compared to the control.

Anti-C5a peptidase antibodies play an essential role in the immune response to GAS infection by neutralizing the ScpA enzyme, thereby restoring the function of C5a. This leads to enhanced recruitment and activation of immune cells, improved phagocytosis, and overall more effective clearance of the bacteria, reducing the pathogen's ability to evade the host immune system [21].

In line with classical concepts of infectious immunology, bacterial elimination primarily occurs

through effective opsonophagocytosis, which serves as the principal mechanism for limiting bacterial infection [22].

There is conflicting information regarding the opsonizing potential of ScpA-specific antibodies. Evidence suggests that immunization with the five-component vaccine preparation Combo5, which includes ScpA, leads to the formation of non-opsonizing antibodies [34]. Conversely, other data indicate that antibodies generated by a five-component vaccine of similar composition possess opsonizing properties [4]. Additionally, according to Q. Cheng et al., IgG against the C5a peptidase of GBS are effective opsonins [7, 31].

This classical logic is less straightforward when considering the protective efficacy of the immune response elicited by vaccination with a pyrogenic exotoxin, which is an excreted protein.

Several studies have explored the potential use of exotoxins as vaccine components. There is clinical observations documented in the literature that antibodies that neutralize streptococcal toxins protect patients from toxic shock [13, 16].

There is experimental evidence indicating that immunization with SpeA prevents the development of experimental nasopharyngeal infection of mice. According to authors, the proposed mechanism of infection suppression they recorded possesses a specific nature. ScpA targets and activates V β -specific T cells, leading to the remodeling of the nasopharyngeal environment essential for initiating the early stages of GAS colonization. Specific antibodies capable of neutralizing SpeA prevent the formation of this environment, thereby impacting the early stages of colonization and preventing infection development [47].

Previously R.G. Ulrich described a protein vaccine based on a recombinant fusion protein of streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) and streptococcal pyrogenic exotoxin A (SpeA) [41, 42].

Vaccination of susceptible to GAS infection HLA-DQ8 transgenic mice with the SpeA-SpeB fusion protein protected against a challenge with the wild-type SpeA that was lethal to naive controls. Vaccinated mice were protected from a lethal *S. pyogenes* infection. The authors recorded the protective effect based on mortality rates in the vaccinated and control groups and did not monitor bacterial infection.

The authors of the aforementioned studies discussed the protective mechanisms following SpeA

immunization within the context of neutralizing the free pyrogenic toxin with antibodies and mitigating its pathogenetic effects. In our investigation, the intraperitoneal administration of GAS simulated an invasive infectious process. Bacteria within the peritoneal cavity could enter the bloodstream, either directly through compromised blood vessels or indirectly via the lymphatic system, ultimately reaching the spleen. Remarkably, after just 15 hours, a marked reduction in bacterial content was observed in the spleens of SpeA-immunized mice compared to controls, indicating an accelerated clearance of bacteria in transit through the bloodstream toward the spleen. The accelerated clearance of GAS from the circulation in the SpeA-vaccinated group could be attributed to the process of opsonophagocytosis.

It can be hypothesized that during the excretion process, the pyrogenic exotoxin SpeA remains on the bacterial cell surface for a certain duration, ample enough for opsonization to occur.

Indeed, it is plausible that SpeA could transiently associate with various components of the GAS cell wall, including peptidoglycan, teichoic acids, lipoteichoic acids, as well as adhesins and surface proteins. Such interactions may facilitate its retention on the bacterial surface, thereby extending the window of exposure for potential opsonization and subsequent clearance by the immune system [38]. We suggest that the planctonic variants of GAS which are dominating during to the invasive process might be more sensitive to such opsonization and clearance. A confident statement will require direct evidence however from our observations, it can be cautiously assumed that the protective potential of SpeA in the vaccine preparation may be realized not only through neutralizing the pyrogenic exotoxin with specific antibodies but also by accelerating the elimination of *S. pyogenes* via opsonophagocytosis.

Conclusions

Our results suggest that the ScpA-SpeA chimeric protein could be a valuable vaccine candidate for controlling GAS infections. The presence of conserved ScpA and SpeA fragments in the studied molecule implies the effectiveness of the immune response against multiple isolates of *S. pyogenes* due to extensive antibody cross-reactivity. This aspect warrants further exploration.

References

1. Aranha M.P., Penfound T.A., Salehi S., Botteaux A., Smeesters P., Dale J.B., Smith J.C. Design of Broadly Cross-Reactive M Protein-Based Group A Streptococcal Vaccines. *J. Immunol.*, 2021, Vol. 207, no. 4, pp. 1138-1149.
2. Azuar A., Jin W., Mukaida S., Hussein W.M., Toth I., Skwarczynski M. Recent Advances in the Development of Peptide Vaccines and Their Delivery Systems Against Group A Streptococcus. *Vaccines*, 2019, Vol. 7, no. 3, 58. doi: 10.3390/vaccines7030058.

3. Baker M., Gutman D.M., Papageorgiou A.C., Collins C.M., Acharya K.R. Structural features of a zinc binding site in the superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin A (SpeA1): implications for MHC class II recognition. *Protein Sci.*, 2001, Vol. 10, no. 6, pp. 1268-1273.
4. Bi S., Xu M., Zhou Y., Xing X., Shen A., Wang B. A Multicomponent Vaccine Provides Immunity against Local and Systemic Infections by Group A Streptococcus across Serotypes. *mBio*, 2019, Vol. 10, no. 6, e02600-19. doi: 10.1128/mBio.02600-19.
5. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnology Information. Available at: blast.ncbi.nlm.nih.gov/.
6. Chauhan S., Khasa Y.P. Challenges and Opportunities in the Process Development of Chimeric Vaccines. *Vaccines*, 202, Vol. 11, no. 12, 1828. doi: 10.3390/vaccines11121828.
7. Cheng Q., Carlson B., Pillai S., Eby R., Edwards L., Olmsted S.B., Cleary P. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci. *Infect. Immun.*, 2001, Vol. 69, no. 4, pp. 2302-2308.
8. Cornaglia G., Ligozzi M., Mazzariol A., Valentini M., Orefici G., Fontana R. Rapid increase of resistance to erythromycin and clindamycin in *Streptococcus pyogenes* in Italy, 1993–1995. The Italian surveillance group for antimicrobial resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 1996, Vol. 2, pp. 339-342.
9. Desjardins M., Delgaty K.L., Ramotar K., Seetaram C., Toyé B. Prevalence and mechanisms of erythromycin resistance in Group A and Group B Streptococcus: Implications for reporting susceptibility results. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, Vol. 42, pp. 5620-5623.
10. Fulurija A., Cunningham M.W., Korotkova N., Masterson M.Y., Bansal G.P., Baker M.G., Cannon J.W., Carapetis J.R., Steer A.C. Research opportunities for the primordial prevention of rheumatic fever and rheumatic heart disease-streptococcal vaccine development: a national heart, lung and blood institute workshop report. *BMJ Glob. Health*, 2023, Vol. 8, Suppl. 9, e013534. doi: 10.1136/bmjgh-2023-013534.
11. Gao N.J., Uchiyama S., Pill L., Dahesh S., Olson J., Bautista L., Maroju S., Berges A., Liu J.Z., Zurich R.H., et al. Site-Specific Conjugation of Cell Wall Polyrhamnose to Protein SpyAD Envisioning a Safe Universal Group A Streptococcal Vaccine. *Infect. Microbes Dis.*, 2010, Vol. 3, pp. 87-100.
12. Gupalova T., Leontieva G., Kramskaya T., Grabovskaya K., Bormotova E., Korjevski D., Suvorov A. Development of experimental GBS vaccine for mucosal immunization. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 5, e0196564. doi: 10.1371/journal.pone.0196564.
13. Kaul R., McGeer A., Norrby-Teglund A., Kotb M., Schwartz B., O'Rourke K, Talbot J., Low D.E.. Intravenous immunoglobulin therapy for streptococcal toxic shock syndrome – a comparative observational study. The Canadian Streptococcal Study Group. *Clin. Infect. Dis.*, 1999, Vol. 28, no. 4, pp. 800-807.
14. Kuo C.F., Tsao N., Hsieh I.C., Lin Y.S., Wu J.J., Hung Y.T. Immunization with a streptococcal multiple-epitope recombinant protein protects mice against invasive group A streptococcal infection. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 3, e0174464. doi: 10.1371/journal.pone.0174464.
15. Laphorne S., McWade R., Scanlon N., Ní Bhaoill S., Page A., O'Donnell C., Dornikova G., Hannan M., Lynch B., Lynch M., Brady D. Rising clindamycin resistance in group A Streptococcus in an Irish healthcare institution. *Access Microbiol.*, 2024, Vol. 6, no. 6, 000772.v4. doi: 10.1099/acmi.0.000772.v4.
16. Linnér A., Darenberg J., Sjölin J., Henriques-Normark B., Norrby-Teglund A. Clinical efficacy of polyspecific intravenous immunoglobulin therapy in patients with streptococcal toxic shock syndrome: A comparative observational study. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 59, pp. 851-857.
17. Lynskey N.N., Reglinski M., Calay D., Siggins M.K., Mason J.C., Botto M., Sriskandan S. Multi-functional mechanisms of immune evasion by the streptococcal complement inhibitor C5a peptidase. *PLoS Pathog.*, 2017, Vol. 13, no. 8, e1006493. doi: 10.1371/journal.ppat.1006493.
18. Martín-Delgado M.C., De Lucas Ramos P., García-Botella A., Cantón R., García-Lledó A., Hernández-Sampelayo T., Gómez-Pavón J., González Del Castillo J., Martín Sánchez F.J., Martínez-Sellés M., Molero García J.M., Moreno Guillén S., Rodríguez-Artalejo F.J., Ruiz-Galiana J., Burillo A., Muñoz P., Calvo Rey C., Catalán-González M., Cendejas-Bueno E., Halperin-Benito V, Recio R., Viñuela-Benítez C., Bouza E. Invasive group A Streptococcus infection (*Streptococcus pyogenes*): Current situation in Spain. *Rev. Esp. Quimioter.*, 2024, martin30jul2024. doi: 10.37201/req/067.2024.
19. Mascini E.M., Jansze M., Schellekens J.F.P., Musser J.M., Faber J.A.J., Verhoef-Verhage L.A.E., Schouls L., van Leeuwen W.J., Verhoef J., van Dijk H. Invasive group A streptococcal disease in the Netherlands: Evidence for a protective role of anti-exotoxin A antibodies. *J. Infect. Dis.*, 2000, Vol. 181, pp. 631-638.
20. McCabe S., Bjånes E., Hendriks A., Wang Z., van Sorge N.M., Pill-Pepe L., Bautista L., Chu E., Codée J.D.C., Fairman J., Kapoor N., Uchiyama S., Nizet V. The Group A Streptococcal Vaccine Candidate VAX-A1 Protects against Group B Streptococcus Infection via Cross-Reactive IgG Targeting Virulence Factor C5a Peptidase. *Vaccines*, 2023, Vol. 11, no. 12, 1811. doi: 10.3390/vaccines11121811.
21. McKenna S., Huse K.K., Giblin S., Pearson M., Majid A., Shibar M.S., Sriskandan S., Matthews S., Pease J.E. The Role of Streptococcal Cell-Envelope Proteases in Bacterial Evasion of the Innate Immune System. *J. Innate Immun.*, 2022, Vol. 14, no. 2, pp. 69-88.
22. Monteiro R.C., van De Winkel J.G. IgA Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 21, pp. 177-204.

23. Moreira M., Ferreira P.R., Sarmiento A., Cardoso A.L. Bacterial Tracheitis: A New Presentation of a Well-Known Disease. *Cureus*, 2024, Vol. 16, no. 7, e63697. doi: 10.7759/cureus.63697.
24. Müller-Alouf H., Geoffroy C., Geslin P., Bouvet A., Felten A., Günther E., Ozegowski J.H., Alouf J.E. Streptococcal pyrogenic exotoxin A, streptolysin O, exoenzymes, serotype and biotype profiles of *Streptococcus pyogenes* isolates from patients with toxic shock syndrome and other severe infections. *Zentralbl. Bakteriol.*, 1997, Vol. 286, pp. 421-433.
25. Nasr-Eldahan S., Attia Shreadah M., Maher A.M., El-Sayed Ali T., Nabil-Adam A. New vaccination approach using formalin-killed *Streptococcus pyogenes* vaccine on the liver of *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Sci. Rep.*, 2024, Vol. 14, no. 1, 18341. doi: 10.1038/s41598-024-67198-0.
26. NCBI Home. U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
27. Nixon J., Hennessy J., Baird R.W. Tracking trends in the Top End: clindamycin and erythromycin resistance in Group A *Streptococcus* in the Northern Territory, 2012-2023. *Commun. Dis. Intell.* (2018), 2024, 48. doi: 10.33321/cdi.2024.48.31.
28. Oliver-Gutierrez D., van der Veen R.L.P., Ros-Sánchez E., Segura-Duch G., Alonso T., Herranz-Cabarcos A., Matas J., Castro Seco R., Arcediano M.Á., Zapata M.Á., Oliveres J. Periorbital necrotizing fasciitis: clinical perspectives on nine cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2024, Vol. 43, no. 10, pp. 2053-2059.
29. Panchaud A., Guy L., Collyn F., Haenni M., Nakata M., Podbielski A., Moreillon P., Roten C.A. M-protein and other intrinsic virulence factors of *Streptococcus pyogenes* are encoded on an ancient pathogenicity island. *BMC Genomics*, 2009, Vol. 10, 198. doi: 10.1186/1471-2164-10-198.
30. Pastural É., McNeil S.A., MacKinnon-Cameron D., Ye L., Langley J.M., Stewart R., Martin L.H., Hurley G.J., Salehi S., Penfound T.A., Halperin S., Dale J.B. Safety and immunogenicity of a 30-valent M protein-based group A streptococcal vaccine in healthy adult volunteers: A randomized, controlled phase I study. *Vaccine*, 2020, Vol. 38, no. 6, pp. 1384-1392.
31. Pietrocola G., Arciola C.R., Rindi S., Montanaro L., Speziale P. *Streptococcus agalactiae* Non-Pilus, Cell Wall-Anchored Proteins: Involvement in Colonization and Pathogenesis and Potential as Vaccine Candidates. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 602. doi: 10.3389/fimmu.2018.00602.
32. Rampersadh K., Engel K.C., Engel M.E., Moodley C. A survey of antibiotic resistance patterns among Group A *Streptococcus* isolated from invasive and non-invasive infections in Cape Town, South Africa. *Heliyon*, 2024, Vol. 10, no. 13, e33694. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e33694.
33. Reglinski M., Lynskey N.N., Choi Y.J., Edwards R.J., Sriskandan S. Development of a multicomponent vaccine for *Streptococcus pyogenes* based on the antigenic targets of IVIG. *J. Infect.*, 2016, Vol. 72, pp. 450-459.
34. Rivera-Hernandez T., Rhyme M.S., Cork A.J., Jones S., Segui-Perez C., Brunner L., Richter J., Petrovsky N., Lawrenz M., Goldblatt D., Collin N., Walker M.J. Vaccine-Induced Th1-Type Response Protects against Invasive Group A *Streptococcus* Infection in the Absence of Opsonizing Antibodies. *mBio*, 2020, Vol. 11, no. 2, e00122-20. doi: 10.1128/mBio.00122-20.
35. Rivera-Hernandez T., Pandey M., Henningham A., Cole J., Choudhury B., Cork A.J., Gillen C.M., Ghaffar K.A., West N.P., Silvestri G. Differing Efficacies of Lead Group A Streptococcal Vaccine Candidates and Full-Length M Protein in Cutaneous and Invasive Disease Models. *mBio*, 2016, Vol. 7, e00618-16. doi: 10.1128/mBio.00618-16.
36. Schalk E., Genseke S., Zautner A.E., Kaasch A.J. Detection of *Streptococcus pyogenes* in an atypical hematological diagnostic case. *Infection*, 2024. doi: 10.1007/s15010-024-02335-5.
37. Smeesters P.R., de Crombrughe G., Tsoi S.K., Leclercq C., Baker C., Osowicki J., Verhoeven C., Botteaux A., Steer A.C. Global *Streptococcus pyogenes* strain diversity, disease associations, and implications for vaccine development: a systematic review. *Lancet Microbe*, 2024, Vol. 5, no. 2, pp. e181-e193.
38. Spaulding A.R., Salgado-Pabón W., Kohler P.L., Horswill A.R., Leung D.Y., Schlievert P.M. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, Vol. 26, no. 3, pp. 422-447.
39. Stafslin D.K., Cleary P.P. Characterization of the Streptococcal C5a Peptidase Using a C5a-Green Fluorescent Protein Fusion Protein Substrate. *J. Bacteriol.*, 2000, Vol. 182, no. 11, pp. 3254-3258.
40. Thomas S., Abraham A. Progress in the Development of Structure-Based Vaccines. *Methods Mol. Biol.*, 2022, Vol. 2412, pp. 15-33.
41. Troese M.J., Burlet E., Cunningham M.W., Alvarez K., Bentley R., Thomas N., Carwell S., Morefield G.L. Group A *Streptococcus* Vaccine Targeting the Erythrogenic Toxins SpeA and SpeB Is Safe and Immunogenic in Rabbits and Does Not Induce Antibodies Associated with Autoimmunity. *Vaccines*, 2023, Vol. 11, no. 9, 1504. doi: 10.3390/vaccines1109150.
42. Ulrich R.G. Vaccine based on a ubiquitous cysteinyl protease and streptococcal pyrogenic exotoxin A protects against *Streptococcus pyogenes* sepsis and toxic shock. *J. Immune Based Ther. Vaccines*, 2008, Vol. 6, 8. doi: 10.1186/1476-8518-6-8.
43. Walkinshaw D.R., Wright M.E.E., Mullin A.E., Excler J.L., Kim J.H., Steer A.C. The *Streptococcus pyogenes* vaccine landscape. *NPJ Vaccines*, 2023, Vol. 8, no. 1, 16. doi: 10.1038/s41541-023-00609-x.

44. Wang J., Ma C., Li M., Gao X., Wu H., Dong W., Wei L. Streptococcus pyogenes: Pathogenesis and the Current Status of Vaccines. *Vaccines*, 2023, Vol. 11, no. 9, 1510. doi: 10.3390/vaccines11091510.
45. World Health Organization. The current evidence for the burden of group A streptococcal diseases. Geneva, Switzerland, 2005, pp. 1-52.
46. Zachariadou L., Papaparaskevas J., Paraskakis I., Efstratiou A., Pangalis A., Legakis N.J., Tassios P.T. Predominance of two M-types among erythromycin-resistant Group A Streptococci from Greek children. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2003, Vol. 9, pp. 310-314.
47. Zeppa J.J., Kasper K.J., Mohorovic I., Mazzuca D.M., Haeryfar S.M.M., McCormick J.K. Nasopharyngeal infection by Streptococcus pyogenes requires superantigen-responsive V β -specific T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, Vol. 114, no. 38, pp. 10226-10231.

Авторы:

Дуплик Н.В. — к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Леонтьева Г.Ф. — к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Крамская Т.А. — старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Богатырева К.П. — младший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Duplik N.V., PhD (Biology), Researcher, Molecular Microbiology Department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Leontieva G.F., PhD (Biology), Leading Researcher, Molecular Microbiology Department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kramskaya T.A., Senior Researcher, Molecular Microbiology Department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Bogatireva K.P., Junior Researcher, Molecular Microbiology Department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Гупалова Т.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник
отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-
Петербург, Россия

Бормотова Е.А. — научный сотрудник отдела
молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт
экспериментальной медицины», Санкт-Петербург,
Россия

Королева И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник
отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-
Петербург, Россия

Суворов А.Н. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН,
заведующий отделом молекулярной микробиологии
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

Gupalova T.V., PhD, MD (Biology), Leading Researcher,
Molecular Microbiology Department, Institute of Experimental
Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Bormotova E.A., Researcher, Molecular Microbiology
Department, Institute of Experimental Medicine,
St. Petersburg, Russian Federation

Koroleva I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Molecular
Microbiology Department, Institute of Experimental Medicine,
St. Petersburg, Russian Federation

Suvorov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding
Member, Russian Academy of Sciences, Head, Molecular
Microbiology Department, Institute of Experimental Medicine,
St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 11.11.2024
Отправлена на доработку 26.11.2024
Принята к печати 23.03.2025

Received 11.11.2024
Revision received 26.11.2024
Accepted 23.03.2025

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИ-GD2 CAR-T-КЛЕТОК С РАЗЛИЧНЫМ АНТИГЕН- РАСПОЗНАЮЩИМ МОДУЛЕМ

Луцкович Д.В., Керезь М.А., Клыч А.В., Луцкович Е.С.,
Мелешко А.Н.

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»,
д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Резюме. Нейробластома (НБ) – самая распространенная экстракраниальная солидная опухоль у детей, 8-10% всех детских опухолей и частотой около 1-1,3 случая на 100 тыс. детей до 15 лет. Несмотря на использование интенсивного лечения с хирургическим вмешательством, высокодозной химиотерапией и радиотерапией, 5-летняя бессобытийная выживаемость составляет 25-50%, после рецидива – 10-40%. За последнее десятилетие стремительно развивается новый вид клеточной терапии с модификацией лимфоцитов химерным антигенным рецептором (CAR). Одним из основных известных антигенов для создания CAR-T-терапии против НБ является дисиаialogанглиозид GD2, экспрессия которого характерна в 100% случаев этого заболевания. Большинство клинических вариантов анти-GD2 CAR основаны на scFv 14.G2, происходящим из химерного антитела 14.18 (денутуксимаб). В 2020 FDA утвердило новое анти-GD2 гуманизированное антитело, 3F8 (накситамаб) с лучшим профилем безопасности. Несмотря на частичный успех, результаты анти-GD2 CAR-T-терапии остаются скромными. Одним из вариантов увеличения специфичности рецептора является таргетирование О-ацетил-GD2, производное дисиаialogанглиозида, в котором внешний остаток сиаловой кислоты модифицирован О-ацетиловым эфиром. Ацетилирование GD2 происходит только в опухолевых клетках и не встречается в периферических нервах. Известно антитело 8B6, таргетирующее О-ацетил-GD2. Таким образом, как минимум 3 терапевтических антитела, 14G2a, hu3F8 и 8B6, конкурируют друг с другом за таргетирование GD2 с помощью CAR-T-клеток. И во всех случаях анти-GD2 CAR содержит вставочные домены во внеклеточной части молекулы. Результаты отдельных клинических испытаний опубликованы для CAR-T на основе 14G2a и hu3F8, но пока нет данных по использованию антитела 8B6 в составе CAR. Цель настоящего исследования – получить химерные антигенные рецепторы 2-го поколения на основе трех антител, с различной длиной внеклеточного домена и оценить их функциональную активность в отношении ряда клеточных линий для обоснования дальнейших клинических испытаний.

Ключевые слова: нейробластома, иммунотерапия, антиген, GD2, О-ацетил-GD2, CAR-T

Адрес для переписки:

Луцкович Дмитрий Викторович
ГУ «Республиканский научно-практический центр
детской онкологии, гематологии и иммунологии»
223053, Республика Беларусь, Минская обл.,
д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43.
Тел.: +375172871068.
E-mail: LutskovichDM@gmail.com

Address for correspondence:

Dmitry V. Lutskovich
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology,
Hematology and Immunology
43 Frunzenskaya St
Borovlyany village, Minsk Region
223053 Republic of Belarus
Phone: +375172871068.
E-mail: LutskovichDM@gmail.com

Образец цитирования:

Д.В. Луцкович, М.А. Керезь, А.В. Клыч, Е.С. Луцкович,
А.Н. Мелешко «Функциональная активность
анти-GD2 CAR-T-клеток с различным антиген-
распознающим модулем» // Медицинская иммунология,
2025. Т. 27, № 5. С. 1001-1012.
doi: 10.15789/1563-0625-FAO-3161

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

For citation:

D.V. Lutskovich, M.A. Keraz, H.V. Klych, E.S. Lutskovich,
A.N. Meleshko "Functional activity of anti-GD2 CAR-T
cells with different antigen-recognition module", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*,
2025, Vol. 27, no. 5, pp. 1001-1012.
doi: 10.15789/1563-0625-FAO-3161

© Lutskovich D.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-FAO-3161

FUNCTIONAL ACTIVITY OF ANTI-GD2 CAR-T CELLS WITH DIFFERENT ANTIGEN-RECOGNITION MODULE

Lutskovich D.V., Keraz M.A., Klych H.V., Lutskovich E.S.,
Meleshko A.N.

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Abstract. Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor in children comprising, 8 to 10% of all pediatric tumors, with incidence of about 1-1.3 cases per 100,000 children under 15 years of age. Despite the use of intensive treatment with surgery, high-dose chemotherapy and radiotherapy, the 5-year event-free survival rate is 25-50% and 10-40% after relapse. Over the past decade, a new type of cell therapy with chimeric antigen receptor (CAR) modification of lymphocytes has been rapidly developed. Among the main promising antigens for development of CAR-T therapy against NB is the disialoganglioside GD2, the expression of which is shown in 100% of NB cases. Most clinical variants of anti-GD2 CAR-T cells are based on scFv 14.G2, originating from chimeric antibody 14.18 (denutuximab). In 2020, the FDA approved a new anti-GD2 humanized antibody, 3F8 (naxitamab) with a better safety profile. Despite partial success, the results of anti-GD2 CAR-T therapy remain modest. One option to increase receptor specificity is based on targeting O-acetyl-GD2, a disialoganglioside derivative in which the external sialic acid residue is modified with an O-acetyl ester. Acetylation of GD2 occurs only in tumor cells, and it is not detected in peripheral nerves. An 8B6 antibody is known to target O-acetyl-GD2. Thus, at least 3 therapeutic antibodies, 14G2a, hu3F8 and 8B6, compete with each other for targeting GD2 with CAR-T cells. In all these cases, the anti-GD2 CAR contains insertion domains in extracellular portion of the molecule. Results of separate clinical trials have been published for CAR-T based on 14G2a and hu3F8. So far, however, there are no data on the usage of 8B6 antibody in CARs. The aim of the present study is to obtain 2nd generation chimeric antigenic receptors based on three antibodies with different lengths of extracellular domain, and to evaluate their functional activity against a number of cell lines to justify further clinical trials.

Keywords: neuroblastoma, immunotherapy, antigen, GD2, O-acetyl-GD2, CAR-T

Введение

Нейробластома (НБ) – самая распространенная экстракраниальная солидная опухоль у детей, 8-10% всех детских опухолей и частотой около 1-1,3 случая на 100 тыс. детей до 15 лет [21]. Несмотря на использование интенсивного лечения с хирургическим вмешательством, высокодозной химиотерапией и радиотерапией, 5-летней бессобытийная выживаемость составляет 25-50%, после рецидива 10-40 [1]. За последние десятилетия развитие иммунотерапии достигло значительного прогресса в лечении онкологических заболеваний. Одним из перспективных направлений иммунотерапии является терапия Т-лимфоцитами, экспрессирующими трансгенный рецептор Т-клеток (TCR) или химерные антигенные рецепторы (CAR).

Химерный антигенный рецептор для распознавания антигена как правило использует одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), полученный из варибельных доменов тяжелой и легкой цепей антитела, распознающий определенный поверхностный антиген HLA-независимым образом. CAR кодируется одним геном, состоящим из scFv, шарнира или спейсера, трансмембран-

ной области, сигнального домена, такого как цепь CD3 ζ из комплекса TCR, и домена костимуляции (в основном 4-1BB и/или CD28) [11]. Клинический опыт применения CAR-T-клеточной терапии в целом оказался успешным, в основном при гематологических злокачественных новообразованиях, с разработкой анти-CD19 CAR-препаратов, таких как Kymriah, Yescarta, Brexanzi и Tecartus, все из которых одобрены Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) для лечения В-клеточных злокачественных новообразований.

Клинические результаты, полученные при использовании CAR для воздействия на солидные опухоли у взрослых или детей, на сегодняшний день показывают более слабую эффективность, чем при гематологических опухолях, отчасти из-за отсутствия целевых специфических антигенов, демонстрирующих низкую устойчивость и эффективность [16].

Одним из основных целевых антигенов для создания CAR-T-терапии против НБ является ганглиозид GD2, который широко экспрессируется на поверхности этих клеток. Экспрессия GD2 сильно ограничена в незлокачественных тканях, при этом ее низкий уровень наблюдается

только на периферических нервах, меланоцитах кожи, мозге и остеопрогениторах [14]. На конец 2022 года, GD2 являлся второй по частоте встречаемости мишеней, используемых для солидных опухолей, после мезотелина, в том числе основная мишень для таргетирования неробластомы CAR-T [19]. Большинство клинических вариантов анти-GD2 CAR основаны на scFv 14.G2, происходящем из химерного антитела 14.18 (денутуксимаб) [15], реже используется гуманизированное антитело KM8138 [17]. В 2020 FDA утвердило новое анти-GD2 гуманизированное антитело, 3F8 (накситамаб) с лучшим профилем безопасности [6]. Во всех случаях анти-GD2 CAR содержит вставочные домены во внеклеточной части молекулы.

Одно из последних опубликованных клинических испытаний с результатами 1/2 фазы (GD2-CART01) опубликовано F. Del Bufalo в апреле 2023 г. Рецептор третьего поколения с CD28, 4-1BB и CD3z сигнальными доменами основан на 14.G2-антителе. В конструкцию добавлен индукцибельный суицидальный ген каспазы 9 для безопасности, что было применено для 1 пациента. 9 пациентов из 27 (33%) достигли полного ответа, и 5 из них сохранили ремиссию. CRS развился у 74% пациентов, в том числе grade 3 у одного. 7/27 пациентов развили тяжелую гепатотоксичность и 1/27 – нейротоксичность. Интересно, что болевой симптом, характерный для анти-GD2 антител, не был так выражен в случае анти-GD2 CAR-T [4]. Несмотря на частичный успех, результаты анти-GD2 CAR-T-терапии остаются скромными. Обзор клинических испытаний и варианты дальнейшего совершенствования метода CAR-T-терапии НБ изложены в последнем обзоре [12].

Одним из вариантов увеличения специфичности рецептора является таргетирование О-ацетил-GD2, производное дисиалоганглиозида в котором внешний остаток сиаловой кислоты модифицирован О-ацетиловым эфиром. Ацетилирование GD2 происходит только в опухолевых клетках и не встречается в периферических нервах [3, 5]. Известно mAb 8B6, специфичное именно к О-ацетил-GD2, для которого показана диагностическая ценность в распознавании материала НБ и меланомы методом иммуногистохимии [2]. Плотность экспрессии О-ацетил-GD2 на опухолевых клетках ниже, чем для GD2: от 10% до 50% молекул GD2 ацетилировано [7]. Доклинические испытания показали что 8B6-антитело обладает терапевтическим эффектом, схожим с 14.18, но лучшим профилем безопасности [18]. Таким образом, О-ацетил-GD2 является перспективной мишенью для CAR-T-терапии.

Таким образом, известно как минимум 3 терапевтических антитела, 14G2a, hu3F8 и 8B6 которые конкурируют друг с другом за таргетирование GD2 с помощью CAR-T-клеток. Результаты от-

дельных клинических испытаний опубликованы для CAR-T на основе 14G2a и hu3F8, но пока нет данных по использованию антитела 8B6 в составе CAR. Цель настоящего исследования получить химерные антигенные рецепторы 2-го поколения с различной длиной спейсера и оценить их функциональную активность в отношении ряда клеточных линий для обоснования дальнейших клинических испытаний.

Материалы и методы

Экспрессия маркеров нейробластомы на материале биопсии опухоли

Экспрессия маркеров в материале биопсии пациентов оценивалась методами проточной цитометрии. Исследованы биоптаты (ткань опухоли или пораженный костный мозг) опухоли от 23 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом. При иммунофенотипировании методом проточной цитометрии регион опухолевых клеток оценивается по фенотипу CD45⁻, CD56⁺, CD9⁺, CD81⁺. Дополнительное окрашивание проводили антителами к GD2.

Клеточные линии

В работе были использованы следующие иммортализованные клеточные линии: Т-лимфоциты Jurkat (DSMZ Catalog ACC 282), НЕК293Т (ATCC CRL-3216) – полученной из клеток эмбриональных почек человека. IMR-32 (ATCC CCL-127), LAN-1 (DSMZ ACC 655) и SK-N-BE(2) (ATCC CRL-2271) – клеточные линии НБ человека. 143В (ATCC CRL-8303) и KHOS-240S (ATCC CRL-1545) – клеточные линии остеосаркомы человека. Идентичность всех клеточных линий была проверена путем генотипирования STR полиморфизмов. Отсутствие контаминации микоплазмы контролировали методом ПЦР.

Сборка конструкции CAR

Сборка конструкций осуществлялась методом рестрикции и лигирования на основе вектора pWPXL (Addgene plasmid # 12257). Синтетические последовательности ДНК scFv и компонентов CAR были заказаны в Synbio Technologies. Собранные последовательности рецепторов были клонированы по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI (NEB) в вектор pWPXL и трансформированы в компетентные клетки XL10 Gold. Полученные бактериальные колонии проверялись методом ПЦР с конструкт-специфичными праймерами. Плазмидную ДНК выделяли коммерческим набором (NucleoBond® Xtra Maxi MN) из ночной культуры положительных по ПЦР бактериальных клеток колоний с OD > 3. Проверку правильности собранной конструкции проверяли рестрикционным картированием плазмидной ДНК и севкенированием по Сенгеру.

Получение CAR-T-клеток

В качестве исходного материала использовали периферическую кровь здорового донора с

антикоагулянтом ЭДТА. Фракцию мононуклеарных клеток (МНК) выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности с подсчетом в растворе 3% уксусной кислоты в камере Горяева и концентрировали до 1×10^7 /мл. Т-клетки выделяли путем негативной иммуномагнитной селекции CD3⁺ клеток по инструкции набора EasySep (Thermo Fisher Scientific, США), считали в камере Горяева количество и жизнеспособность клеток в 0,4%-ном растворе трипанового синего и записывали соотношения CD4/CD8 и фенотипический состав. Активацию клеток перед трансдукцией обеспечивали магнитными частицами CD3/CD28 (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific, США) в течение 48 часов в среде RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 10% ЭТС (Gibco, США) и 1× антибиотика-антимикотика в присутствии цитокинов IL-7, IL-15, IL-21 (Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 10 нг/мкл.

Спустя 48 часов после активации производили лентивирусную трансдукцию Т-клеток с множественностью инфекции 10 на плашках, обработанных RetroNectin (Takara Clontech, США) со спинокуляцией. Через сутки клетки отмывали той же полной средой с цитокинами и продолжали инкубацию в течение *in vitro* 8-12 суток с контролем прироста клеток, фенотипа и экспрессии tEGFR на 10-12-е сутки. Аналогичным образом, без добавления вируса, получали нетрансдуцированные лимфоциты, используемые в экспериментах в качестве МОСК-контроля.

NFAT индуцибельный GFP-репортер

Для проверки антиген-специфической активации химерных антигенных рецепторов нами был получен GFP-репортер путем трансдукции клеток Jurkat конструкцией с геном GFP под NFAT-индуцибельным промотором. Клон клеток Jurkat-NFAT-GFP, не обладающий фоновой флуоресценцией в отсутствие сигнала, далее был использован как репортерная клеточная линия. Клетки репортерной линии трансдуцировали тестируемыми конструкциями CAR так же, как и первичные Т-лимфоциты. В эксперименте на активацию, CAR⁺ Jurkat-NFAT-GFP-репортеры инкубировали в течение 18 часов совместно с модельными клеточными линиями мишеней, предварительно окрашенными красителем CellTrace Violet (Thermo Fisher Scientific, США). Активация оценивалась по проценту GFP⁺ клеток (нормализованное по количеству CAR⁺ клеток) и интенсивности сигнала флуоресценции (MFI) GFP.

Определение экспрессии маркера CD107a

В качестве мишеней использовали две клеточные линии – 143BGD2⁺ и LAN1GD2⁺. В качестве эффекторов CAR-Т-клетки донора 14G2a-BBz (S), 14G2a-BBz (L), 8B6-BBz (S), 8B6-BBz (L), hu3F8-BBz (L), в качестве контроля использовались лимфоциты без трансдукции CAR (МОСК). Для

разделения эффекторов и мишеней последние перед тестом стабильно окрашивались витальным красителем CellTrace Violet (Thermo Fisher Scientific, США). В 96 луночный планшет вносили клетки мишени и эффекторы в соотношении 1:1 без цитокинов, спустя час инкубирования в каждую лунку добавляли монензин (Sigma-Aldrich) и культивировали при 5% CO₂, 95 % влажности и 37 °С 20 часов. За 4 часа до окончания теста в каждую лунку добавляли моноканальное антитело (mAb) CD107a_PE. По завершению теста, образцы дополнительно окрашивались mAb – CD45_KO, CD3_PC7, CD8_FITC и приступали к записи на проточном цитофлуориметре DxFlex (Beckman Coulter, США).

Цитотоксический тест

Тест проводился в 96-луночном планшете при совместной инкубации эффекторов (CAR-Т-клеток и МОСК-контроль) с клетками-мишенями в течение 16 часов с последующей записью на проточном цитофлуориметре мертвых клеток мишени с окраской 7-AAD. Тест проводился в триплетах для трех соотношений эффектор : мишень = 2:1, 1:1, 1:2. Для разделения эффекторов и мишеней последние перед тестом также окрашивались витальным красителем CellTrace Violet. Расчет цитотоксической активности (ЦТА) выполнялся по формуле (7AAD⁺ с эффекторами) – (7AAD⁺ без эффекторов) / 100% – (7AAD⁺ без эффекторов). В качестве мишеней использовали GD2⁺ клеточную линию НБ LAN1, в качестве отрицательного контроля – GD2⁻ линию остеосаркомы 143В.

Тест на истощение CAR-Т-клеток с рестимуляцией мишенями

Тест проводился в 96-луночном планшете при совместной инкубации эффекторов с клетками-мишенями с установленным соотношением 1:1 на день 0. Клетки-мишени перед тестом были окрашены витальным красителем CellTrace Violet. Каждые 2 дня производили запись одной исследуемой лунки на проточном цитофлуориметре, для определения мертвых клеток-мишеней с окраской 7-AAD и персистенцию CAR-Т с окраской EGFRt. В оставшиеся лунки добавляли свежее окрашенные CellTrace Violet клетки-мишени в том же количестве, что и в день 0. Тест выполняется в полной среде RPMI1640 с 10% ЭТС в отсутствие цитокинов. Истощение Т-клеток оценивали на 8-е сутки после окраски эффекторов TIM-3 (PE), TIGIT (PC7), PD1 (APC-750).

Статистика

Статистическую обработку данных проводили в программах GraphPad Prism 8.0 и R-статистика. Для сравнения различий по активации и цитотоксической активности использовался t-тест для независимых выборок (при равенстве дисперсий) и критерий Уэлча (при неравенстве дис-

персий двух групп). Значение $p < 0,05$ считали значимым для статистических выводов.

Результаты

Экспрессия GD2 на клетках нейробластомы пациентов

Маркер GD2 входит в диагностическую панель для анализа минимальной остаточной болезни и оценки поражения костного мозга (КМ) в типичном для НБ фенотипе CD45⁻, CD56⁺, CD81⁺, GD2⁺, V7-N3⁺. Типичный пример выделения региона опухолевых клеток показан на рисунке 1. Материалом для анализа являлась опухолевая ткань с подозрением на НБ и костный

мозг пациентов с подтвержденным диагнозом. Поражение было в 33 образцах от 29 пациентов при первичном диагнозе или рецидиве заболевания (15 образцов КМ и 18 опухолевой ткани). Для ткани содержание опухолевых клеток оценивалось в интервале 0,61-91% (медиана 23%). Все образцы ткани НБ были положительны по GD2 (100%). Из 15 образцов КМ 3 были негативны по GD2 (20%). Содержание GD2⁺ клеток в пораженном КМ пациентов составляло 0-73% (медиана 0,3%). GD2⁻ образцы КМ содержали 0,2%, 0,04% и 0,09% атипичных клеток, таким образом, отсутствие экспрессии GD2 связано с низкой опухоле-

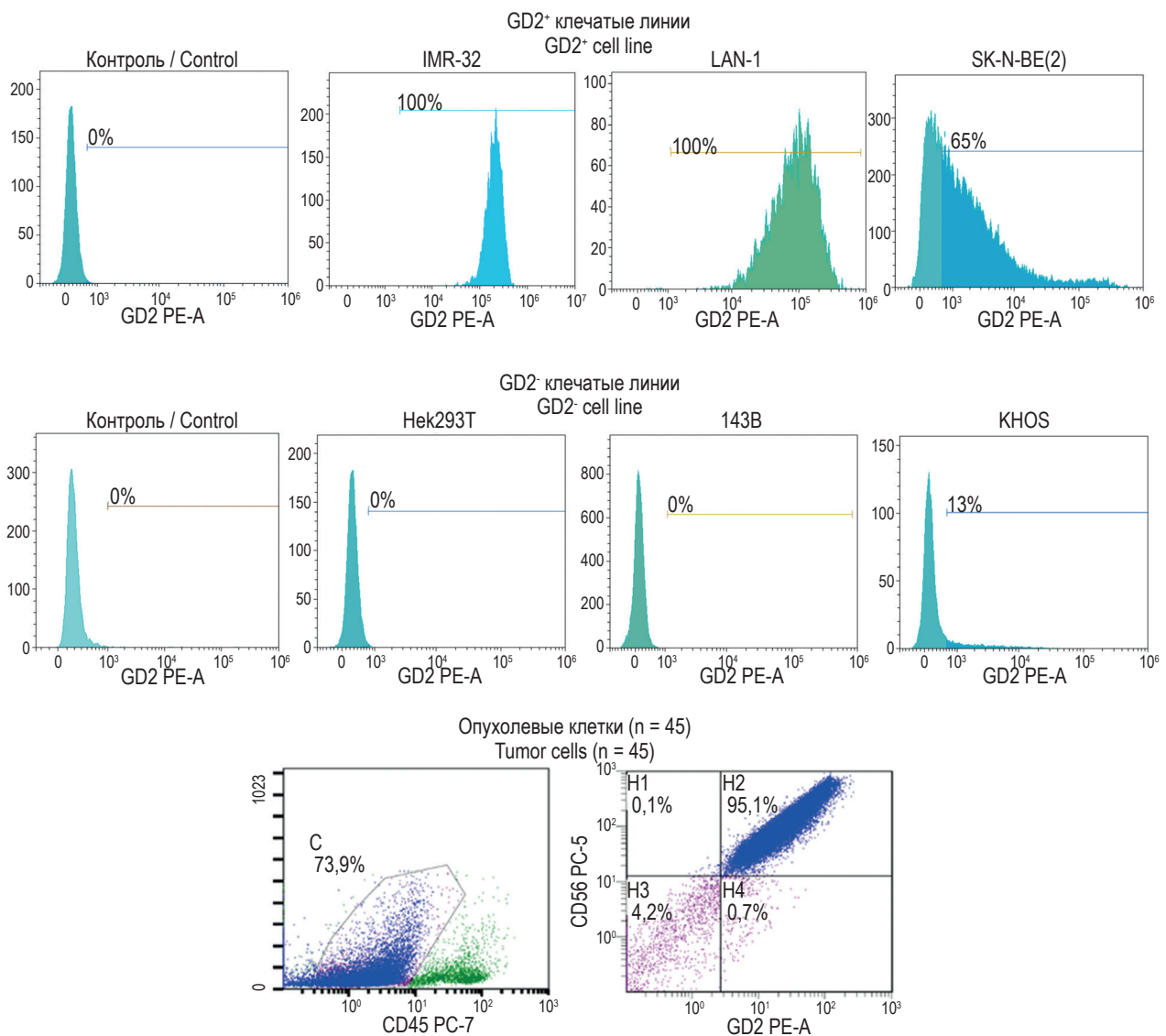


Рисунок 1. Экспрессия GD2 на клеточных линиях нейробластомы, остеосаркомы и опухолевых клетках пациентов с гистологически подтвержденной нейробластомой

Figure 1. Expression of GD2 on neuroblastoma, osteosarcoma cell lines and tumor cells from patients with histologically confirmed neuroblastoma

вой нагрузкой или недостаточным количеством материала.

Экспрессия GD2 на модельных клеточных линиях

Мы оценили экспрессию GD2 на трех клеточных линиях НБ, двух клеточных линиях остеосаркомы и одной неопухолевой клеточной линии с помощью проточной цитометрии. Клеточные линии НБ LAN-1 и IMR-32 были 100% положительными по GD2 с высокой интенсивностью экспрессии ($\Delta\text{MFI} = 2 \times 10^5$). Клеточная линия SK-N-BE(2) обладала низкой экспрессией, 65% GD2⁺, $\Delta\text{MFI} = 2 \times 10^3$. Клетки остеосаркомы 143В были полностью негативны по экспрессии GD2, клетки HEK293Т и KHOS отрицательны с содержанием 5% и 13% слабopоложительных GD2-клеток соответственно (рис. 1). Далее, мы использовали клетки LAN-1 как GD2⁺ мишени и 143В как GD2- контроль для большинства тестов функциональной активности CAR-T-клеток.

Дизайн химерных антигенных рецепторов

Было разработано 5 вариантов анти-GD2 конструкций CAR второго поколения, с включением в качестве антиген-распознающего домена scFv трех моноклональных антител – 14G2a, 8B6 и hu3F8. Все варианты рецепторов включали шарнирный регион IgG4, трансмембранный домен CD28TM, внутриклеточный костимуляторный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3 ζ . В конце через пептид 2A разместили транскрибированный вариант EGFRt в качестве белковой метки для мониторинга CAR-T-клеток. Вариации в конструкции рецептора были внесены путем добавления вставочных иммуноглобулиновых доменов CH2-CH3 между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом (L) или без него (S) (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки).

Активация с GFP-репортерными клетками

В результате теста произошло успешное распознавание антигена, и через CAR проходил сигнал, который индуцировал экспрессию зеленого флуоресцентного белка (GFP). Свечение CAR⁺ Jurkat-NFAT-GFP-репортеров в отсутствие клеток мишеней отражал тонический сигнал, неспецифический по отношению к антигену, off-target распознавание или самоактивацию рецептора (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки).

Тонический сигнал для всех рецепторов сохранялся на низком уровне до 10%, примерно соответствующему неспецифическому сигналу от GD2- клеток-мишеней (HeLa, 143В). Наибольший тонический и неспецифический сигнал наблюдался для рецептора 8B6-BBz (L). Специфическая активация в тесте с GD2⁺ положительными клетками-мишенями (SK-N-BE(2),

IMR-32 и LAN1) выражалась в кратном проросте GFP⁺ CAR-репортеров.

При попарном сравнении длинных (L) и коротких (S) вариантов рецепторов с антителом 14g2a короткий вариант демонстрировал большую активацию для вариантов с антителом 8B6 без достоверных отличий. Сравнение CAR на основе разных антител показал преимущество 14g2a и hu3F8 над 8B6 по всем GD2⁺ мишеням. Рецептор hu3F8-BBz (L) близок к 14G2a-BBz (S), но имеет тенденцию к лучшей активации на клетках BE(2) со сниженной экспрессией GD2.

Фенотип анти-GD2 CAR-T-клеток

Спустя 14 дней культивирования для каждого варианта анти-GD2 CAR-T и нетрансдуцированных Т-клеток (МОСК-контроль) оценивали уровень трансдукции и дифференцировочный фенотип методом проточной цитометрии. Содержание CD3⁺ клеток в продукте всегда превышало 90% (92-99%). Соотношение CD4/CD8 при используемом методе селекции и экспансии клеток составило в среднем 2:1, с вариацией для CD4⁺ клеток 55-60%, CD8⁺ клеток 37-44%. Уровень трансдукции по маркеру tEGFR составил 20-35% (медиана 27%).

Дифференцированная зрелость CAR-T клеток оценивалась по четырем маркерам CD45RO, CCR7, CD62L, CD95 с выделением этапов наивных Т-клеток (Tnaiv) и стволовых клеток памяти (Tscm), центральной памяти (Tcm), периферической памяти (Ttm) и терминальных эффекторов (Teff) (рис. 4). Сравнительным показателем, характеризующим сохранением пролиферативного потенциала является суммарный уровень CCR7⁺ «ранних» клеток (Tnaiv + Tscm + Tcm). МОСК-контроль сохранял уровень CCR7⁺ 22% для CD4-клеток и 21% для CD8-клеток. CAR-T-клетки имели сходный профиль дифференцированной зрелости – CCR7⁺ 22,6-31,5% для CD4-клеток и 21,7-26,3% для CD8-клеток.

Тест на определение экспрессии маркера CD107a

CD107a (LAMP-1, lysosomal associated membrane glycoprotein) является белком мембраны литических гранул, содержащих гранзим и перфорин. При активации цитотоксических клеток происходит высвобождение содержимого таких гранул (дегрануляция) и в этот момент CD107a обнаруживается на поверхности клетки [23, 24]. Таким образом, уровень CD107a является показателем цитотоксической активности CAR-T-лимфоцитов.

Проведенный тест показал, что при инкубации CAR-T-клеток с мишенями, дегрануляция CAR-T-клеток происходит GD2-зависимым образом (с LAN-1 более, чем с 143В) для CAR-T с распознающим доменом 14G2a и hu3F8, но не

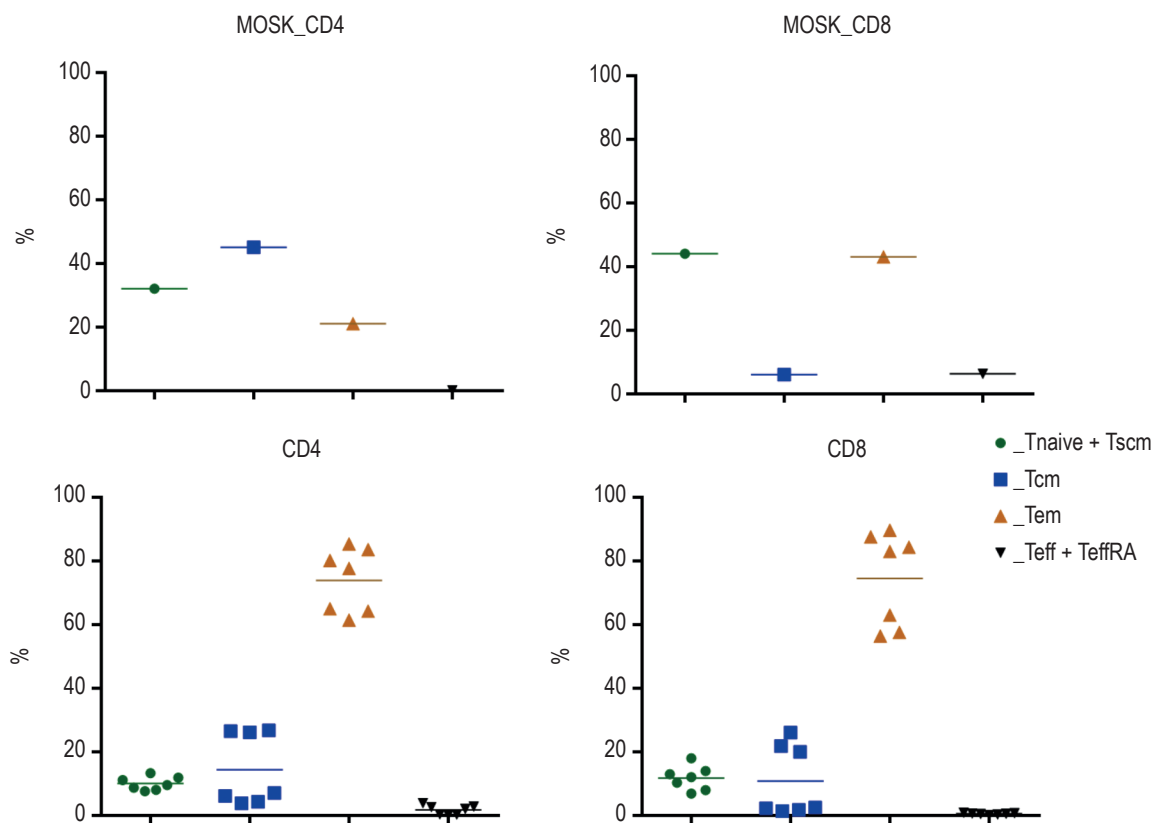


Рисунок 4. Популяционный состав МОСК-контроля и CAR-T-клеток в конце инкубации

Figure 4. Population composition of MOCK-control and CAR-T cells at the end of incubation

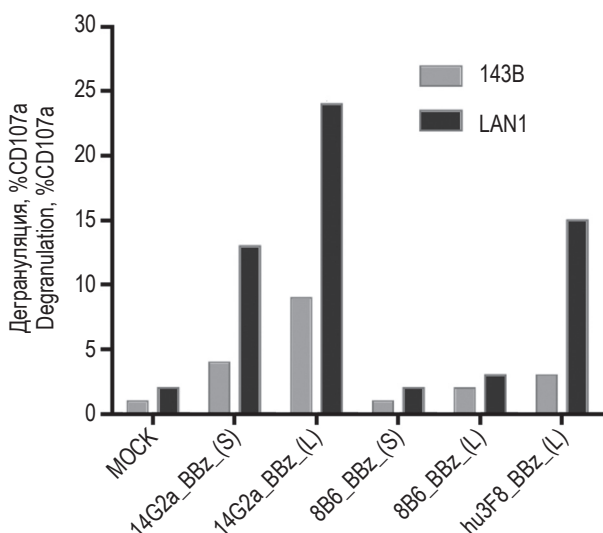


Рисунок 5. Экспрессия CD107a в присутствии опухолевых клеточных линий

Figure 5. Expression of CD107a in the presence of tumor cell lines

8B6, которое в данных условиях теста не отличается от МОСК-контроля. Для 14G2a CAR-T-клеток существенно более высокая дегрануляция показана для «длинного» варианта рецептора (L) со вставочными доменами (рис. 5).

Цитотоксическая активность анти-GD2 CAR-T-клеток

Прямой цитотоксический тест проводили в соотношениях эффектор:мишень = 2:1, 1:1, 1:2 со всеми пятью вариантами CAR-T. Для представления CAR-зависимой цитотоксичности конечные результаты рассчитывались как разница ЦТА CAR-T и соответствующего ему МОСК-контроля (рис. 6).

Все варианты CAR-T показали выраженную доза-зависимую цитотоксическую активность против GD2⁺ клеточной линии LAN-1, но не GD2⁻ линии 143В. Для рецептора 14G2a-BBz (L) ЦТА превосходит 14G2a-BBz (S), достоверно для соотношения 2:1 ($p = 0,013$). Цитотоксическая активность рецептора 8B6-BBz (L) также превосходит короткий вариант 8B6-BBz (S) рецептора ($p < 0,03$ для соотношений 2:1 и 1:1). Длинный

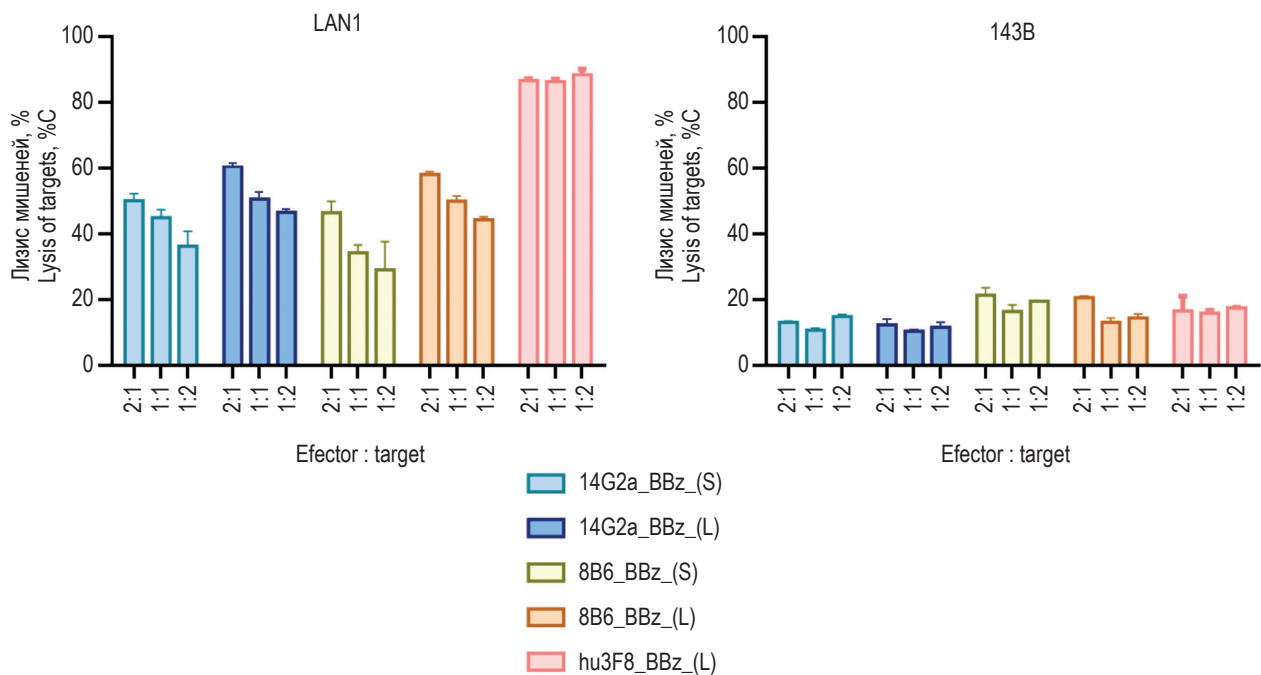


Рисунок 6. Сравнение цитотоксической активности всех вариантов CAR-T_Anti-GD2 против клеточной линии LAN1 и 143B в трех разных соотношениях

Figure 6. Comparison of cytotoxic activity of all CAR-T_Anti-GD2 variants against LAN1 and 143B cell line in three different ratios

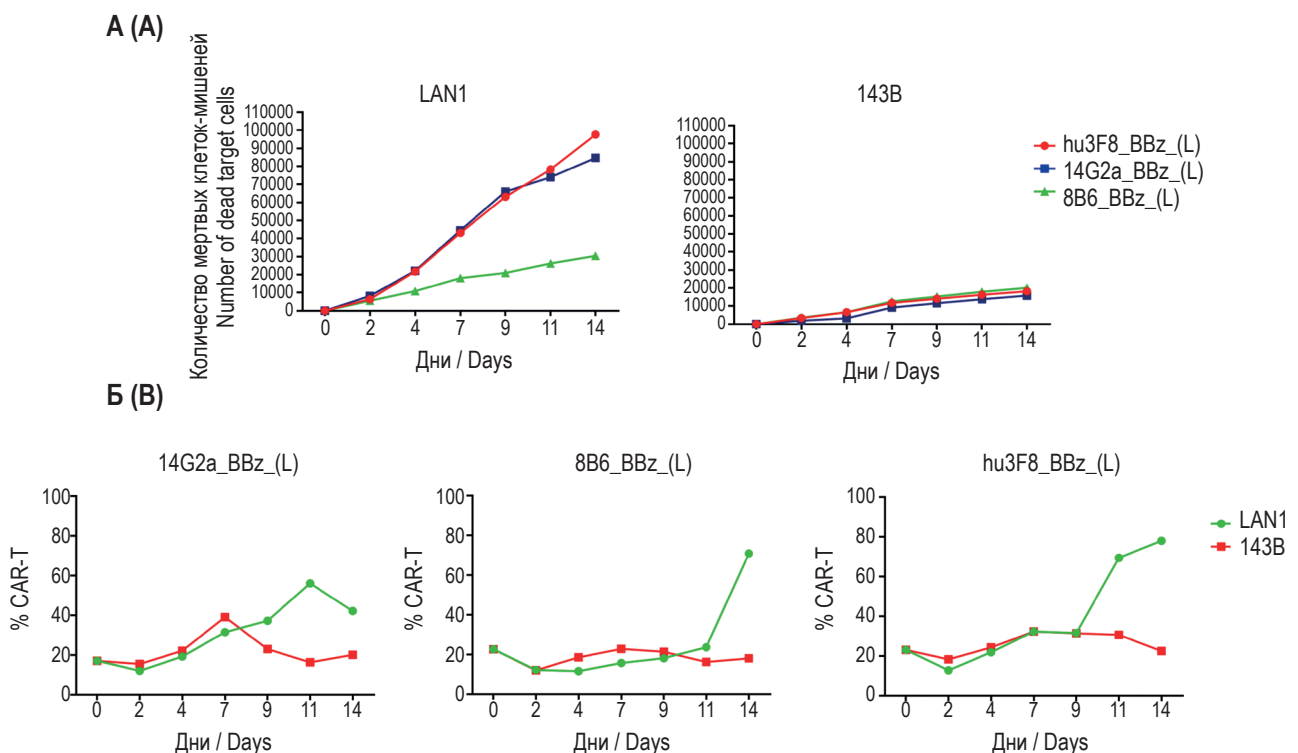


Рисунок 7. Цитотоксическая активность трех вариантов CAR-T_Anti-GD2 в тесте на рестимуляцию против клеточной линии LAN1 и 143B

Примечание. А – график накопления мертвых клеток-мишеней. Б – график персистенции CAR-T.

Figure 7. Cytotoxic activity of three CAR-T_Anti-GD2 variants in the restimulation test against LAN1 and 143B cell line

Note. A, graph of dead target cells accumulation. B, graph of CAR-T persistence.

вариант 14G2a-BBz обладает достоверно более высокой ЦТА чем 8B6-BBz (L). Наибольшей ЦТА обладает рецептор на основе антитела hu3F8 ($p < 0,001$ против всех).

Истощение CAR-T-клеток и контроль мишеней в тесте с рестимуляцией

Тест на истощение отличается от прямого цитотоксического теста длительностью и регулярным добавлением мишеней в течение 14 дней. Тест позволяет оценить способность CAR-T-клеток к экспансии, контролю большой опухолевой нагрузки и приобретению фенотипа истощения. Для данного теста были использованы варианты рецепторов (L) со вставочными доменами.

Результаты теста показали, что в тесте рецепторы 14G2a-BBz (L) и hu3F8-BBz (L) на протяжении двух недель обеспечивали полный контроль клеток-мишеней, с гибелью более 90% клеток LAN-1 во всех временных точках. Рецептор 8B6-BBz (L) обеспечил киллинг половины клеток мишеней на 2-е сутки, но затем ЦТА упала на уровень ниже 10%. Дальнейшая динамика показала еще больший отрыв ЦТА рецепторов 14G2a-BBz (L) и hu3F8-BBz (L), которые к 14-му дню показали трехкратное преимущество перед 8B6-BBz (L) в кумулятивной гибели мишеней LAN-1. В тесте с мишенями 143B со всеми тремя рецепторами количество мертвых клеток-мишеней находилось на одинаково низком уровне (рис. 7А).

Тест не показал экспансии абсолютного количества CAR-T-клеток, но доля CAR⁺ клеток среди всех лимфоцитов в тесте имело разную динамику. Все три варианта CAR-T-клеток персистировали примерно одинаково в течение первой недели, с последующим приростом для 14G2a-BBz (до 60%) и hu3F8-BBz (до 80%) к 11 дню при инкубации с LAN-1. CAR-T-клетки 8B6-BBz (L) персистировали на уровне 10-20% живых клеток в течение 11 суток теста как с LAN-1, так и 143B. На 14-е сутки отмечен прирост 8B6-BBz CAR-T-клеток с обоими мишенями (рис. 7Б).

Мы так же оценили экспрессию маркеров иммунного истощения (TIM-3, TIGIT и PD1) T-клеток после 8 дней культивирования с GD2⁺ (LAN1) и GD2⁻ (143B) клетками-мишенями. Повышение экспрессии TIM-3, TIGIT и PD1 отмечено для 14G2a-BBz и hu3F8-BBz в тесте с LAN-1 по сравнению с 143B (рис. 8).

Обсуждение

В последнее десятилетие в онкологии ознаменовалось большим успехом CAR-T-терапии. Первые клинические испытания CAR-T-

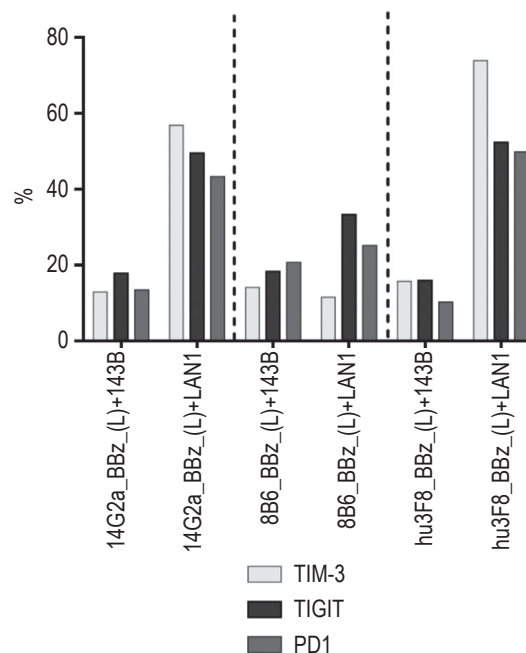


Рисунок 8. Маркеры истощения CAR-T-клеток на 8-е сутки совместного культивирования с клетками-мишенями (LAN-1 и 143B)

Figure 8. Markers of CAR-T cell depletion at 8 days of co-culture with target cells (LAN-1 and 143B)

терапии, нацеленные почти исключительно на дисаialogанглиозид GD2, показали скромный, но обнадеживающий результат. На сегодняшний день крайне актуальным является дальнейшее совершенствование метода в сторону большей безопасности и эффективности терапии. На уровне химерного антигенного рецептора, это обеспечивается специфичностью распознавания антигена, цитотоксической активностью CAR-T-клеток и антиген-зависимой персистенцией (экспансией) CAR-T-клеток.

В настоящей работе мы сравнивали функциональную активность CAR-T-клеток с тремя наиболее перспективными антиген-распознающими антителными доменами: классическое антитело 14G2a (денутуксимаб), гуманизированное антитело hu3F8 (накситумаб) и альтернативное антитело 8B6 в составе CAR второго поколения с 4-1BB костимуляторным доменом. Выбор распознающего модуля антитела до сих пор остается открытым, поскольку CAR, основанные на 14G2a- и hu3F8-антителах, показали сходный клинический результат, а 8B6 не использовался пока в клинических испытаниях в составе CAR. Открытым остается вопрос, насколько высокую аффинность к антигену должен иметь CAR для реализации наибольшего эффекта. Наибольшей аффинностью обладает hu3F8 ($K_D = 11\text{nM}$) [13], более низкой 14G2a ($K_D = 77\text{nM}$ [13] или 49 [2]).

Антитело 8В6 обладает промежуточной аффинностью ($K_D = 32$ [14]), но является более привлекательным из-за более высокой специфичности распознавания ацетилированной формы GD2, характерной для опухолевых клеток, но не периферических нервов [2].

Функциональная активность рецептора модулируется также длиной внеклеточной части рецептора, задаваемой вставочными иммуноглобулиновыми доменами CH2-CH3 встроенными между антительной частью рецептора и трансмембранным доменом. Ранее было показано, что для анти-CD19 CAR длинный спейсер мешает распознаванию антигена и противоопухолевой активности [9]. Для GD2, как правило, используют CAR с длинными спейсером, что, вероятно, обусловлено пространственным расположением антигена вблизи мембраны [17]. Недостатком включения иммуноглобулиновых Fc-доменов является их распознавание Fc γ RI (CD64) рецепторами макрофагов и ингибирование CAR-T-клеток. В нашем дизайне рецептора две мутации (L235E, N297Q) были внесены в IgG4 Fc для предотвращения распознавания Fc-рецепторами [10]. Короткие версии рецепторов 14G2a и 8В6 без вставочных доменов также испытывались на нашем исследовании.

Поскольку функциональная активность рецепторов зависит также от плотности экспрессии антигена на поверхности клеток, мы использовали несколько вариантов клеток-мишеней, отличающихся по уровню экспрессии GD2. Клеточные линии IMR-32 и LAN1 высоко экспрессировали GD2, НБ SK-N-BE(2) имела частичную экспрессию, клетки линий НЕК293Т и КНОС минимальный уровень экспрессии GD2, остеосаркома 143В была полностью GD2 негативна.

Тест на активацию с GFP-репортером точно отразил уровень экспрессии GD2 на клетках-мишенях. Наибольшая активация для всех вариантов рецептора была на клетках LAN1 и IMR-32, сниженная на клетках SK-N-BE(2), уровень активации всех вариантов CAR клетками HeLa и 143В сопоставим с тоническим сигналом. Интересно, что в данном тесте уровень активации мало зависит от длины спейсера, но отличается для разных антительных доменов. Так, активация 8В6 CAR достоверно ниже активации CAR-T-рецепторов на основе 14G2a и hu3F8. Рецептор на основе hu3F8 по активации превосходит 14G2a только на клетках SK-N-BE(2) с низкой экспрессией GD2.

Цитотоксическая активность всех вариантов CAR-T-клеток реализовывалась на клетках LAN1, но не 143В. При этом фиксируется достоверно более высокая цитотоксическая актив-

ность для CAR-T с длинными вариантами рецептора 14G2a и 8В6. Таким образом, подтверждается преимущество длинного спейсера для разных вариантов анти-GD2 рецепторов. Длинный вариант рецептора на основе hu3F8 показал наилучшие результаты цитотоксической активности превосходящей оба других антитела.

Гибель клеток мишеней в цитотоксическом тесте оказалась конкордантной экспрессии маркера дегрануляции CD107a на CAR-T-клетках. Рецепторы на основе 8В6-антитела имели минимальный уровень CD107a не отличимый от МОСК-контроля. Варианты CAR с 14G2a и hu3F8 достоверно повышали экспрессию CD107a при инкубации с LAN1 мишенями, но не 143В клетками. Рецептор 14G2a-BBz (L) повышал экспрессию почти вдвое больше варианта короткого рецептора 14G2a-BBz (L).

Маркеры истощения CAR-T-клеток TIM-3, TIGIT и PD-1 на 8-е сутки совместного культивирования с клетками-мишенями показали схожие результаты с максимальной экспрессией на CAR-T-клетках с длинными вариантами 14G2a и hu3F8 рецепторов. Экспрессия этих маркеров имеет двойственное значение. С одной стороны, маркеры истощения отражают уровень активации CAR-T-лимфоцитов, сопровождающей их функциональную активность. С другой стороны, высокие показатели маркеров истощения приводят к ингибированию и в конце концов гибели Т-клеток. При равном уровне активации и цитотоксической активности преимущество будут иметь CAR-T-клетки с меньшей индукцией маркеров истощения [8]. По нашим данным, hu3F8-BBz рецептор показал несколько более высокую активацию, чем 14G2a-BBz.

Три варианта CAR с наличием вставочных внеклеточных доменов рецептора сравнивались в финальном эксперименте на истощение с рестимуляцией клетками мишенями LAN1 и 143В. Этот эксперимент наиболее полно демонстрирует способность ограниченного количества CAR-T-клеток контролировать большое количество клеток-мишеней, а также пролиферировать в их присутствии. В отличие от короткого цитотоксического теста длительный тест показал неспособность рецептора 8В6-BBz контролировать клетки-мишени LAN1. 14G2a-BBz (L) и hu3F8-BBz (L) обеспечили уничтожение клеток мишеней LAN1 в течение 2 недель с небольшим лидерством hu3F8-BBz после 10-го дня. В тесте с GD2-негативными клетками 143В гибель мишеней сохранялась на стабильно низком уровне, накапливались живые мишени.

Интересно, что отличие от подобных тестов с рестимуляцией для анти-CD19 CAR, в нашем исследовании не происходила экспансия анти-

GD2 CAR-T-клеток в течение всего времени теста на уровне, превышающем исходное содержание CAR-T. В течение первой недели во всех тестах, как с LAN1, так и 143B, происходило небольшое увеличение доли CAR-T-клеток среди лимфоцитов за счет гибели нетрансдуцированных лимфоцитов. На 9-й день для 14G2a-BBz и hu3F8-BBz и на 11-й день 8B6-BBz CAR-T-клеток произошел скачок с персистенции CAR-T-клеток в культуре с LAN1 в отличие от культуры с 143B, где CAR-T гибли наряду с нетрансдуцированными лимфоцитами. К концу эксперимента наибольшее содержание CAR-T-клеток (около 80%) сохранилось для hu3F8-BBz, и что неожиданно, для 8B6-BBz (около 70%), за счет резкого прироста количества 8B6-BBz CAR-T-клеток с 11-х по 14-е сутки. Подобный прирост 8B6-BBz CAR-T-клеток можно объяснить замедленной активацией Т-клеток с этим рецептором. Персистенция и тем более экспансия CAR-T в ответ на стимуляцию антигеном является важнейшим фактором

их клинической эффективности [20] при условии сохранения высокого уровня цитотоксической активности.

Заключение

Обобщая все полученные результаты, мы показали, что среди анти-GD2 CAR второго поколения с 4-1BB сигнальным доменом, наилучшую противоопухолевую активность демонстрирует hu3F8-BBz с длинными внеклеточным спейсером, выигрывающий у 14G2a-BBz по цитотоксической активности и распознаванию клеток со сниженным уровнем экспрессии GD2. Наихудшие показатели цитотоксической активности и активации показал рецептор 8B6-BBz. Тем не менее более высокая специфичность 8B6-антитела в отношении опухолевых клеток обладает потенциальным преимуществом, но для его реализации в виде CAR-T, очевидно, требуется изменение конструкции с целью увеличения аффинности и мультипликации внутриклеточного сигнала.

Список литературы / References

1. Пролесковская И.В., Конопля Н.Е., Быданов О.И. Терапия рецидивов/прогрессии болезни у пациентов с нейробластомой в Республике Беларусь за 20-летний период: когортное исследование // Российский журнал детской гематологии и онкологии, 2019. Т. 6, № 4. С. 40-47. [Proleskovskaya I.V., Konoplya N.E., Bydanov O.I. Treatment of relapse/progression of the disease in patients with neuroblastoma in the Republic of Belarus over a 20-year period: a cohort study. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 2019, Vol. 6, no. 4, pp. 40-47. (In Russ.)]
2. Alvarez-Rueda N., Desselle A., Cochonneau D., Chaumette T., Clemenceau B., Leprieur S., Bougras G., Supiot S., Mussini J.-M., Barbet J., Saba J., Paris F., Aubry J., Birklé S. A monoclonal antibody to O-Acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 9, e25220. doi: 10.1371/journal.pone.0025220.
3. Cavdarli S., Delannoy P., Groux-Degroote S. O-acetylated gangliosides as targets for cancer immunotherapy. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 3, 741. doi: 10.3390/cells9030741.
4. Del Bufalo F., De Angelis B., Caruana I., del Baldo G., De Ioris M.A., Serra A., Mastronuzzi A., Cefalo M.G., Pagliara D., Amicucci M., Pira G.L., Leone G., Bertaina V., Sinibaldi M., Di Cecca S., Guercio M., Abbaszadeh Z., Iaffaldano L., Gunetti M., Iacovelli S., Bugianesi R., Macchia S., Algeri M., Merli P., Galaverna F., Abbas R., Garganesi M.C., Villani M.F., Colafati G.S., Bonetti F., Rabusin M., Perruccio K., Folsi V., Quintarelli C., Locatelli F.; Precision Medicine Team-IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù. GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.*, 2023, Vol. 388, no. 14, pp. 1284-1295.
5. Faraj S., Bahri M., Fougeray S., El Roz A., Fleurence J., Véziers J., Leclair M.D., Thébaud E., Paris F., Birklé S. Neuroblastoma chemotherapy can be augmented by immunotargeting O-acetyl-GD2 tumor-associated ganglioside. *Oncimmunology*, 2018, 7, no. 1, e1373232. doi: 10.1080/2162402X.2017.1373232.
6. Furman W.L. Monoclonal antibody therapies for high risk neuroblastoma. *Biologics*, 2021, Vol. 15, pp. 205-219.
7. Fleurence J., Fougeray S., Bahri M., Cochonneau D., Clémenceau B., Paris F., Heczey A., Birklé S. Targeting O-Acetyl-GD2 ganglioside for cancer immunotherapy. *J. Immunol. Res.*, 2017, Vol. 2017, 5604891. doi: 10.1155/2017/5604891.
8. Harush O., Asherie N., Kfir-Erenfeld S., Adler G., Barliya T., Assayag M., Gatt M.E., Stepensky P., Cohen C.J. Preclinical evaluation and structural optimization of anti-BCMA CAR to target multiple myeloma. *Haematologica*, 2022, Vol. 107, no. 10, pp. 2395-2407.
9. Hudecek M., Sommermeyer D., Kosasih P.L., Silva-Benedict A., Liu L., Rader C., Jensen M.C., Riddell S.R. The non-signaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunol. Res.*, 2015, Vol. 3, no. 2, pp. 125-135.
10. Jonnalagadda M., Mardiros A., Urak R., Wang X., Hoffman L.J., Bernanke A., Chang W.-C., Bretzlaff W., Starr R., Priceman S., Ostberg J.R., Forman S.J., Brown C.E. Chimeric antigen receptors with mutated IgG4 Fc spacer avoid Fc receptor binding and improve T cell persistence and antitumor efficacy. *Mol. Ther.*, 2015, Vol. 23, no. 4, pp. 757-768.

11. June C.H., O'Connor R.S., Kawalekar O.U., Ghassemi S., Milone M.C. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 2018, Vol. 359, no. 6382, pp. 1361-1365.
12. Lutskovich D., Meleshko A., Katsin M. State of the art and perspectives of chimeric antigen receptor T cells cell therapy for neuroblastoma. *Cytotherapy*, 2024, Vol. 26, no. 10, pp. 1122-1131.
13. Mao R., Kong W., He Y. The affinity of antigen-binding domain on the antitumor efficacy of CAR T cells: Moderate is better. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1032403. doi: 10.3389/fimmu.2022.1032403.
14. Nazha B., Inal C., Owonikoko T.K. Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy. *Front. Oncol.*, 2020, Vol. 10, 1000. doi: 10.3389/fonc.2020.01000.
15. Peinemann F., van Dalen E.C., Enk H., Tytgat G.A.M. Anti-GD2 antibody-containing immunotherapy postconsolidation therapy for people with high-risk neuroblastoma treated with autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2019, Vol. 4, no. 4, CD012442. doi: 10.1002/14651858.CD012442.pub2.
16. Qian K., Li G., Zhang S., Fu W., Li T., Zhao J., Lei C., Wang Y., Hu S. CAR-T-cell products in solid tumors: Progress, challenges, and strategies. *Interdiscip. Med.*, 2024, Vol. 2, e20230047. doi: 10.1002/INMD.20230047.
17. Thomas S., Straathof K., Himoudi N., Anderson J., Pule M. An optimized GD2-targeting retroviral cassette for more potent and safer cellular therapy of neuroblastoma and other cancers. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 3, e0152196. doi: 10.1371/journal.pone.0152196.
18. Terme M., Dorvillius M., Cochonneau D., Chaumette T., Xiao W., Diccianni M.B., Barbet J., Yu A.L., Paris F., Sorkin L.S., Birklé S. Chimeric antibody c.8B6 to O-acetyl-GD2 mediates the same efficient anti-neuroblastoma effects as therapeutic ch14.18 antibody to GD2 without antibody induced allodynia. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 2, e87210. doi: 10.1371/journal.pone.0087210.
19. Wang V., Gauthier M., Decot V., Reppel L., Bensoussan D. Systematic Review on CAR-T cell clinical trials up to 2022: academic center input. *Cancers*, 2023, Vol. 15, no. 4, 1003. doi: 10.3390/cancers15041003.
20. Wittibschlager V., Bacher U., Seipel K., Porret N., Wiedemann G., Haslebacher C., Hoffmann M., Daskalakis M., Akhoundova D., Pabst T. CAR T-cell persistence correlates with improved outcome in patients with B-cell lymphoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 6, 5688. doi: 10.3390/ijms24065688.
21. Yan P., Qi F., Bian L., Xu Y., Zhou J., Hu J., Ren L., Li M., Tang W. Comparison of incidence and outcomes of neuroblastoma in children, adolescents, and adults in the united states: A Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program population study. *Med. Sci. Monit.*, 2020, Vol. 26, e927218. doi: 10.12659/MSM.927218.

Авторы:

Луцкович Д.В. — научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Керезь М.А. — младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Клыч А.В. — научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Луцкович Е.С. — младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Мелешко А.Н. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Authors:

Lutskovich D.V., Researcher, Laboratory of Genetic Biotechnology, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Keraz M.A., Junior Researcher, Laboratory of Genetic Biotechnology, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Klych H.V., Researcher, Laboratory of Genetic Biotechnology, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Lutskovich E.S., Junior Researcher, Laboratory of Genetic Biotechnology, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Meleshko A.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Genetic Biotechnology, Scientific Department, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Поступила 20.12.2024
Отправлена на доработку 27.12.2024
Принята к печати 23.03.2025

Received 20.12.2024
Revision received 27.12.2024
Accepted 23.03.2025

НЕТРИН-1 АКТИВИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ СОБСТВЕННОГО ГЕНА И ГЕНА СВОЕГО РЕЦЕПТОРА *unc5b*, НО ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *ccl19* В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ ТНР-1

Некрасова Е.В.¹, Орлов С.В.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. По данным Всемирной организации здравоохранения, за 2021 год основной причиной инвалидности и смертности людей во всем мире была ишемическая болезнь сердца, на третьем месте по числу смертей – инсульт. Данные сердечно-сосудистые заболевания, в том числе инфаркт миокарда и аневризмы стенки аорты, обусловлены системным хроническим воспалительным процессом под названием атеросклероз. Это заболевание развивается на протяжении десятилетий и характеризуется нарушением целостности эндотелиального слоя сосудов, избыточным накоплением липидов в стенках сосудов, дисфункцией макрофагов и гладкомышечных клеток и развитием воспаления артериальных стенок. Одним из путей регрессии атеросклероза может служить эмиграция макрофагов, нагруженных эфирами холестерина, из атеросклеротической бляшки по лимфатическим сосудам в региональные лимфоузлы и, в дальнейшем, в печень для последующего метаболизма холестерина. Белок нетрин-1 является ингибитором миграции иммунных клеток. Представляет интерес изучение аутокринной/паракринной регуляции экспрессии гена нетрина-1 в макрофагах человека. Понимание этого процесса может являться основой для поиска новых подходов в терапии атеросклероза. Цель исследования – изучить влияние белка нетрина-1 на уровень экспрессии генов *ntn1*, его рецептора *unc5b* и хемокина *ccl19*. Работа выполнена на макрофагах, дифференцированных из линии острой моноцитарной лейкемии человека ТНР-1. Анализ экспрессии генов *ntn1*, *unc5b*, *ccl19* на уровне матричной РНК проведен методами обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а на уровне белка анализ сделан методом проточной цитофлуориметрии. Нетрин-1 в концентрации 50 нг/мл индуцировал экспрессию генов *ntn1* и *unc5b*, но подавлял экспрессию гена *ccl19* в макрофагах человека. Однако в концентрации 250 нг/мл нетрин-1 приводил к значительному снижению экспрессии собственного гена *ntn1*. Нетрин-1 оказывает ауторегулирующее влияние на экспрессию своего гена и гена своего рецептора *unc5b* в макрофагах человека. Подавление нетрином-1 экспрессии хемокина *ccl19* в макрофагах может являться одним из путей ингибирования эмиграции макрофагов данным эффектором. Полученные результаты расширяют представление о регуляции экспрессии белков, ответственных за миграцию макрофагов, и в перспективе могут быть использованы для поиска новых мишеней в терапии атеросклероза.

Ключевые слова: нетрин-1, *ntn1*, *unc5b*, *ccl19*, макрофаги человека

Адрес для переписки:

Некрасова Екатерина Викторовна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
Факс: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: katherina.nekrasova@gmail.com

Address for correspondence:

Ekaterina V. Nekrasova
Institute of Experimental Medicine
12 Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197022 Russian Federation
Phone: +7 (812) 234-68-68.
Fax: +7 (812) 234-94-89.
E-mail: katherina.nekrasova@gmail.com

Образец цитирования:

Е.В. Некрасова, С.В. Орлов «Нетрин-1 активирует экспрессию собственного гена и гена своего рецептора *unc5b*, но подавляет экспрессию гена *ccl19* в макрофагах человека линии ТНР-1» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 1013-1020.
doi: 10.15789/1563-0625-NUT-3151

© Некрасова Е.В., Орлов С.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.V. Nekrasova, S.V. Orlov “Netrin-1 upregulates the its own gene expression and *unc5b* gene expression, but downregulates *ccl19* gene expression in human macrophages THP-1 cell line”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 5, pp. 1013-1020.
doi: 10.15789/1563-0625-NUT-3151

© Nekrasova E.V., Orlov S.V., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-NUT-3151

NETRIN-1 UPREGULATES THE ITS OWN GENE EXPRESSION AND *unc5b* GENE EXPRESSION, BUT DOWNREGULATES *ccl19* GENE EXPRESSION IN HUMAN MACROPHAGES THP-1 CELL LINE

Nekrasova E.V.^a, Orlov S.V.^{a, b}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. According to the WHO data of 2021, ischemic heart disease was the leading cause of human disability and mortality at a global level, with brain stroke being the third leading cause of death. These cardiovascular diseases, including myocardial infarction and aortic aneurysms, are largely caused by atherosclerosis, a systemic chronic inflammatory process. This disease develops over decades and is characterized by the disruption of the vascular endothelial layer integrity, excessive lipid accumulation in arterial walls, macrophage and smooth muscle cells dysfunction, and evolving inflammation of arterial walls. One of approaches to atherosclerosis regression may be emigration of cholesterol ester-laden macrophage from atherosclerotic plaque *via* lymphatic vessels to the regional lymph nodes, and then to liver for subsequent cholesterol metabolism. The protein netrin-1 is inhibitor of immune cells migration. Particular interest is the study of the autocrine/paracrine regulation of netrin-1 gene expression in human macrophages. The understanding of this process may provide a basis for discovery of the new approaches to atherosclerosis therapy. The aim of the present article was to study the influence of protein factor netrin-1 on the gene expression levels of *ntn1*, its receptor *unc5b*, and *ccl19*. The experiments were carried out on the macrophage-like cells derived from acute monocytic leukemia cell line THP-1. The expression of *ntn1*, *unc5b*, *ccl19* genes was performed by reverse transcription and real-time quantitative PCR (mRNA level), and by flow cytometry (at the protein level). Netrin-1 at the concentration of 50 ng/mL induced *ntn1* and *unc5b* gene expression, but suppressed *ccl19* gene expression in human macrophages. However, netrin-1 applied at the concentration of 250 ng/mL caused a significant downregulation of the own *ntn1* gene expression. Netrin-1 has autoregulatory effect on its own gene expression, and on the gene encoding its receptor (*unc5b*) in human macrophage-like cells. The downregulation of chemokine *ccl19* expression in macrophages mediated by netrin-1 may be a potential way by which this effector inhibits macrophage emigration. The obtained results suggest a regulatory mechanism for expression of proteins responsible for macrophage migration, which in the future will enable application of these data for searching new targets in atherosclerosis therapy.

Keywords: netrin-1, gene expression, *ntn1*, *unc5b*, *ccl19*, human macrophages

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург.

Введение

Атеросклероз — это хроническое системное заболевание, имеющее патофизиологические последствия, такие как инсульт и инфаркт миокарда. Оно характеризуется аккумуляцией богатых холестерином липопротеинов низкой плотности (LDL) в стенках артерий в местах, где целостность эндотелия может быть повреждена: ветвления, изгибы сосудов и другое. После проникновения LDL в субэндотелиальное пространство они подвергаются химическим и ферментативным модификациям, превращаясь в окисленные (oxLDL) и другие формы модифицированных LDL [15]. OxLDL распознаются макрофагами как патогены и захватываются сквенджер-рецепторами. Макрофаги приобретают провоспалительный фенотип, активно секретируют провоспалитель-

ные цитокины, трансформируются в пенистые клетки и теряют способность к эмиграции в периферические лимфоузлы и, в дальнейшем, в печень. Эти клетки формируют некротическое ядро бляшки, что является спутником развития атеросклероза [2].

В недавних исследованиях был определен ряд факторов, подавляющих эмиграцию макрофагов из атеросклеротической бляшки: накопление холестерина в макрофагах, гипоксия, высокое артериальное давление, повышенная экспрессия в клетках ингибиторов миграции — нетрина-1 и семафорина-3А [1, 9].

Нетрин-1 — это ламининоподобный белок, регулирующий хемотаксис клеток. На N-конце белка располагаются 2 домена: домен IV и домен V, которые связываются с рецепторами DCC (супрессор колоректального рака), неогенином и рецепторами семейства UNC5 [21]. В зависимости от того, с каким рецептором связывается нетрин-1, наблюдаются различные биологиче-

ские эффекты. К примеру, связывание белка с рецептором DCC приводит к хемоаттракции, а связывание с семейством рецепторов UNC5 — к хеморепульсии [9]. С-конец этого белка богат основными аминокислотами, которые выступают сайтами связывания мембранных гликолипидов и протеогликанов, тем самым обеспечивая взаимодействие белка с компонентами клеточной поверхности и внеклеточным матриксом [10].

У человека ген нетрина-1 *ntn1* локализуется на 17-й хромосоме и кодирует белок, состоящий из 604 аминокислотных остатков [5]. Высокий транскрипционный уровень нетрина-1 наблюдается в сердце, головном мозге, почках и легких, при этом низкий уровень — в печени, тонком кишечнике и селезенке [12]. Функции нетрина-1 в организме человека обширные: он оказывает влияние на ангиогенез, морфогенез, ингибирует апоптоз, ввиду чего относится к онкогенам [5]. Нетрин-1 контролирует эпителиально-мезенхимальный переход, ключевой процесс органогенеза легких [5]. Кроме того, показано, что нетрин-1 участвует в морфогенезе поджелудочной железы и ремоделировании разных типов тканей в экспериментах *in vivo* [12]. Эти данные указывают на то, что нетрин-1 и его рецепторы играют важную роль в морфогенезе множества тканей.

Данные о влиянии нетрина-1 на иммунную систему противоречивы. В зависимости от модели исследования и типа клеток, продуцирующих нетрин-1, этот белок оказывает провоспалительное либо противовоспалительное действие. Так, при развитии острого воспаления легких, почек и при перитоните нетрин-1 является противовоспалительной молекулой. Однако в костной ткани и адипоцитах нетрин-1 выступает как провоспалительный агент. Он способен активировать остеокласты, что приводит к остеолиту, т. е. разрушению кости. При секреции нетрина-1 жировыми клетками развивается хроническое воспаление, инсулинорезистентность и подавление миграции близлежащих макрофагов [5].

В условиях развития атеросклероза нетрин-1, связываясь с рецептором UNC5B, подавляет миграцию моноцитов и макрофагов [19]. На гладкомышечных клетках имеется другой рецептор к нетрину-1 — неогенин. Через этот рецептор нетрин-1, наоборот, вызывает хемоаттракцию. Гладкомышечные клетки начинают активно мигрировать и образуют фиброзную капсулу вокруг бляшки [19]. Эндотелиальные клетки в нормальных физиологических условиях секретируют нетрин-1 в кровяное русло в высоких дозах. В крови нетрин-1 связывается с рецептором UNC5B на поверхности моноцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и препятствует адгезии этих клеток к слою эндотелия [5, 9]. Помимо этого, нетрин-1 подавляет экспрессию адгезионных молекул в эндотелиоцитах. При прогрессировании атеросклеротического поражения сосудов количество

секретируемого нетрина-1 эндотелием снижается, но возрастает количество адгезионных молекул на эндотелиальных клетках, таких как VCAM-1, ICAM-1, E-селектин, что усиливает диапедез (процесс выхода форменных элементов крови через стенку сосуда в ткани) [5].

В макрофагах нетрин-1 ингибирует миграцию, вызванную рядом хемокинов: CCL19, CCL21, CCL2 и анафилатоксином C5a через связывание со своим рецептором UNC5B [18, 19]. За эмиграцию нагруженных липидами макрофагов за пределы бляшки отвечают хемокины CCL19 и CCL21 [9]. Исследован механизм подавления хемотаксиса в макрофагах: нетрин-1 ингибирует миграцию посредством угнетения активности малой ГТФазы Rac1 и подавления фосфорилирования киназы фокальной адгезии FAK. Эти сигнальные молекулы ответственны за реорганизацию актинового цитоскелета и поляризацию клеток [19]. Влияние макрофагального нетрина-1 на атерогенез было продемонстрировано в экспериментах по делеции нетрина-1 в макрофагах мышей с гиперхолестеринемией (линия мышей, нокаутных по гену рецептора LDL): отсутствие нетрина-1 приводило к эмиграции нагруженных эфирами холестерина макрофагов в лимфатическую систему и регрессии атеросклероза [19]. В других экспериментах было показано, что при высокой продукции нетрина-1 макрофаги поляризуются в направлении M2 (противовоспалительный статус), начинают продуцировать IL-4, IL-13 и перестают продуцировать IL-6 и циклооксигеназу-2 (COX-2) [16]. Нетрин-1 активирует транскрипционные факторы PPARs (рецепторы активаторов пролиферации пероксисом), участвующие в противовоспалительном сигналинге. Это приводит к репрессии активации фактора транскрипции NF-κB, подавлению синтеза тромбксана A2 и простагландина E2 в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [16]. С одной стороны, поляризация клеток в направлении альтернативно активируемых макрофагов (M2) снижает локальное воспаление, с другой стороны, макрофаги M2 теряют способность к миграции, вызванной хемокинами CCL19 и CCL21, в отличие от M1 (провоспалительных) макрофагов. Дело в том, что на мембране макрофагов M1 выставлен рецептор, ответственный за хемотаксис, CCR7, в то время как в макрофагах M2 рецептор CCR7 уходит с поверхности цитоплазматической мембраны в мембраны эндоплазматического ретикула и перестает быть функциональным [20]. Таким образом, имеющиеся данные в литературе показывают, что иммуномодулирующий эффект нетрина-1 зависит от того, в каких клетках продуцируется нетрин-1, и от соответствующего микроокружения.

Есть клинические данные, свидетельствующие о том, что концентрация нетрина-1 в плазме крови понижена у пациентов с субклиническим

атеросклерозом по сравнению со здоровыми пациентами. Имеется обратная корреляция концентрации нетрина-1 в плазме крови с объемом атеросклеротических бляшек [3], а также с гликемией и высоким индексом массы тела, которые являются сердечно-сосудистыми факторами риска [8]. При этом внутриклеточный уровень нетрина-1 в макрофагах повышен у пациентов со стабильной стенокардией и острым инфарктом миокарда [8].

Приведенный анализ показывает, что роль нетрина-1 в атерогенезе до сих пор обсуждается. Мало известно об аутокринной и паракринной регуляции нетрина-1 в макрофагах, о регуляции его рецептора UNC5B. В настоящей работе нами впервые представлены данные о влиянии нетрина-1 на экспрессию генов *ntn1*, *unc5b*, *ccl19* в макрофагах человека.

Материалы и методы

Рекомбинантный человеческий нетрин-1 был приобретен у R&D Systems, США (6419-N1). Кроличьи поликлональные антитела против человеческого UNC5B (ab104871) и козы поликлональные антитела против IgG кроликов, меченные флуорофором TRITC (ab7051-1), были приобретены у компании Abcam (США).

Клеточные культуры

Клеточная линия острой моноцитарной лейкемии человека THP-1 была получена из банка клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С в среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением 10%-ной телячьей эмбриональной сыворотки (FCS) и гентамицина в концентрации 40 мкг/мл. Дифференцировку моноцитов THP-1 в макрофаги проводили с использованием форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA) в концентрации 50 нг/мл (81 нМ) в течение 24 ч. Затем клетки отмывали от форболового эфира, меняли среду на свежую RPMI-1640, содержащую 10% FCS и 40 мкг/мл гентамицина, и продолжали дифференцировку в течение 48 ч. Общее время дифференцировки клеток THP-1 составляло 4 дня при инкубации с нетрином-1 в течение 24 ч и 5 дней при инкубации с нетрином-1 в течение 48 ч.

Выделение РНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени

Тотальную РНК из культивируемых клеток выделяли с использованием реагента ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией изготовителя. Концентрацию и чистоту РНК определяли с помощью планшетного спектрофотометра Synergy 2 (BioTek, США). Отношение поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм было выше 2, и отношение поглощения при 260 нм и 230 нм было выше 1,7. Отсутствие

деградации РНК проверяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле по сохранению целостности рибосомальных РНК. Для проведения реакции обратной транскрипции брали равное количество РНК для всех точек. Реакцию обратной транскрипции (с 1 мкг тотальной РНК) проводили с использованием смеси праймеров oligo(dT) и специфических 3'-праймеров к генам *ntn1*, *unc5b*, *ccl19*. Для проведения реакции использовали реактивы компании ЗАО «Евроген» (Россия). ПЦР в реальном времени проводили по технологии Taqman или по интеркаляции SYBR Green с использованием амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США). Компоненты реакционной смеси были приобретены у компании ООО «Синтол», Россия. Праймеры и флуоресцентные зонды для референсных генов, кодирующих белки 60S кислый рибосомальный белок P0 (RPLP0), циклофилин А и β-актин, были описаны ранее [13, 14, 17].

Для детекции мРНК гена *ntn1* использовали следующие праймеры и зонд: прямой праймер 5'-CCTGCAAAGCCTGTGATT-3'; обратный праймер 5'-GCGCTACAGGGATCTTTATG-3'; зонд 5'-ROX-CAGAGCCGCTCTCCCATCGC-BHQ2-3';

unc5b: прямой праймер 5'-CAAGCAGGCACTGATTCT-3'; обратный праймер 5'-CCGTTGCACTTGAAGTAGAT-3';

ccl19: прямой праймер 5'-GCTCACACATTACCCGTT-3'; обратный праймер 5'-CAGCCATCCTTGATGAGAAG-3'.

Нормирование результатов ПЦР проводили по среднему геометрическому из трех референсных генов (RPLP0, циклофилин А, β-актин), как описано ранее [14]. Пороговое число циклов (Ct) для каждого гена было определено с помощью CFX-96 RealTime PCR System и программой Bio-Rad. Относительные значения уровня мРНК генов *ntn1*, *unc5b*, *ccl19*, выраженные в процентах относительно контроля, были вычислены по формуле:

$$2^{(\Delta C_t(\text{control}) - \Delta C_t(\text{опыт}))} \times 100\%.$$

Проточная цитофлуориметрия

Макрофаги инкубировали с коллагеназой (Accutase, Thermo Fisher, США) 20 мин при 37 °С, снимали с планшета, центрифугировали и инкубировали в блокирующем буфере (фосфатно-солевой буферный раствор, 2% FCS) 30 мин при комнатной температуре на шейкере (ST3, ELMi, Латвия) при 500 об/мин. Клетки инкубировали с кроличьими поликлональными антителами против человеческого UNC5B (разведение 1:100) в блокирующем буфере в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере, отмывали 3 раза в фосфатно-солевом буфере и далее инкубировали со вторичными козыми поликлональными антителами против IgG кроликов, меченные флуорофором TRITC (разведение 1:1000) в блокирующем буфере, в течение 30 мин в темноте

при комнатной температуре. Затем клетки отмывали 3 раза в фосфатно-солевом буфере. Клетки, обработанные вторичными антителами, но не инкубированные с антителами против UNC5B, использовали в качестве контроля специфичности иммунной окраски (изотип контроль). Проточная цитофлуориметрия была проведена с использованием проточного цитометра Epics Altra flow cytofluorimeter (Beckman Coulter, США) и программы FCSalyzer (<https://sourceforge.net/projects/fcsalyzer/>).

Статистический анализ

Тест на нормальность распределения проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. При нормальном распределении результаты представляли как среднее арифметическое значение \pm стандартная ошибка среднего, при распределении, отличающемся от нормального – как медиана \pm интерквартильный размах. Статистический анализ различий между сравниваемыми группами выполняли с использованием t-критерия Стьюдента (непарный t-тест), критерия Манна–Уитни, теста Данна. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism8.

Результаты

В данной работе объектом исследования были неполяризованные M0 макрофаги человека клеточной линии ТНФ-1. Была проведена инкубация макрофагов с нетрином-1 в концентрации 10 нг/мл, 50 нг/мл и 250 нг/мл в течение 24 ч и 48 ч и определение уровня мРНК нетрина-1 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Добавление нетрина-1 на 24 ч не приводило к значимому изменению уровня экспрессии гена *ntn1* (данные не представлены). Статистически значимые изменения в уровне экспрессии наблюдались только через 48 ч при добавлении нетрина-1 в концентрации 50 нг/мл (рис. 1). Следовательно, нетрин-1 способен усиливать экспрессию своего гена в ауто-/паракринной манере только при длительном воздействии (48 ч) в концентрации 50 нг/мл. В связи с этим, данные условия инкубации мы применяли в последующих экспериментах. Примечательно, что нетрин-1 в более высокой концентрации (250 нг/мл), наоборот, вызывал снижение экспрессии гена *ntn1* (рис. 1).

Нетрин-1 является лигандом для рецептора UNC5B [5]. Мы исследовали влияние нетрина-1 на уровень экспрессии UNC5B в человеческих макрофагах. По результатам проведенных экспериментов оказалось, что нетрин-1 усиливает уровень мРНК рецептора UNC5B (рис. 2), что согласуется с литературными данными для других клеточных линий моноцитов/макрофагов [7].

Мы также исследовали эффект нетрина-1 на экспрессию гена *cc119* в человеческих макрофагах.

При добавлении нетрина-1 наблюдалось подавление экспрессии гена *cc119* (рис. 3). Таким образом, мы установили, что нетрин-1 подавляет экспрессию гена хемокина *cc119* в этих клетках.

Помимо этого, представлялось важным исследовать влияние нетрина-1 на экспрессию рецептора UNC5B не только на транскрипционном уровне, но и на уровне белкового продукта (содержание поверхностного UNC5B на цитоплазматической мембране макрофагов). Методом проточной цитофлуориметрии было выяснено, что нетрин-1 увеличивает содержание своего рецептора UNC5B на поверхности макрофагов (рис. 4). Остается неисследованным влияние нетрина-1 на продукцию макрофагами белков: самого нетрина-1, а также хемокина CCL19. Это является задачей для последующих исследований.

Обсуждение

Нетрин-1 секретируется эндотелиальными, гладкомышечными клетками и макрофагами [5]. Повышение продукции нетрина-1 в этих клетках наблюдается при атерогенезе, а также в ходе трансформации макрофагов в пенистые клетки [19].

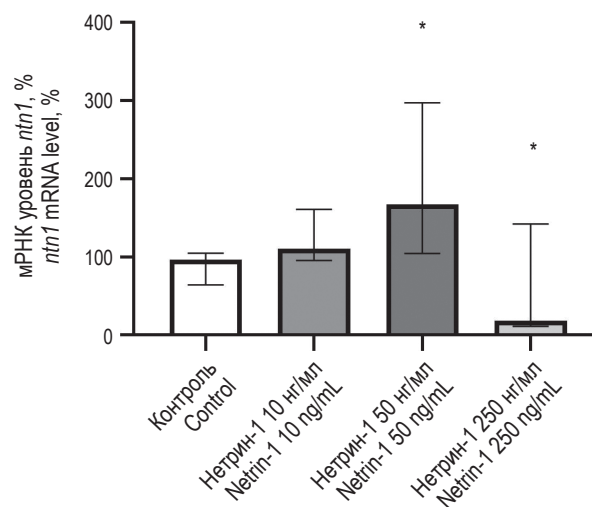


Рисунок 1. Влияние нетрина-1 на уровень мРНК гена *ntn1*

Примечание. Макрофаги ТНФ-1, дифференцированные в течение 3 суток, были инкубированы с тремя различными концентрациями нетрина-1 в течение 48 ч. Указан относительный уровень экспрессии мРНК *ntn1*, где за 100% принят уровень мРНК в нестимулированных клетках. Представлены медианные значения, планки погрешности соответствуют интерквартильному размаху, $n = 15$. Статистическая достоверность различий проверялась с использованием теста Данна, * $p < 0,05$.

Figure 1. The influence of netrin-1 on *ntn1* mRNA level
Note. The macrophages THP-1 differentiated for 3 days were incubated in three different concentrations of netrin-1 for 48 h. The diagram shows the relative *ntn1* gene expression level (100% in the unstimulated cells). The diagram shows the median \pm interquartile range, $n = 15$. Statistical significance of differences was tested using the Dunn's test, * $p < 0.05$.

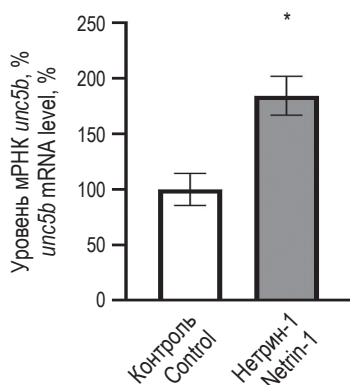


Рисунок 2. Влияние 50 нг/мл нетрина-1 на уровень мРНК *unc5b*

Примечание. Макрофаги THP-1, дифференцированные в течение 3 суток, были инкубированы с нетрином-1 в течение 48 ч. Указан относительный уровень экспрессии мРНК *unc5b*, где за 100% принят уровень мРНК в нестимулированных клетках. Представлены средние значения, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего, $n = 10$. t-критерий Стьюдента, * – $p < 0,05$.

Figure 2 The influence of netrin-1 treatment in the concentration 50 ng/mL on mRNA level *unc5b* gene

Note. The macrophages THP-1 differentiated for 3 days were incubated with netrin-1 for 48 h. The diagram shows the relative *unc5b* gene expression level (100% in the unstimulated cells). The diagram shows the mean values \pm the standard error of mean, $n = 10$. Student t-test, *, $p < 0.05$.

Концентрации нетрина-1 были выбраны согласно работам по стимуляции этим белком человеческих культур эндотелиальных клеток HUАоЕС, HUVES и HMVES [22], а также согласно данным иммуноферментного анализа определения нетрина-1 в культуральной жидкости перитонеальных макрофагов, полученных от мышей с нокаутом по гену аполипопротеин E (*apoE*) [19]. В концентрации 10 нг/мл нетрин-1 не оказывал биологических эффектов, в диапазоне 50-150 нг/мл этот белок активировал рецептор UNC5B, что через последовательную активацию протеинкиназ FAK и АКТ приводило к сдвигу клеточного равновесия в направлении выживания и пролиферации [4, 5, 22]. В концентрациях 250-1000 нг/мл нетрин-1 подавлял миграцию клеток, опосредованную тем же рецептором [11].

Следует отметить, что наши эксперименты были проведены на нестимулированных макрофагах (M0). В научной литературе описано, что продукция нетрина-1 последовательно возрастает по мере дифференцировки моноцитов в макрофаги, а затем при поляризации макрофагов в направлении M1. Так, M1-макрофаги линии THP-1 и альвеолярные крысиные макрофаги линии NR8383 значительно увеличивали уровень мРНК нетрина-1 через 3 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч и 48 ч с максимальным пиком через 12 ч по сравнению с M0-макрофагами. Секрция белка нетрина-1 в культуральную среду значительно повышалась

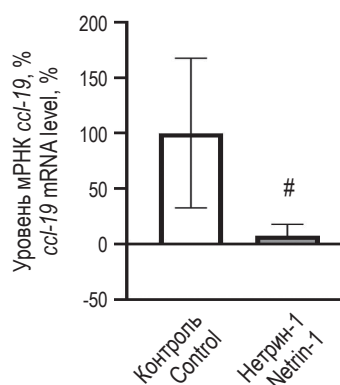


Рисунок 3. Влияние нетрина-1 в концентрации 50 нг/мл на экспрессию гена *ccl19*

Примечание. Макрофаги THP-1, дифференцированные в течение 3 суток, были инкубированы с нетрином-1 в течение 48 ч. Указан относительный уровень экспрессии мРНК *ccl19*, где за 100% принят уровень мРНК в нестимулированных клетках. Представлены результаты медианных значений, планки погрешности соответствуют интерквартильному размаху, $n = 9$. Критерий Манна-Уитни, # – $p < 0,05$.

Figure 3. The influence of netrin-1 in the concentration 50 ng/mL on mRNA level *ccl19* gene

Note. The macrophages THP-1 differentiated for 3 days were incubated with netrin-1 for 48 h. The diagram shows the relative *ccl19* gene expression level (100% in the unstimulated cells). The diagram shows the median values \pm interquartile range, $n = 9$. Mann-Whitney test, #, $p < 0.05$.

через 24 и 48 ч в сравнении с M0-макрофагами [6]. В данной работе была установлена регуляция гена *ntn1* при действии нетрина-1 аутокринным/паракринным образом. Было показано, что инкубация макрофагов THP-1 с нетрином-1 в концентрации 50 нг/мл в течение 2 суток является минимальной индуцибельной дозировкой для усиления экспрессии гена *ntn1*. Высокая концентрация нетрина-1 (250 нг/мл), наоборот, приводит к отрицательной обратной связи.

Известно, что продукция UNC5B так же, как и нетрина-1, возрастает при дифференцировке моноцитов в макрофаги. В частности, стимуляция моноцитов PMA приводила к многократному увеличению уровня мРНК и белка UNC5B у макрофагов линии THP-1, HL-60 (человеческая линия миелоидной лейкемии), перитонеальных макрофагов и макрофагов, выделенных из костного мозга мышей C57BL/6J после инъекции тиогликолатом [7]. Согласно данным анализа РНК одиночных клеток программы <https://www.proteinatlas.org/> экспрессия UNC5B в иммунных клетках перечислена далее от наибольшей к наименьшей: гранулоциты, макрофаги, Купферовские клетки, клетки Лангерганса, плацентарные макрофаги (клетки Кашенко–Гофбауэра).

Значимость повышения уровня мРНК нетрина-1 и его рецептора UNC5B в макрофагах подтверждают работы, проведенные на мышях с гиперхолестеринемией. Так, уровни мРНК *ntn1* и

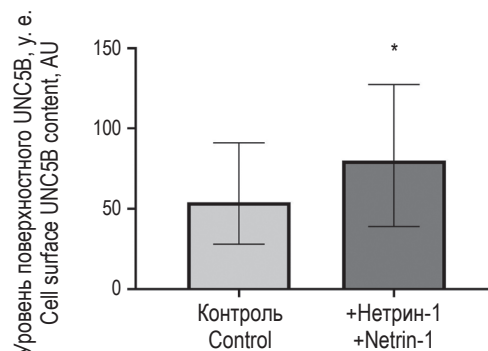
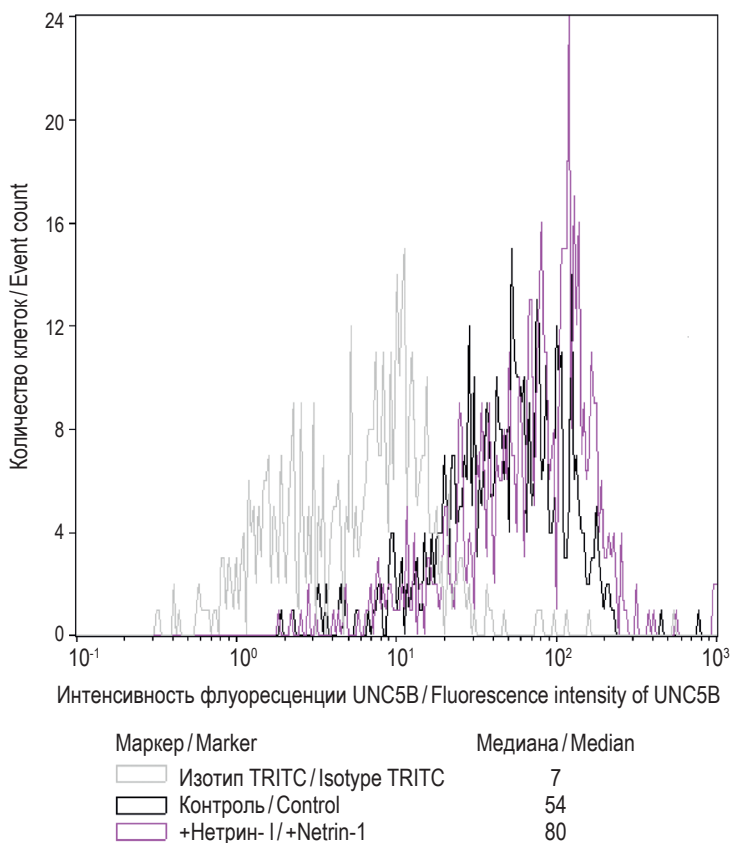


Рисунок 4. Влияние нетрина-1 в концентрации 50 нг/мл на уровень поверхностного UNC5B

Примечание. ТНР-1 макрофаги, дифференцированные в течение 3 суток, были инкубированы с нетрином-1 в течение 48 ч. Контроль – нестимулированные макрофаги. +Нетрин-1 – макрофаги, инкубированные с нетрином-1. На диаграмме представлены медианные значения интенсивности флуоресценции \pm интерквартильный размах, $n = 4$. Критерий Манна-Уитни, * – $p < 0,05$.

Figure 4. The influence of netrin-1 in the concentration 50 ng/mL on UNC5B surface level

Note. THP-1 macrophages differentiated for 3 days were incubated with netrin-1 for 48 h. Control, macrophages without netrin-1 treatment. +Netrin-1, macrophages treated by netrin-1. The diagram shows the median values \pm interquartile range, $n = 4$. Mann-Whitney test, *, $p < 0.05$.

unc5b были значительно выше в макрофагах *apoE*-дефицитных мышей, чем у мышей дикого типа, а также у мышей, находящихся на холестерол-богатой диете (Western diet), по сравнению с мышами с обычным питанием [19]. Наши опыты подтвердили, что нетрин-1 увеличивает экспрессию UNC5B на транскрипционном и трансляционном уровнях в макрофагах.

Нетрин-1 способен подавлять хемотаксис, вызванный CCL19 и другими хемокинами [18]. CCL19 и CCL21 – хемокины, синтезируемые лимфоидными органами конститутивно. Эти хемокины ответственны за эмиграцию макрофагов, нагруженных эфирами холестерина, из атеросклеротических бляшек в периферические лимфоузлы. В отличие от CCL21, который отвечает не только за хемотаксис, но также и за адгезию лейкоцитов, CCL19 влияет только на миграцию клеток [9]. Согласно эпигеномному проекту The BLUEPRINT базы данных EMBL-EBI среди гематопоэтических клеток наибольшей экспрессией CCL19 обладают провоспалительные макрофаги, средней экспрессией – дендритные клетки, низкой экспрессией – CD3⁺CD4⁺CD8⁺ тимоциты, остальные клетки не экспрессируют данный хемокин. В этой статье мы подтвердили механизм

ингибирования миграции макрофагов нетрином-1 через подавление экспрессии CCL19.

Выводы

Нетрин-1 в концентрации 50 нг/мл увеличивает экспрессию своего гена и экспрессию гена *unc5b* (на уровне мРНК и белка) в макрофагах человека. Наоборот, нетрин-1 в более высокой концентрации (250 нг/мл) подавляет экспрессию гена *ntn1* в макрофагах. Нетрин-1 (50 нг/мл) снижает экспрессию гена хемокина *ccl19* в макрофагах, что может являться одним из путей ингибирования миграции макрофагов данным фактором. На дальнейшем этапе исследований будет установлено влияние нетрина-1 на продукцию макрофагами белков нетрина-1 и CCL19.

Благодарности

Мы благодарим д.м.н., доцента Д.А. Тянянского (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия) за полезное критическое обсуждение; к.б.н., доцента Кудрявцева Игоря Владимировича (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия) за помощь в освоении методики проточной цитометрии.

Список литературы / References

1. Bennett S., Breit S.N. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *J. Leukoc. Biol.*, 1994, Vol. 56, no. 3, pp. 236-240.

2. Bobryshev Y.V., Ivanova E.A., Chistiakov D.A., Nikiforov N.G., Orekhov A.N. Macrophages and their role in atherosclerosis: pathophysiology and transcriptome analysis. *Biomed Res. Int.*, 2016, Vol. 2016, 9582430. doi: 10.1155/2016/9582430.
3. Bruikman C.S., Vreken D., Hoogeveen R.M., Bom M.J., Danad I., Pinto-Sietsma S.J., van Zonneveld A.J., Knaapen P., Hovingh G.K., Stroes E.S.G., van Gils J.M. Netrin-1 and the grade of atherosclerosis are inversely correlated in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2020, Vol. 40, no. 2, pp. 462-472.
4. Castets M., Coissieux M.M., Delloye-Bourgeois C., Bernard L., Delcros J.G., Bernet A., Laudet V., Mehlen P. Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis. *Dev. Cell*, 2009, Vol. 16, no. 4, pp. 614-620.
5. Claro V., Ferro A. Netrin-1: Focus on its role in cardiovascular physiology and atherosclerosis. *JRSM Cardiovasc. Dis.*, 2020, Vol. 9, 2048004020959574. doi: 10.1177/2048004020959574.
6. Ding S., Guo X., Zhu L., Wang J., Li T., Yu Q., Zhang X. Macrophage-derived netrin-1 contributes to endometriosis-associated pain. *Ann. Transl. Med.*, 2021, Vol. 9, no. 1, 29. doi: 10.21037/atm-20-2161.
7. Fang Y., Ma K., Huang Y.M., Dang Y., Liu Z., Xu Y., Zheng X.L., Yang X., Huo Y., Dai X. Fibronectin leucine-rich transmembrane protein 2 drives monocyte differentiation into macrophages via the UNC5B-Akt/mTOR axis. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1162004. doi: 10.3389/fimmu.2023.1162004.
8. Fiorelli S., Cosentino N., Porro B., Fabbiochi F., Niccoli G., Fracassi F., Capra N., Barbieri S., Crea F., Marenzi G., Cavalca V., Tremoli E., Eligini S. Netrin-1 in atherosclerosis: relationship between human macrophage intracellular levels and in vivo plaque morphology. *Biomedicines*, 2021, Vol. 9, no. 2, 168. doi.org/10.3390/biomedicines9020168.
9. Kang H., Li X., Xiong K., Song Z., Tian J., Wen Y., Sun A., Deng X. The entry and egress of monocytes in atherosclerosis: a biochemical and biomechanical driven process. *Cardiovasc. Ther.*, 2021, Vol. 2021, 6642927. doi: 10.1155/2021/6642927.
10. Kappler J., Franken S., Junghans U., Hoffmann R., Linke T., Müller H.W., Koch K.W. Glycosaminoglycan-binding properties and secondary structure of the C-terminus of netrin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, Vol. 271, no. 2, pp. 287-291.
11. Layne K., Ferro A., Passacuale G. Netrin-1 as a novel therapeutic target in cardiovascular disease: to activate or inhibit? *Cardiovasc. Res.*, 2015, Vol. 107, no. 4, pp. 410-419.
12. Ly N.P., Komatsuzaki K., Fraser I.P., Tseng A.A., Prodhon P., Moore K.J., Kinane T.B. Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, Vol. 102, no. 41, pp. 14729-14734.
13. Mogilenko D.A., Dizhe E.B., Shavva V.S., Lapikov I.A., Orlov S.V., Perevozchikov A.P. Role of the nuclear receptors HNF4 alpha, PPAR alpha, and LXRs in the TNF alpha-mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells. *Biochemistry*, 2009, Vol. 48, pp. 11950-11960.
14. Mogilenko D.A., Orlov S.V., Trulioff A.S., Ivanov A.V., Nagumanov V.K., Kudriavtsev I.V., Shavva V.S., Tanyanskiy D.A., Perevozchikov A.P. Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates Toll-like receptor 4 signaling in human macrophages. *FASEB J.*, 2012, Vol. 26, pp. 2019-2030.
15. Parthasarathy S., Raghavamenon A., Garelnabi M.O., Santanam N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol. Biol.*, 2010, Vol. 610, pp. 403-417.
16. Ranganathan P.V., Jayakumar C., Mohamed R., Dong Z., Ramesh G. Netrin-1 regulates the inflammatory response of neutrophils and macrophages, and suppresses ischemic acute kidney injury by inhibiting COX-2-mediated PGE2 production. *Kidney Int.*, 2013, Vol. 83, no. 6, pp. 1087-1098.
17. Shavva V.S., Bogomolova A.M., Nikitin A.A., Dizhe E.B., Tanyanskiy D.A., Efremov A.M., Oleinikova G.N., Perevozchikov A.P., Orlov S.V. Insulin-mediated downregulation of apolipoprotein A-I gene in human hepatoma cell line HepG2: the role of interaction between FOXO1 and LXRβ transcription factors. *J. Cell. Biochem.*, 2017, Vol. 118, pp. 382-396.
18. Taylor L., Brodermann M.H., McCaffary D., Iqbal A.J., Greaves D.R. Netrin-1 reduces monocyte and macrophage chemotaxis towards the complement component C5a. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 8, e0160685. doi: 10.1371/journal.pone.0160685.
19. van Gils J.M., Derby M.C., Fernandes L.R., Ramkhalawon B., Ray T.D., Rayner K.J., Parathath S., Distel E., Feig J.L., Alvarez-Leite J.I., Rayner A.J., McDonald T.O., O'Brien K.D., Stuart L.M., Fisher E.A., Lacy-Hulbert A., Moore K.J. The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 2, pp. 136-143.
20. Xuan W., Qu Q., Zheng B., Xiong S., Fan G.H. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 97, no. 1, pp. 61-69.
21. Yin Y., Sanes J.R., Miner J.H. Identification and expression of mouse netrin-4. *Mech. Dev.*, 2000, Vol. 96, no. 1, pp. 115-119.
22. Zhang K., An X., Zhu Y., Huang L., Yao X., Zeng X., Liang S., Yu J. Netrin-1 inducing antiapoptotic effect of acute myeloid leukemia cells in a concentration-dependent manner through the Unc-5 netrin receptor B-focal adhesion kinase axis. *Cancer Biol. Ther.*, 2023, Vol. 24, no. 1, 2200705. doi: 10.1080/15384047.2023.2200705.

Авторы:

Некрасова Е.В. — научный сотрудник лаборатории регуляции липидного обмена ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Орлов С.В. — к.б.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории регуляции липидного обмена ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры эмбриологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Nekrasova E.V., Researcher, Laboratory of Regulation of Lipid Metabolism, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Orlov S.V., PhD (Biology), Associate Professor, Senior Researcher, Laboratory of Regulation of Lipid Metabolism, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Embryology Biology Faculty, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 10.12.2024
Принята к печати 23.03.2025

Received 10.12.2024
Accepted 23.03.2025

ОСОБЕННОСТИ АНТИГЕННОГО ФЕНОТИПА МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Павлов О.В.¹, Корнюшина Е.А.¹, Сельков С.А.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Привычное невынашивание беременности представляет собой существенную клиническую проблему, которая затрагивает 1-5% популяции, при этом в более чем половине случаев причина преждевременной потери беременности остается неизвестной. Изменения морфофункциональных свойств моноцитов могут являться факторами, приводящим к различным осложнениям беременности, в частности к невынашиванию. Однако роль моноцитов в патогенезе привычного невынашивания недостаточно изучена. Целью исследования было определение количественных изменений в содержании и фенотипических характеристиках свободных (не связанных с тромбоцитами) моноцитов на уровне всей популяции и отдельных субпопуляций моноцитов периферической крови при привычном невынашивании беременности в сравнении с неосложненной беременностью. Исследуемые группы составили женщины в возрасте 24-42 года с диагнозом привычный выкидыш с текущей беременностью сроком 6-12 недель и женщины с неосложненной (физиологической) беременностью (7-12 недель). В общей популяции и субпопуляциях моноцитов периферической крови пациенток методами проточной цитофлуориметрии определяли содержание моноцитов и уровни экспрессии поверхностных антигенов: CD11b, CD86, CD162, HLA-DR, TREM-1. Установлено, что при привычном невынашивании беременности доля свободных моноцитов понижена (74,6%) в сравнении с беременностью, протекающей без осложнений (83,4%), и это изменение происходит во всех трех субпопуляциях моноцитов: классических, промежуточных и неклассических. При этом на уровне общей популяции моноцитов наблюдалось снижение уровня экспрессии HLA-DR и повышение уровня экспрессии CD11b, обусловленные фракцией классических моноцитов, тогда как экспрессия CD162, CD86 и TREM-1 существенно не изменялась. Субпопуляции моноцитов вносили различный вклад в изменение уровней экспрессии активационных маркеров, связанное с привычным невынашива-

Адрес для переписки:

Павлов Олег Владимирович
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.
Факс: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: ovpavlov@hotmail.com

Address for correspondence:

Oleg V. Pavlov
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine
3 Mendeleevskaya Line
St. Petersburg
199034 Russian Federation
Phone: +7 (812) 328-98-50.
Fax: +7 (812) 323-75-45.
E-mail: ovpavlov@hotmail.com

Образец цитирования:

О.В. Павлов, Е.А. Корнюшина, С.А. Сельков «Особенности антигенного фенотипа моноцитов периферической крови пациенток с привычным невынашиванием беременности» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 1021-1032.
doi: 10.15789/1563-0625-COT-3193

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

For citation:

O.V. Pavlov, E.A. Korniyushina, S.A. Selkov "Characteristics of the antigenic phenotype of monocytes in peripheral blood of patients with recurrent pregnancy loss", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 5, pp. 1021-1032.
doi: 10.15789/1563-0625-COT-3193

© Pavlov O.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-COT-3193

нием, и эти изменения не всегда проявлялись на уровне всей популяции моноцитов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что привычное невынашивание беременности сопровождается уменьшением содержания свободных моноцитов в периферической крови и изменениями антигенного фенотипа моноцитов, характеризующими ослабление провоспалительных свойств и усиление адгезионных свойств этих клеток. Эти изменения могут лежать в основе патофизиологических процессов, приводящих к преждевременному прерыванию беременности ранних сроков. Определение паттернов экспрессии активационных маркеров, характерных для конкретной акушерской патологии способствует не только выявлению патофизиологических механизмов репродуктивных нарушений, но и совершенствованию методов их диагностики и выработке патогенетически обоснованных способов терапии.

Ключевые слова: беременность, привычное невынашивание беременности, моноциты, субпопуляции моноцитов, маркеры активации, провоспалительный фенотип, адгезионный фенотип

CHARACTERISTICS OF THE ANTIGENIC PHENOTYPE OF MONOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH RECURRENT PREGNANCY LOSS

Pavlov O.V.^a, Korniyushina E.A.^a, Selkov S.A.^{a, b}

^a D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Recurrent pregnancy loss is a significant clinical problem affecting 1 to 5% of the population. The cause of premature loss of pregnancy remains unknown in more than half of the cases. Changes in the morphofunctional properties of monocytes can be factors leading to various pregnancy complications, in particular, to miscarriage. However, the role of monocytes in pathogenesis of recurrent pregnancy loss has not been sufficiently studied. The aim of the present study was to determine the quantitative changes in contents and antigenic phenotype of platelet-free (not bound to platelets) monocytes within whole cell population and individual subpopulations of peripheral blood monocytes in recurrent miscarriage compared to uncomplicated pregnancy. The study groups included 6-12-week pregnant women aged 24-42 years diagnosed with recurrent pregnancy loss, and women with physiological pregnancy (7-12 weeks). Monocyte content and expression of CD11b, CD86, CD162, HLA-DR, TREM-1 were determined by means of cytofluorimetric analysis in the total population and subpopulations of peripheral blood monocytes. We have found that the proportion of platelet-free monocytes in recurrent pregnancy loss was decreased (74.6%) compared to uncomplicated pregnancy (83.4%). All studied subpopulations of monocytes (classical, intermediate and non-classical) proved to contribute to these changes. Decrease in HLA-DR expression and increase in CD11b expression was observed in total cell population caused by a fraction of classical monocytes, while the expression of CD162, CD86 and TREM-1 did not change significantly. Subpopulations of monocytes contributed differently to the changes in expression levels of activation markers, being associated with recurrent miscarriage, and these changes were not always manifested in the total monocyte population. The results obtained suggest that recurrent pregnancy loss is accompanied by a decreased content of free monocytes in peripheral blood and changed antigenic phenotype of monocytes, reflecting a weakening of proinflammatory properties and increased adhesive properties of these cells. These changes may underlie the pathophysiological processes leading to premature termination of early pregnancy. Discerning the patterns of activation marker expression typical for particular obstetric disorders may contribute not only to detection of pathophysiological mechanisms of reproductive disorders, but also to the improvement of methods for their diagnosis, and development of pathogenetically justified methods of therapy.

Keywords: pregnancy, recurrent pregnancy loss, monocytes, monocyte subsets, activation markers, proinflammatory phenotype, adhesion phenotype

Исследование выполнено на основе темы поискового научного исследования № 123120700026-6 «Разработка лабораторных модулей иммунологического обследования пациенток с целью прогнозирования различных форм акушерской и репродуктивной патологии».

Введение

Привычное невынашивание беременности (ПНБ) представляет собой существенную клиническую проблему, которая затрагивает 1-5% популяции, при этом примерно в 80% случаев потеря беременности происходит в срок до 12-й недели беременности [1, 20]. Она может быть вызвана анатомическими, генетическими, гормональными, инфекционными факторами, а также нарушениями иммунного баланса. Несмотря на прогресс, достигнутый в изучении этого заболевания, более чем половина случаев диагностируется как идиопатический выкидыш, причина которого не установлена [5, 21]. Есть основания полагать, что значительная часть эпизодов невынашивания имеет иммунную природу. Эти предположения представляются обоснованными, особенно если принять во внимание тот факт, что при беременности иммунная система матери должна поддерживать тонкий баланс между толерантностью по отношению к плоду и созданию оптимальных условий для его развития, с одной стороны, и необходимостью поддержания гомеостаза путем защиты от потенциальных внешних и внутренних угроз, таких как инфекции и злокачественные перерождения собственных клеток. Значимость этой задачи становится особенно очевидной, если принять во внимание тот факт, что лейкоциты, циркулирующие в материнской крови, во время беременности активируются и сама беременность рассматривается как некое «провоспалительное» состояние [22, 25]. Характерной чертой являются изменения численности и активационного статуса клеток врожденного звена иммунной системы, в частности моноцитов [8, 23]. Механизм активации моноцитов при беременности остается невыясненным, однако есть основания полагать, что центральную роль в этом играет плацента. При циркуляции через плаценту моноциты могут вступать в непосредственный контакт с синцитиотрофобластом [16], а дистантная активация может осуществляться факторами, выделяемыми плацентой в кровоток: цитокинами, микровезикулами, экзосомами [8].

При осложнениях беременности (преэклампсия, внутриутробная задержка роста плода, спонтанный аборт), очевидно, происходят дальней-

шие изменения иммунной системы, в частности увеличение численности и повышение активационного статуса моноцитов [6, 7, 24].

Моноциты периферической крови подразделяют на три субпопуляции: основная субпопуляция классических моноцитов (CD14⁺⁺CD16⁻) и две минорные фракции промежуточных (CD14⁺⁺CD16⁺) и неклассических моноцитов (CD14⁺CD16⁺⁺) [26]. Субпопуляции моноцитов различаются функционально, демонстрируют разные паттерны экспрессии поверхностных антигенных маркеров, цитокинов и хемокинов, и каждая субпопуляция может выполнять свою роль при физиологических и патологических условиях [19].

Моноциты, попадающие из системного кровотока матери в децидуальную оболочку плаценты, дифференцируются в децидуальные макрофаги или дендритные клетки. Децидуальные макрофаги вносят вклад в обеспечения толерантности иммунной системы матери к антигенам плода, участвуя в таких ключевых гестационных процессах, как инвазия трофобласта и ремоделирование тканей и сосудов плаценты [17]. На основе фенотипических и функциональных характеристик сложилось представление о M1/M2-поляризации макрофагов. Макрофаги, относящиеся к M1-типу, секретируют провоспалительные цитокины TNF α и IL-12 и участвуют преимущественно в воспалительных реакциях, тогда как M2-макрофаги обладают иммуносупрессивными свойствами, обеспечивая апоптоз клеток и ремоделирование тканей [15].

В большинстве случаев ПНБ, в том числе и с неясной этиологией, патологические изменения маточно-плацентарного комплекса выявляются как тромботические явления и признаки воспаления [10]. Однако клеточно-молекулярные механизмы, лежащие в их основе, остаются невыясненными.

Выбор стратегии лечения при ПНБ зависит от выявленной причины, вызвавшей данное заболевание. Однако такие терапевтические подходы оказываются малоэффективными в отношении тех случаев, когда причина преждевременного прерывания беременности остается неустановленной. Кроме того, диагностика ПНБ затруднена у тех пациенток, в анамнезе которых нет случаев последовательных выкидышей [12]. Следовательно, существует потребность в идентификации биологических маркеров, позволяющих осуществлять раннюю диагностику заболевания, поиск новых терапевтических мишеней, что, в конечном счете, должно способствовать повы-

шению вероятности сохранения беременности и повышению рождаемости.

Ранее при исследовании антигенного фенотипа тромбоцитарно-моноцитарных комплексов мы обнаружили изменения экспрессии некоторых поверхностных маркеров моноцитов при ПНБ (неопубликованные данные). При этом ряд этих изменений возникал не под влиянием тромбоцитов, взаимодействующих с моноцитами, а были вызваны какими-то иными факторами, очевидно, формирующимися при этой репродуктивной патологии.

Целью данной работы было определение изменений в экспрессии поверхностных маркеров активации в общей популяции и отдельных субпопуляциях свободных моноцитов периферической крови, происходящих при ПНБ.

Материалы и методы

Исследуемые группы: беременные женщины с ПНБ в анамнезе и диагнозом «угроза выкидыша» в текущей беременности (срок беременности – 6-12 недель, $n = 10$) и женщины с неосложненной (физиологической) беременностью в первом триместре (срок беременности – 7-12 недель, $n = 12$). Возраст пациенток составлял от 24 до 42 лет. Согласно клиническим рекомендациям [1], привычным выкидышем считали наличие в анамнезе двух и более клинических потерь беременности в срок до 22 недель. Проведение исследования было одобрено решением Этического комитета ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (протокол № 114 от 14.12.2021).

Образцы периферической крови получали из локтевой вены посредством пункции иглой 21G в вакутейнер с антикоагулянтом (3,8% цитрата натрия). Чтобы исключить посттравматическую агрегацию тромбоцитов, первые 3-5 мл крови не использовали для анализа. Лабораторные исследования начинали не позднее, чем через 20 мин после взятия крови. К 100 мкл крови добавляли меченные флуорохромами моноклональные антитела к следующим антигенам: CD45-PerCP, CD14-AlexaFluor® 700, CD41a-APC, CD16-PE-Cy7™, CD86-FITC, HLA-DR-FITC, CD162-PE, CD11b-PE, TREM-1-PE (все антитела – BD Biosciences, США). В качестве изотипического контроля использовали неспецифические антитела, меченные соответствующими флуорохромами. Инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре. По окончании инкубации проводили лизис эритроцитов, добавляя десятикратный объем раствора BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences, США). Пробы цен-

трифугировали (300 g, 5 мин), отбирали надосадочную жидкость и ресуспендировали осадок в 200 мкл BD FACS™ Lysing Solution. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences, США). На двумерной гистограмме с координатами SSC/CD45 выделяли регион, соответствующий моноцитам, в котором анализировали 20 000 событий. Для идентификации свободных (не связанных с тромбоцитами) моноцитов выделенный регион анализировали на двумерной гистограмме с координатами CD14/CD41a. К свободным моноцитам относили события с фенотипом CD14⁺CD41a⁻. Экспрессию поверхностных антигенов определяли с помощью специфических моноклональных антител. Для идентификации субпопуляций моноцитов соответствующий регион на двумерной гистограмме SSC/CD45 проецировали на двумерную гистограмму с координатами CD14/CD16, где выделяли три субпопуляции моноцитов согласно принятой классификации: классические (CD14⁺⁺CD16⁻), промежуточные (CD14⁺⁺CD16⁺) и неклассические (CD14⁺CD16⁺⁺). В каждой из субпопуляций определяли долю свободных моноцитов (CD14⁺CD41a⁺), а также экспрессию поверхностных антигенов. Измеряемые параметры: доля (%) положительно окрашенных клеток и медианная интенсивность флуоресценции (MFI). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью прикладного пакета программы GraphPad Prism v. 8.0.1. Соответствие полученных данных нормальному распределению оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. В зависимости от результатов теста для оценки различий между группами применяли методы параметрической (t-тест) и непараметрической (тест Манна–Уитни) статистики.

Результаты

Общая популяция моноцитов

В периферической крови беременных женщин с диагнозом «ПНБ» доля свободных (не агрегированных с тромбоцитами) моноцитов составляла 74,6%, тогда как у пациенток с успешно закончившимися предыдущими беременностями этот показатель достигал 83,4% (рис. 1А). Таким образом, количество свободных моноцитов уменьшилось примерно на 9 процентных пунктов. Образование тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов осуществляется, в первую очередь, благодаря взаимодействию Р-селектина

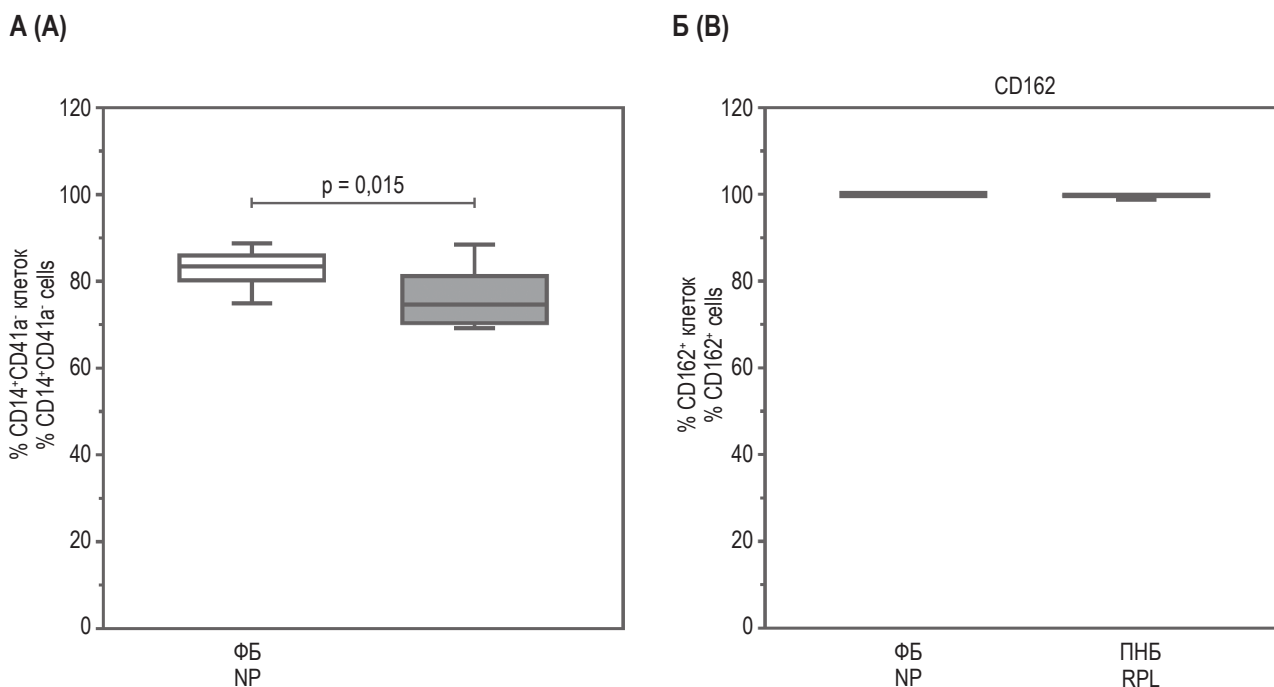


Рисунок 1. Характеристика общей популяции свободных моноцитов

Примечание. Графики демонстрируют процентное содержание свободных моноцитов относительно всех моноцитов (А) и долю свободных моноцитов, экспрессирующих поверхностный антиген CD162* (Б) в периферической крови пациенток с физиологической беременностью и ПНБ. На диаграммах показаны диапазон значений, медиана, 25-й и 75-й процентиля. ФБ – физиологическая беременность, ПНБ – привычное невынашивание беременности.

Figure 1. Characterization of total platelet-free monocyte population

Note. Graphs demonstrate the percentage of platelet-free monocytes relative to all monocytes (A) and proportion of platelet-free monocytes expressing surface antigen CD162* (B) in the peripheral blood of the patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. Plots show range, median, 25th and 75th percentile. NP, normal pregnancy; RPL, recurrent pregnancy loss.

на поверхности активированных тромбоцитов, с молекулой PSGL-1 (CD162), экспрессируемой моноцитами. Мы не обнаружили статистически значимых различий между пациентками с физиологической беременностью и привычным невынашиванием беременности: в обеих группах практически все моноциты (99%) имели положительную окраску на CD162 (рис. 1Б).

Повышение уровня экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости HLA-DR и костимуляторных молекул CD86 свидетельствует об активации моноцитов и ассоциируется с воспалительным ответом. В обеих исследуемых группах подавляющее большинство моноцитов имели положительную окраску на HLA-DR, однако в группе с ПНБ наблюдалось небольшое, но статистически значимое снижение доли HLA-DR⁺ клеток (94,4%) в сравнении с контрольной группой (98,7%) (рис. 2А). У пациенток с ПНБ также наблюдалось снижение доли CD86⁺ моноцитов с 53,1% до 37,8%, однако это снижение не достигало статистической значимости ($p = 0,309$) (рис. 2Б).

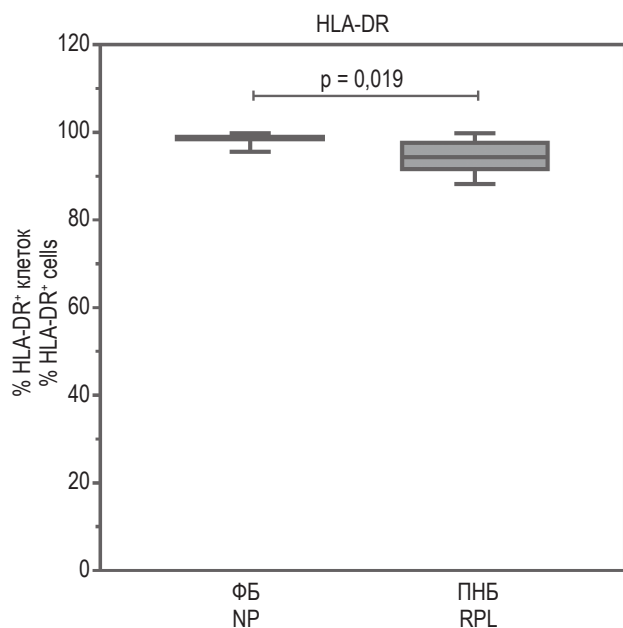
На поверхности моноцитов представлен TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1). Активация этого рецептора стимулирует продукцию цитокинов и хемокинов и вносит вклад в развитие воспалительного ответа [3]. Наше исследование показало, что экспрессия TREM-1 при ПНБ существенно не изменяется: в обеих группах пациенток доля TREM-1⁺ моноцитов составила около 80% (рис. 2В).

CD11b – активационный маркер, который опосредует адгезию моноцитов (лейкоцитов) к эндотелию сосудов [13]. Если у женщин с несложной беременностью доля клеток, экспрессирующих CD11b, составляла 58,4%, то при привычном выкидыше их количество возрастало до 80,8% (рис. 2Г).

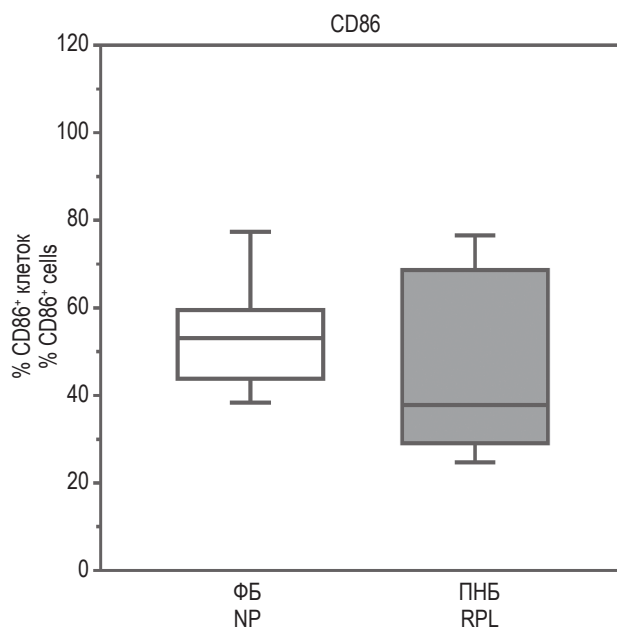
Субпопуляции моноцитов

Анализ субпопуляций показал, что в обеих исследуемых группах наибольшая доля свободных клеток содержалась во фракции промежуточных моноцитов, а наименьшее – во фракции неклассических моноцитов, и различие между этими фракциями было статистически значи-

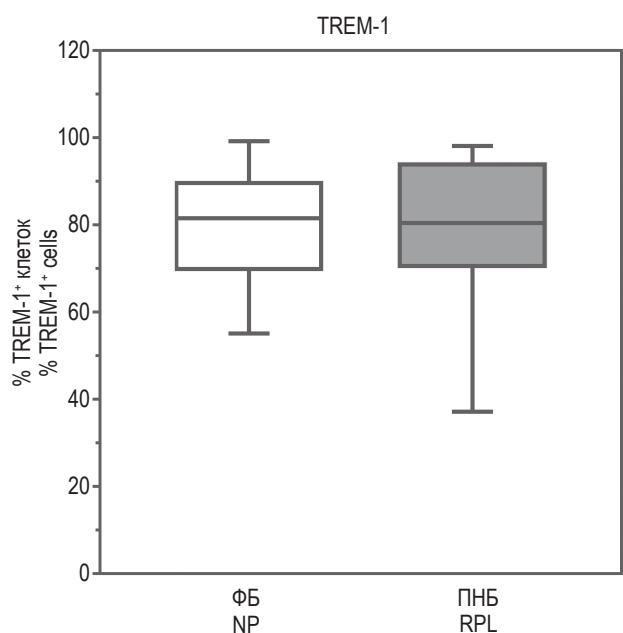
А (A)



Б (B)



В (C)



Г (D)

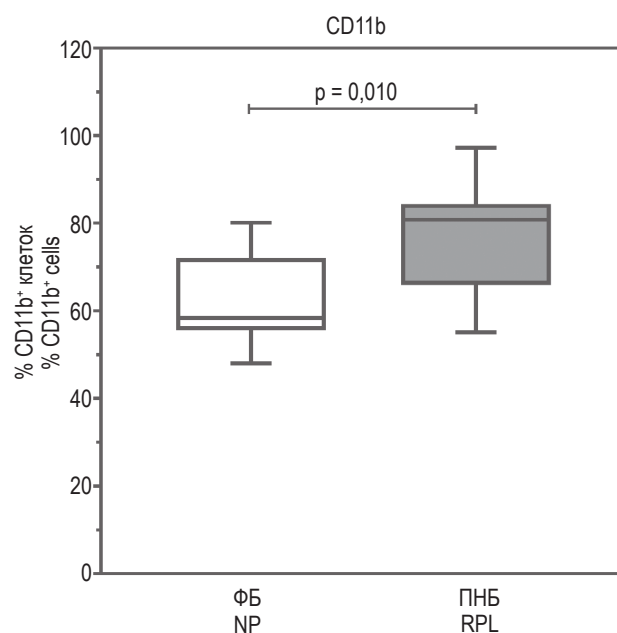


Рисунок 2. Экспрессия маркеров активации в общей популяции свободных моноцитов

Примечание. Представлены диаграммы, демонстрирующие долю клеток, экспрессирующих поверхностные антигены HLA-DR (А), CD86 (Б), TREM-1 (В) и CD11b (Г) в общей популяции свободных моноцитов периферической крови пациенток с физиологической беременностью и ПНБ. На диаграммах показаны диапазон значений, медиана, 25-й и 75-й процентиля. ФБ – физиологическая беременность, ПНБ – привычное невынашивание беременности.

Figure 2. Expression of activation markers in the total monocyte population

Note. Diagrams demonstrate the proportion of the cells expressing surface antigens HLA-DR (A), CD86 (B), TREM-1 (C) and CD11b (D) in the total population of platelet-free monocytes from the peripheral blood of the patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. Plots show range, median, 25th and 75th percentile. NP, normal pregnancy; RPL, recurrent pregnancy loss.

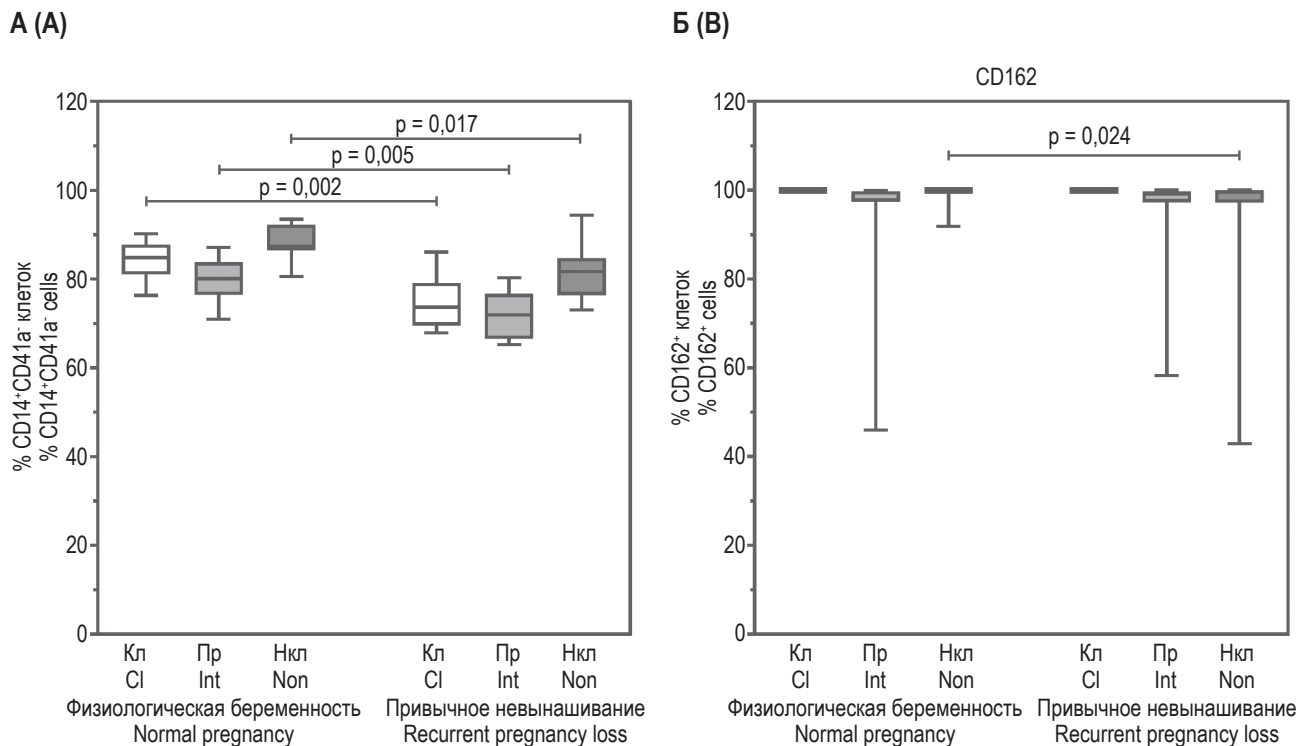


Рисунок 3. Характеристика субпопуляций свободных моноцитов

Примечание. Графики демонстрируют процентное содержание свободных моноцитов (А) и долю свободных моноцитов, экспрессирующих поверхностный антиген CD162* (Б) в субпопуляциях классических (CD14⁺CD16⁺), промежуточных (CD14⁺CD16⁺), и неклассических (CD14⁺CD16⁺) моноцитов периферической крови пациенток с физиологической беременностью и привычным невынашиванием беременности. На диаграммах показаны диапазон значений, медиана, 25-й и 75-й процентили. Кл – классические моноциты, Пр – промежуточные моноциты, Нкл – неклассические моноциты.

Figure 3. Characterization of platelet-free monocyte subsets

Note. Graphs demonstrate the percentage of platelet-free monocytes (A) and proportion of platelet-free monocytes expressing surface antigen CD62P (B) in the classical (CD14⁺CD16⁺), intermediate (CD14⁺CD16⁺), and non-classical (CD14⁺CD16⁺) monocyte subsets from the peripheral blood of patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. Plots show range, median, 25th and 75th percentile. Cl, classical monocytes; Int, intermediate monocytes; Non, non-classical monocytes.

мым ($p < 0,01$). Уменьшение количества свободных моноцитов у пациенток с ПНБ происходило во всех трех фракциях моноцитов, однако в неодинаковой пропорции: примерно на 11, 8 и 6 процентных пунктов соответственно в субпопуляциях классических, промежуточных и неклассических моноцитов (рис. 3А). При этом в группе с ПНБ наблюдалось снижение экспрессии CD162 минорной субпопуляцией неклассических моноцитов (рис. 3Б). В то же время у женщин с ПНБ во фракции классических моноцитов было отмечено снижение количества HLA-DR⁺ клеток (95,2%) по сравнению с женщинами, имеющими неосложненную беременность (99,0%) (рис. 4А). В этой же фракции наблюдалось снижение CD86⁺ моноцитов с 56,7% до 41,6%, однако оно не достигало статистической значимости (рис. 4Б). В двух остальных субпопуляциях моноцитов не было обнаружено значимых изменений в экспрессии HLA-DR и CD86 в связи с ПНБ (рис. 4А, Б).

Экспрессия TREM-1 в субпопуляциях промежуточных и неклассических моноцитов характеризовалась высокой вариабельностью, и ни в одной фракции было отмечено различий между исследуемыми группами пациенток (рис. 4В). Единственным маркером, чья экспрессия при ПНБ усиливалась, оказался CD11b: в субпопуляции классических моноцитов доля CD11b⁺ клеток возрастала с 66,7% (физиологическая беременность) до 86,8% (ПНБ) (рис. 4Г).

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у женщин с диагнозом «ПНБ» в первом триместре беременности доля свободных моноцитов в периферической крови снижается в сравнении с беременными женщинами того же срока беременности, не имеющими такого диагноза. Как мы показали ранее, это происходит из-за усиления связывания моноцитов с тромбоцитами,

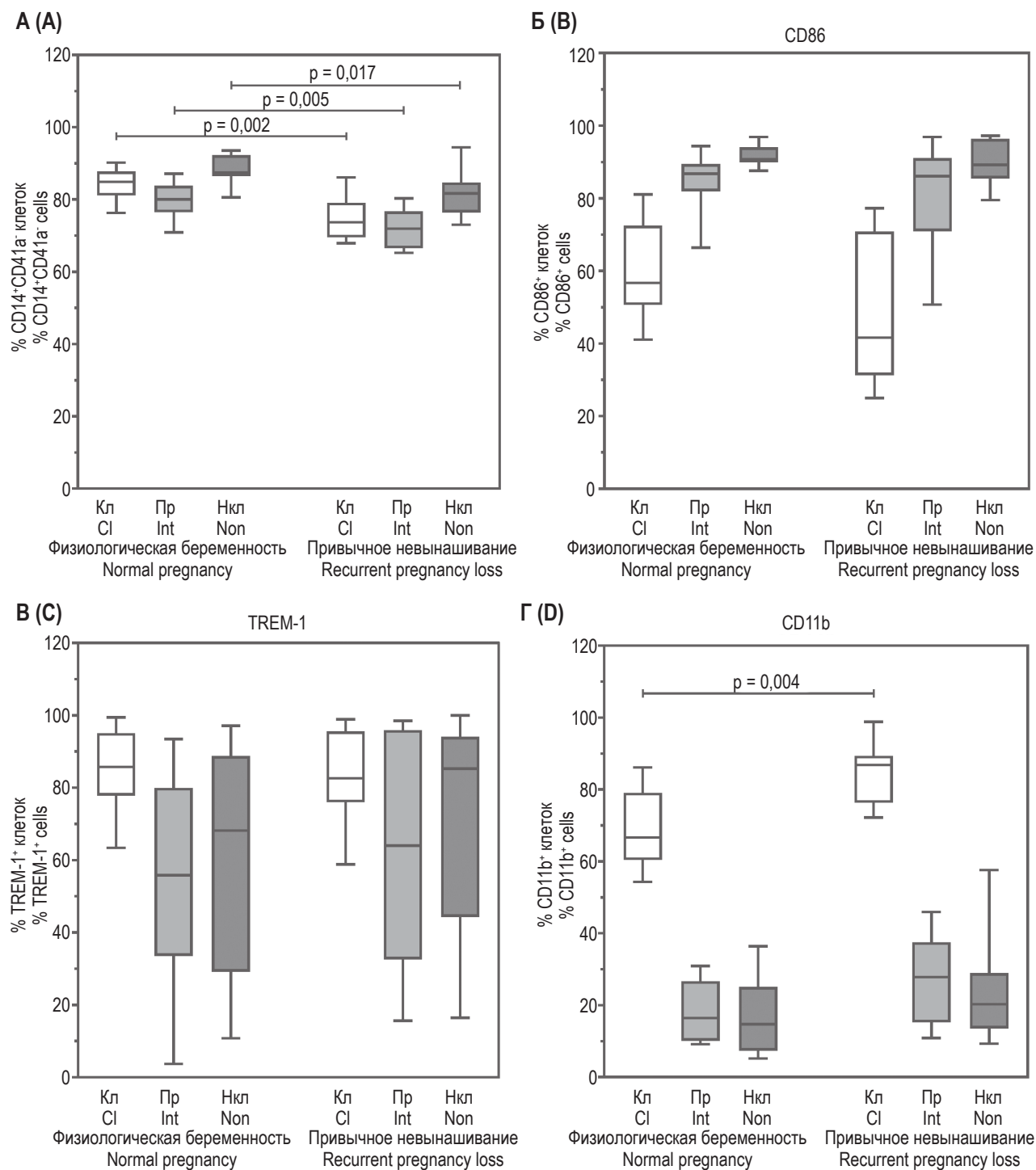


Рисунок 4. Экспрессия маркеров активации в субпопуляциях свободных моноцитов

Примечание. Представлены диаграммы, демонстрирующие долю клеток, экспрессирующих поверхностные антигены HLA-DR (А), CD86 (Б), TREM-1 (В) и CD11b (Г), в субпопуляциях классических (CD14⁺CD16⁻), промежуточных (CD14⁺CD16⁺), и неклассических (CD14⁺CD16⁺⁺) моноцитов периферической крови пациенток с физиологической беременностью и привычным невынашиванием беременности. На диаграммах показаны диапазон значений, медиана, 25-й и 75-й процентиля. Кл – классические моноциты, Пр – промежуточные моноциты, Нкл – неклассические моноциты.

Figure 4. Expression of activation markers in monocyte subsets

Note. Diagrams demonstrate the proportion of the cells expressing surface antigens HLA-DR (A), CD86 (B), TREM-1 (C) and CD11b (D) in the classical (CD14⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺CD16⁺), and non-classical (CD14⁺CD16⁺⁺) monocyte subsets from the peripheral blood of patients with normal pregnancy and preeclampsia. Plots show range, median, 25th and 75th percentile. Cl, classical monocytes; Int, intermediate monocytes; Non, non-classical monocytes.

приводящему к увеличению количества тромбоцитарно-моноцитарных комплексов. Известно, что в норме беременность характеризуется состоянием гиперкоагуляции и активацией компонентов иммунной системы [8, 9, 11, 23]. Усиление комплексообразования отражает активацию тромбоцитов, которая наряду с изменением активационного статуса моноцитов в результате их взаимодействия с активированными тромбоцитами может представлять собой дополнительный патогенетический фактор, вызывающий нарушения физиологического течения беременности. Согласно полученным нами данным, при ПНБ наибольшей способностью к взаимодействию с тромбоцитами обладают классические моноциты, а наименьшей – неклассические. Вполне вероятно, что пониженная активность неклассических моноцитов в формировании моноцитарно-тромбоцитарных агрегатов у пациенток с ПНБ обусловлена наблюдаемым небольшим, но статистически значимым снижением уровня экспрессии CD162 – основной молекулы, обеспечивающей связь с Р-селектином на поверхности тромбоцитов.

Характер экспрессии ряда поверхностных маркеров моноцитов позволяет предположить, что ПНБ не сопровождается активацией моноцитов по воспалительному типу, чего можно было бы ожидать. Наряду с тенденцией к снижению экспрессии костимуляторной молекулы CD86 как на уровне всей популяции, так и в отдельных фракциях моноцитов, у пациенток с ПНБ наблюдалось снижение уровня экспрессии маркера активации HLA-DR, обусловленное субпопуляцией классических моноцитов. Ранее при исследовании антигенного фенотипа тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов мы обнаружили, что взаимодействие моноцитов с тромбоцитами приводит к ослаблению экспрессии HLA-DR в моноцитах и у пациенток с физиологической беременностью, и у пациенток с ПНБ. При этом в первой группе эти изменения происходили во всех субпопуляциях, а во второй – только в неклассических моноцитах. Эти результаты позволили нам предположить, что, в отличие от физиологической беременности, снижение экспрессии HLA-DR при ПНБ происходит не только под влиянием тромбоцитов, а может быть обусловлено влиянием и других факторов. Вполне вероятно, что эти факторы имеют плацентарное происхождение. Результаты настоящего исследования подтвердили наше предположение, поскольку у пациенток с ПНБ снижение экспрессии HLA-DR наблюдалось в моноцитах, не связанных с тромбоцитами.

Экспрессия еще одного маркера активации TREM-1 также не претерпевала существенных изменений в связи с ПНБ как на уровне общей популяции, так и в отдельных субпопуляциях моноцитов. Примечательно, что в обеих группах пациенток содержание TREM-1⁺ клеток среди промежуточных и неклассических моноцитов варьирует в самых широких пределах: от практически полного отсутствия до почти стопроцентного наличия.

В отличие от антигенов, характеризующих провоспалительный фенотип, повышение уровня экспрессии молекулы CD11b при ПНБ, свидетельствует о повышении адгезионных свойств моноцитов, а именно, фракции классических моноцитов. CD11b входит в состав полифункционального интегрина $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1), который, в частности, опосредует такие функции моноцитов, как адгезия и фагоцитоз. Следствием усиления адгезионного потенциала моноцитов является повышение вероятности тромбообразования и их повреждающего действия в отношении эндотелия сосудов, что может представлять собой один из возможных патофизиологических механизмов преждевременного прерывания беременности.

Интересно, что повышение уровня экспрессии CD11b при невынашивании беременности происходило только в классической фракции свободных моноцитов, тогда как при изучении антигенного фенотипа тромбоцитарно-моноцитарных комплексов подобное изменение мы наблюдали во всех трех субпопуляциях моноцитов. Таким образом, можно заключить, что ПНБ сопровождается увеличением количества классических моноцитов, экспрессирующих CD11b, а взаимодействие с тромбоцитами при образовании тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов приводит к дальнейшему повышению и стимулирует экспрессию CD11b во фракциях промежуточных и неклассических моноцитов.

Активация моноцитов может вносить вклад в развитие патофизиологических эффектов, таких как воспаление, тромбоз, эндотелиальная дисфункция. Циркулирующие моноциты матери, попадая в эндометрий, дифференцируются в децидуальные макрофаги, которые, обладая иммуномодуляторными свойствами, оказывают влияние на материнский иммунный ответ в отношении плода, а также участвуют в регуляции важнейших гестационных событий: имплантация бластоцисты, инвазия трофобласта, развитие плаценты и др. [18]. Можно представить, что aberrантно активированные моноциты дают начало децидуальным макрофагам с измененными феноти-

пическими и функциональными свойствами, которые оказывают негативное воздействие на репродуктивные процессы в маточно-плацентарном комплексе, тем более что при ПНБ наблюдается повышенная инфильтрация моноцитов в децидуальную оболочку [14].

Полученные нами данные не указывают на приобретение провоспалительного фенотипа моноцитов у пациенток с ПНБ. Возможно, в развитии этой репродуктивной патологии какую-то роль играет обнаруженное нами ослабление воспалительных свойств моноцитов, что выражается в пониженной экспрессии HLA-DR, однако пока теоретических обоснований этого предположения не найдено. Обнаруженная нами повышенная экспрессия CD11b может приводить к повышенной адгезии моноцитов на поверхности эндотелиальных клеток и повреждению эндотелия сосудов.

Очевидно, что следует продолжать поиск антигенных маркеров, характер изменения экспрессии которых может быть использован в клинической практике в диагностических и прогностических целях. Перспективность этого направления подтверждается недавней публикацией, авторы которой на основе иммунофенотипирования моноцитов периферической крови, разработали модель, позволяющую с достаточно высокой вероятностью прогнозировать ПНБ и повторные неудачи имплантации [4]. Другая группа исследователей показала, что повышенная экспрессия скавенджер-рецептора CD163 в субпопуляции альтернативно активированных (неклассических) моноцитов может служить предиктором репродуктивных потерь у женщин с угрожающим выкидышем в первом триместре беременности [2].

Мы провели сравнительный анализ результатов, полученных в данном исследовании и результатов проведенной нами ранее работы по характеристике ТМК у пациенток с другой акушерской патологией – преэклампсией. Так же, как и при ПНБ, при преэклампсии мы наблюдали повышение уровня экспрессии CD11b

в общей популяции моноцитов, однако в это повышение вносили вклад не только классические, но и неклассические моноциты (неопубликованные данные). Кроме того, в отличие от ПНБ преэклампсия сопровождалась усилением экспрессии маркеров провоспалительной активации моноцитов: HLA-DR и TREM-1.

Это сравнение привело нас к выводу, который требует дальнейшей проверки. Мы предполагаем, что разные акушерские патологии характеризуются определенным паттерном экспрессии антигенных маркеров, который формируется под влиянием уникального сочетания различных факторов. Так, при ПНБ моноциты приобретают фенотип, который можно условно назвать «адгезионным», тогда как для преэклампсии характерен «воспалительно-адгезионный» фенотип. Определение таких паттернов может способствовать не только выявлению патофизиологических механизмов репродуктивных нарушений, но и совершенствованию методов их диагностики и выработке патогенетически обоснованных способов терапии.

Заключение

В периферической крови пациенток с ПНБ уменьшается доля свободных моноцитов снижается в сравнении с пациентками, имеющими неосложненную беременность. Это снижение наблюдается во всех трех субпопуляциях моноцитов. Изменения поверхностного антигенного фенотипа моноцитов при ПНБ заключаются в ослаблении провоспалительных и усилении адгезивных свойств этих клеток и происходят, главным образом, за счет фракции классических моноцитов.

Определение специфических паттернов экспрессии поверхностных антигенных маркеров тромбоцитарно-моноцитарных комплексов может иметь диагностическое значение, а также способствовать усовершенствованию подходов к лечению ПНБ.

Список литературы / References

1. Привычный выкидыш: клинические рекомендации. М., 2022. 56 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/721_1. [Recurrent miscarriage: Clinical guidelines. [Electronic resource]. Moscow, 2022. 56 p. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/view-cr/721_1.
2. Сотникова Н.Ю., Фарзалиева А.В., Борзова Н.Ю., Воронин Д.Н., Крошкина Н.В. Характеристика дифференцировки моноцитов и экспрессии CD163 у женщин с угрожающим ранним выкидышем // Иммунология, 2022. Т. 43, № 6. С. 714-721. [Sotnikova N.Yu., Farzalieva A.V., Borzova N.Yu., Voronin D.N.,

Kroshkina N.V. Characteristics of monocyte differentiation and CD163 expression in women with pointed early mission. *Immunologiya = Immunology*, 2022, Vol. 43, no. 6, pp. 714-721. (In Russ.)]

3. Arts R.J., Joosten L.A., van der Meer J.W., Netea M.G. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. *J. Leukoc. Biol.*, 2013, Vol. 93, no. 1, pp. 209-215.

4. Comins-Boo A., Valdeolivas L., Perez-Pla F., Cristobal I., Subhi-Issa N., Dominguez-Soto A., Pilar-Suarez L., Gasca-Escorial P., Calvo-Urrutia M., Fernandez-Arquero M., Herraiz M. A., Corbi, A., Sanchez-Ramon, S. Immunophenotyping of peripheral blood monocytes could help identify a baseline pro-inflammatory profile in women with recurrent reproductive failure. *J. Reprod. Immunol.*, 2022, Vol. 154, 103735. doi: 10.1016/j.jri.2022.103735.

5. Dimitriadis E., Menkhorst E., Saito S., Kutteh W.H., Brosens J.J. Recurrent pregnancy loss. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2020, Vol. 6, no. 1, 98. doi: 10.1038/s41572-020-00228-z.

6. Faas M.M., Broekema M., Moes H., van der Schaaf G., Heineman M.J., de Vos P. Altered monocyte function in experimental preeclampsia in the rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2004, Vol. 191, no. 4, pp. 1192-1198.

7. Faas M.M., van Pampus M.G., Anninga Z.A., Salomons J., Westra I.M., Donker R.B., Aarnoudse J.G., de Vos P. Plasma from preeclamptic women activates endothelial cells via monocyte activation in vitro. *J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 87, no. 1-2, pp. 28-38.

8. Faas M.M., de Vos P. Maternal monocytes in pregnancy and preeclampsia in humans and in rats. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 119, pp. 91-97.

9. Forstner D., Guettler J., Gauster M. Changes in maternal platelet physiology during gestation and their interaction with trophoblasts. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 19, e10732. doi: 10.3390/ijms221910732.

10. Grandone E., Piazza G. Thrombophilia, inflammation, and recurrent pregnancy loss: a case-based review. *Semin. Reprod. Med.*, 2021, Vol. 39, no. 1-02, pp. 62-68.

11. Hellgren M. Hemostasis during normal pregnancy and puerperium. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2003, Vol. 29, no. 2, pp. 125-130.

12. Jin M.Q., Huang B.Y., Lu D.Y., Huang J.Y., Ma L. Identification and verification of feature biomarkers associated with immune cells in recurrent pregnancy loss. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2024, Vol. 28, no. 2, pp. 556-570.

13. Ledingham M.A., Thomson A.J., Jordan F., Young A., Crawford M., Norman J.E. Cell adhesion molecule expression in the cervix and myometrium during pregnancy and parturition. *Obstet. Gynecol.*, 2001, Vol. 97, no. 2, pp. 235-242.

14. Luo Y., Zou Y. Identification of novel biomarkers and immune infiltration features of recurrent pregnancy loss by machine learning. *Sci. Rep.* 2023, Vol. 13, no. 1, 10571. doi: 10.1038/s41598-023-38046-4.

15. Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling. *J. Pathol.*, 2013, Vol. 229, no. 2, pp. 176-185.

16. Mellembakken J.R., Aukrust P., Olafsen M.K., Ueland T., Hestdal K., Videm V. Activation of leukocytes during the uteroplacental passage in preeclampsia. *Hypertension*, 2002, Vol. 39, no. 1, pp. 155-160.

17. Nagamatsu T., Schust D.J. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod. Sci.*, 2010, Vol. 17, no. 3, pp. 209-218.

18. Ning F., Liu H., Lash G.E. The role of decidual macrophages during normal and pathological pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2016, Vol. 75, no. 3, pp. 298-309.

19. Ozanska A., Szymczak D., Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand. J. Immunol.*, 2020, Vol. 92, no. 1, e12883. doi: 10.1111/sji.12883.

20. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil. Steril.*, 2012, Vol. 98, no. 5, pp. 1103-1111.

21. Rai R., Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet*, 2006, Vol. 368, no. 9535, pp. 601-611.

22. Sacks G.P., Studena K., Sargent I.L., Redman C.W. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998, Vol. 179, no. 1, pp. 80-86.

23. True H., Blanton M., Sureshchandra S., Messaoudi I. Monocytes and macrophages in pregnancy: The good, the bad, and the ugly. *Immunol. Rev.*, 2022, Vol. 308, no. 1, pp. 77-92.

24. van Nieuwenhoven A.L., Moes H., Heineman M.J., Santema J., Faas M.M. Cytokine production by monocytes, NK cells, and lymphocytes is different in preeclamptic patients as compared with normal pregnant women. *Hypertens. Pregnancy*, 2008, Vol. 27, no. 3, pp. 207-224.

25. Yuan M, Jordan F, McInnes I.B., Harnett M.M., Norman J.E. Leukocytes are primed in peripheral blood for activation during term and preterm labour. *Mol. Hum. Reprod.*, 2009, Vol. 15, no. 11, pp. 713-724.

26. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 16, pp. e74-e80.

Авторы:

Павлов О.В. — д.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Корнюшина Е.А. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела акушерства и перинатологии 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»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Pavlov O.V., PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Department of Immunology and Cell Interaction, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kornyushina E.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Obstetrics and Perinatology, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Chief Researcher, Department of Immunology and Cell Interaction, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 19.02.2025
Принята к печати 23.03.2025

Received 19.02.2025
Accepted 23.03.2025

ИЗУЧЕНИЕ АДЬЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНО-ПРОНИКАЮЩИХ КАТИОННЫХ ДЕНДРИМЕРНЫХ ПЕПТИДОВ

Шатилов А.А.¹, Шатилова А.В.¹, Асанбаева А.А.^{1,2}, Копылова А.Д.¹, Черченко Н.Г.¹, Миславский О.В.¹, Андреев С.М.¹, Смирнов В.В.^{1,2}, Хаитов М.Р.^{1,3}

¹ ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

² ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³ ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Адьюванты являются важными компонентами вакцинных препаратов, в том числе аллерговакцин, позволяющими повысить их эффективность и безопасность. В настоящее время интерес мирового научного сообщества вызывает подход, основанный на включение адьюванта в состав молекулы иммуногена. Такие ковалентные адьюванты могут быть представлены веществами разных химических классов и, в частности, пептидами. Пептиды обладают такими преимуществами перед веществами других классов, как высокая эффективность и биodeградация, при этом дендримерные катионные пептиды зачастую способны к усиленной по сравнению с линейными пептидами транспортной способности. В рамках данной работы была изучена способность усиливать индукцию IgG двух катионных дендримерных клеточно-проникающих пептидов с показанной ранее трансмембранной активностью: LTP и SA-40. Пептиды были получены твердофазным синтезом, охарактеризованы методами масс-спектрометрии и зонного капиллярного электрофореза. Для изучения адьювантной активности пептиды были конъюгированы с рекомбинантным протеином Bet v 1, представляющим собой мажорный аллерген пыльцы березы, полученным биотехнологически с использованием продуцента E. coli и очищенным хелатной хроматографией. Конъюгация проводилась по реакции Михаэля после модификации протеина малеимидной функцией. Очистка конъюгатов производилась гелевой хроматографией и диализом, эффективность конъюгации оценивалась электрофорезом в полиакриламидном геле. Конъюгаты и чистый гBet v 1 использовались для иммунизации лабораторных мышей

Адрес для переписки:

Шатилов Артем Андреевич
ФГБУ «Государственный научный центр
«Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства»
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.
Тел.: 8 (499) 311-67-78.
E-mail: aa.shatilov@nrcii.ru

Address for correspondence:

Artem A. Shatilov
National Research Center – Institute of Immunology,
Federal Medical-Biological Agency
24 Kashirskoe Highway
Moscow
115522 Russian Federation
Phone: +7 (499) 311-67-78.
E-mail: aa.shatilov@nrcii.ru

Образец цитирования:

А.А. Шатилов, А.В. Шатилова, А.А. Асанбаева, А.Д. Копылова, Н.Г. Черченко, О.В. Миславский, С.М. Андреев, В.В. Смирнов, М.Р. Хаитов «Изучение адьювантных свойств клеточно-проникающих катионных дендримерных пептидов» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 1033-1042.
doi: 10.15789/1563-0625-SAP-3157

© Шатилов А.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Shatilov, A.V. Shatilova, A.A. Asanbaeva, A.D. Kopylova, N.G. Cherchenko, O.V. Mislavskii, S.M. Andreev, V.V. Smirnov, M.R. Khaïtov “Studying adjuvant properties of cell-penetrating cationic dendrimeric peptides”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 5, pp. 1033-1042.
doi: 10.15789/1563-0625-SAP-3157

© Shatilov A.A. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-SAP-3157

BALB/c для сравнения уровней IgG к rBet v 1 после четырех инъекций без использования иных адъювантов. Сыворотки крови мышей изучались иммуноферментным анализом на уровне IgG против rBet v 1, что было целевым показателем, а также против самих конъюгатов и свободных пептидов LTP и SA-40. Установлено, что оба конъюгата ощутимо повышали уровень IgG к исходному протеину, при этом один из них, LTP-rBet v 1, также вызывал реактивность сыворотки как к самому себе, так и к свободному пептиду LTP. Повышение уровня IgG к rBet v 1 в случае LTP-rBet v 1 было приблизительно четырехкратным, в случае SA-40-rBet v 1 – трехкратным. По результатам исследования сделаны выводы о наличии у исследуемых пептидов адъювантной активности, о возможных причинах наблюдаемых явлений и о перспективности дальнейших работ в данном направлении, при этом мы считаем, что структуры пептидов LTP и SA-40 могут быть впоследствии использованы в качестве референтных при разработке новых пептидных адъювантов, и в качестве ковалентного адъюванта может быть использован сам SA-40. В свою очередь, LTP, вероятно, может иметь перспективы использования также в качестве нековалентного адъюванта.

Ключевые слова: катионные дендримерные пептиды, конъюгаты пептидов, пептидные адъюванты, аллергены, рекомбинантные белки, Bet v 1

STUDYING ADJUVANT PROPERTIES OF CELL-PENETRATING CATIONIC DENDRIMERIC PEPTIDES

Shatilov A.A.^a, Shatilova A.V.^a, Asanbaeva A.A.^{a, b}, Kopylova A.D.^a,
Cherchenko N.G.^a, Mislavskii O.V.^a, Andreev S.M.^a, Smirnov V.V.^{a, b},
Khaitov M.R.^{a, c}

^a National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

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

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

Abstract. The adjuvant agents represent important components of vaccines, including medications for specific immunotherapy, which improve their efficacy and safety. Current scope of vaccines development includes approaches based on inclusion of adjuvant into the immunogenic molecule. Such covalent adjuvants vary greatly in chemical structure, and are found among particular peptides. Peptides have distinct advantages over substances of other chemical classes, e.g., high efficiency and biodegradability, whereas dendrimeric cationic peptides are often capable of enhanced translocation ability when compared to linear peptides. In this work, the ability to enhance IgG induction was studied for two cationic dendrimeric cell-penetrating peptides with previously reported transmembrane activity, i.e., LTP and SA-40. The peptides were obtained by solid-phase synthesis and characterized by mass-spectrometry and zone capillary electrophoresis. To study adjuvant activity, the peptides were conjugated with recombinant protein Bet v 1, a major birch pollen allergen, produced as biotechnology product, using *E. coli*. Chemical conjugation was carried out with Michael reaction after maleimide functionalization of the protein. The conjugates were purified by gel chromatography and dialysis, followed by estimation of conjugation efficiency with SDS-PAGE. Conjugates and pure rBet v 1 were used to immunize BALB/c mice to compare IgG levels to rBet v 1 after 4 injections without using other adjuvants. Mouse blood sera were studied with ELISA for IgG levels against rBet v 1, being the target criterion of the study, as well as against the conjugates and free LTP and SA-40. It was found that both conjugates significantly increased the IgG level to the initial protein, while one of them, LTP-rBet v 1, also induced serum reactivity both to itself and to free LTP. The increase in IgG level to rBet v 1 was approximately four-fold in the case of LTP-rBet v 1, and three-fold with SA-40-rBet v 1. Based on the results of this study, it was concluded that both LTP and SA-40 possess adjuvant activity. We believe that LTP and SA-40 structures can be used as reference agents in development of new peptide adjuvants, and SA-40 itself may be used as a covalent adjuvant. Moreover, LTP may be considered a prospective non-covalent adjuvant.

Keywords: cationic dendrimer peptides, peptide conjugates, peptide adjuvants, allergens, recombinant proteins, Bet v 1

Исследование проведено в рамках задания ФМБА России «Адъювант-24».

Введение

Адъюванты широко используются как в экспериментальной биологии, так и в составе вакцин, позволяя усилить индукцию антител и сократить дозы антигена и курс иммунизации [6, 21]. Разработка новых адъювантов является актуальным направлением исследований в областях иммунологии и фармации, и к настоящему моменту адъювантные свойства обнаружены у веществ разных классов [3, 8, 9, 14], в том числе пептидов [12, 16, 17, 19]. К преимуществам синтетических пептидов можно отнести высокую эффективность и биосовместимость [10, 13], а также возможность их получения с применением конвенциональных технологий, как твердофазный пептидный синтез [20].

Особой значимостью поиск и испытание новых адъювантов обладает в перспективах разработки аллерговакцин для специфической иммунотерапии ввиду использования в последней антигенов, способных вызывать тяжелые нежелательные лекарственные реакции, вплоть до анафилаксии [7, 15, 18]. В настоящей работе проведена концептуальная оценка возможности применения клеточно-проникающих катионных дендримерных пептидов LTP и SA-40 [1] в качестве адъювантов для рекомбинантного протеина rBet v 1, соответствующего мажорному аллергену пыльцы березы Bet v 1 – одному из наиболее значимых аэроаллергенов центральной России [2].

Цель данной работы – получение конъюгатов рекомбинантного Bet v 1 с клеточно-проникающими дендримерными пептидами LTP и SA-40 и оценка уровня индукции конъюгатами антител у лабораторных животных в сравнении с исходным rBet v 1.

Материалы и методы

Получение пептидов

Пептидный синтез осуществлялся на синтезаторе PS3 (Protein Technologies Inc., США) с использованием Fmoc-защищенных аминокислот и смолы H-Rink-Amide-ChemMatrix (Iris Biotech, Германия). Растворитель на всех стадиях – N,N-диметилформамид (Scharlau, Испания), активация аминокислот – гексафторфосфат бензотриазолилтетраметилуруния (HBTU) (Acros Organics, Бельгия) и N-метилморфолин (Fischer Scientific, США), отщепление Fmoc-защиты – 4-метилпиперидин (Sigma-Aldrich, США). Отщепление пептидов от смолы осуществлялось в смеси концентрированной трифторуксусной кислоты (ТФУ) (Carl Roth, Германия), 1,2-этандитиола,

тиоанизола (Sigma-Aldrich, США) и воды деионизованной. Пептиды выделялись из реакционной смеси осаждением диэтиловым эфиром (ООО «Химмед», Россия). Для очистки пептидов применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием системы LC-20 Prominence с фотометрической детекцией при 226 и 280 нм (Shimadzu, Япония). Стационарная фаза – Kromasil Eternity-5-C18, 250 × 30 mm (Nouryon, Швеция). Элюция – медленный градиент от 5% до 70% ацетонитрила (ООО «Компонент-Реактив», Россия) в 0,1%-ном водном растворе ТФУ.

Физико-химическая характеристика пептидов

Идентификация пептидов производилась методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетным анализатором с использованием спектрометра Bruker Microflex LT (Bruker, Германия). Матрица – α -циано-4-гидроксикоричная кислота (Sigma-Aldrich, США).

Чистоту пептидов определяли с помощью капиллярного электрофореза (Капель 105М, ООО «Люмекс», Россия) на незаполненном кварцевом капилляре ($l_{общая}$ – 60 см, $l_{эффективная}$ – 50 см, $d_{внутренний}$ – 75 мкм) методом нормализации. Буфер – 0,1 М фосфорная кислота (Acros Organics, Бельгия), 0,05 М трис(гидроксиэтил)аминометана (Tris) (ООО «Хеликон», Россия) в деионизованной воде, ввод пробы гидродинамический, напряжение +20 кВ, детекция фотометрическая – 226 нм.

Получение белка

Рекомбинантный продуцент rBet v 1 (изоформа 1.0101, UniProt: P15494, с гистидиновым повтором на С-конце, продуцент *E. coli*) был предоставлен профессором Р. Валентой (ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России) [5]. Клетки растили в жидкой питательной среде ГРМ-1 (2,5 г / 100 мл) (Оболенск, Россия) содержащей 25 мкг/мл канамицина при температуре 37 °С до достижения оптической плотности культуры $\geq 0,060$ AU при длине волны 600 нм NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Экспрессию белка индуцировали добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) (Thermo Scientific, США) конечной концентрацией 1 мМ; в процессе наращивания биомассы рН поддерживался на уровне 7,0-8,0 добавлением 0,1 М NaOH (ООО «Химмед», Россия). После получения биомассы клетки концентрировали центрифугированием при 4000 g 20 минут, +4 °С (Beckman Coulter, США). Затем клетки подвергали ультразвуковой обработке с помощью ультразвукового гомогенизатора Sonicator Q500 (Qsonica, США) на холоде 5 минут в лизирующем буфере (300 мМ

NaCl (ООО «Химмед», Россия), 50 мМ NaH₂PO₄ (ООО «Химмед», Россия), 10 мМ имидазола (Sigma-Aldrich, США), pH = 8,0). Разрушенные клетки осаждали центрифугированием при 18000 g 20 минут, +4 °С. Надосадочную жидкость собирали и выделяли белок с помощью металлоафинной хроматографии на агарозной смоле Ni-NTA (Qiagen, Германия). Смолу уравнивали лизирующим буфером, затем переносили надосадочную жидкость на смолу и перемешивали в течение 2 часов при температуре +4 °С. Затем надосадочную жидкость удаляли, смолу промывали трехкратно лизирующим буфером, затем трижды буфером А (300 мМ NaCl, 50 мМ NaH₂PO₄, 50 мМ имидазола, pH = 8,0) и буфером В (300 мМ NaCl, 50 мМ NaH₂PO₄, 500 мМ имидазола, pH = 8,0), все фракции собирали для дальнейшего анализа. Анализ полученных фракций после очистки проводили электрофоретически в 14%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) (ООО «Хеликон», Россия) и окрашивали раствором Кумасси (Serva, Германия), затем гель отмывали. Фракции, содержащие наибольшие количества чистого белка, были объединены. Имидазол из фракций rBet v1 удаляли с помощью диализа против 0,1 М NaH₂PO₄ с pH = 7,4 с пятью сменами раствора во внешнем контуре диализера. Подлинность полученного rBet v 1 определялась иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием моноклональных антител mAb BV16 IgG1 (Biorbyt Ltd., США) в сравнении с природным Bet v 1 (Indoor Biotechnologies, США).

Модификация белка пептидами

Модификацию rBet v 1 проводили в две стадии: на первой стадии белок был функционализован N-гидроксисукцинимидным эфиром 3-(maleimido)пропионовой кислоты (Sigma-Aldrich, США), продукт был выделен гель-фильтрацией на колонке Sephadex G-10 (Pharmacia, Швеция) с помощью гелевого хроматографа BioLogic LP (Bio-Rad, США), детекция — фотометрическая при 254 нм. На второй стадии к maleimido-функционализованному белку были присоединены пептиды SA-40 и LTP (рис. 1) по реакции Михаэля в среде ДМСО (Merck, Германия) с добавлением фосфатного буфера (9/1, pH = 8,0). Финальная очистка проводилась диализом против воды, ретентат лиофилизировался. Полученные конъюгаты SA-40 — rBet v 1 и LTP — rBet v 1 анализировали с помощью электрофореза в 14% и 15% ПААГ (ООО «Хеликон», Россия) в сравнении с rBet v 1. Стандарты — лизоцим (~13 кДа) и куриный овальбумин (~42 кДа) (Sigma-Aldrich, США).

Иммунизация лабораторных животных

Растворы для иммунизации готовились посредством растворения 1 мг антигена в 12 мл

стерильного физиологического раствора (НПП «ПанЭко», Россия) в асептических условиях. В исследовании использовались самки мышей линии BALB/c весом 18-20 г, возрастом 6-8 недель, которые после получения были помещены в карантин на две недели и имели неограниченный доступ к еде и воде. Мыши были распределены по 4 группам для иммунизации: 1 — LTP — rBet v 1; 2 — SA-40 — rBet v 1; 3 — rBet v 1 (все по 9 мышей), 4 — интактные (5 мышей). Иммунизацию проводили трехкратно подкожно и однократно внутрибрюшинно в дозе 25 мкг/мышь (25 мкг в 300 мкл), с двухнедельными интервалами, интактным мышам вместо антигенов вводили 300 мкл физиологического раствора. Через 7 дней после и 4 иммунизации у мышей отбирали кровь из ретроорбитального синуса. Кровь центрифугировали 10 минут при 2000 g (Eppendorf, Германия) и +8 °С, и отбирали сыворотку. Сыворотку крови мышей хранили при +4 °С.

Оценка уровня индукции IgG

Определение индукции IgG полученными конъюгатами после полной иммунизации проводился методом иммуноферментного анализа (ИФА) на среднесорбционных планшетах (Greiner, Австрия). В лунки планшета наносили растворенные в фосфатном буфере с pH = 7,4 (НПП «ПанЭко», Россия) конъюгаты SA-40 — rBet v 1 и LTP — rBet v 1, rBet v 1, бычий сывороточный альбумин (БСА) (НПП «ПанЭко», Россия) в концентрации 10 мкг/мл (100 мкл на лунку) при +37 °С в течение 1 часа. Затем планшет пятикратно отмывали фосфатным буфером с добавлением 0,1%-ном Tween-20 (Sigma-Aldrich, США) 150 мкл на лунку. Затем незанятые участки связывания на поверхности лунок планшета блокировали 5%-ным обезжиренным сухим молоком, (Sigma-Aldrich, США) в фосфатном буфере с добавлением 0,1%-ного Tween-20, 200 мкл на лунку, при комнатной температуре в течение 1 часа и отмывали планшет, как указано выше. В лунки планшета вносили сыворотку крови мышей в разведении 1/100 в фосфатном буфере с добавлением 0,05%-ного Tween-20 и 0,1%-ного БСА (100 мкл на лунку) и инкубировали 1 час при комнатной температуре. После пятикратной отмывки вносили по 100 мкл на лунку вторичные противомышиные антитела овцы, меченные пероксидазой хрена (ООО «Сорбент», Россия). После пятикратной отмывки в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ) (BD, США) и инкубировали 30 минут. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл на лунку 0,5М H₂SO₄. Оптическую плотность (ОП) измеряли на планшетном фотометре Multiskan GO (Thermo Fisher, США) при двух длинах волн: 450 (ОП450) и 620 (ОП620)

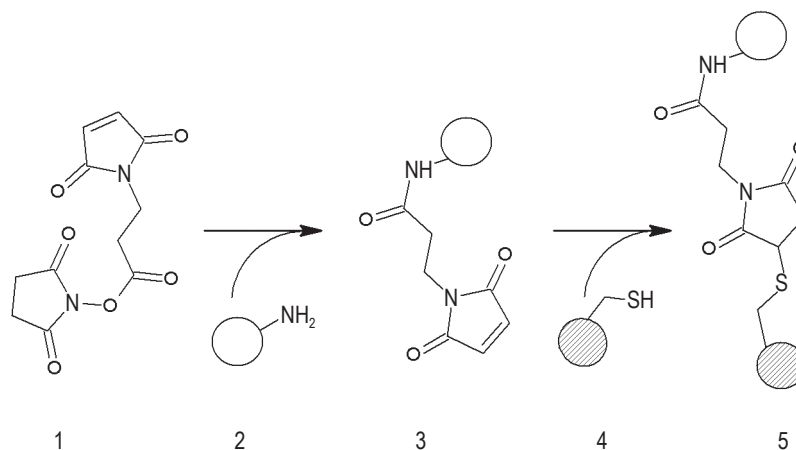


Рисунок 1. Схема модификации rBet v 1 пептидами

Примечание. 1 – N-гидроксисукцинимидный эфир 3-(maleимидо)пропионовой кислоты; 2 – rBet v 1; 3 – rBet v 1 функционализированный 3-(maleимидо)пропионовой кислотой; 4 – SA-40 или LTP; 5 – конъюгат rBet v 1 с пептидом.

Figure 1. Scheme of modification of rBet v 1 with peptides

Note. 1, 3-Maleimidopropionic acid N-hydroxysuccinimide ester; 2, rBet v 1; 3, rBet v 1 functionalized with 3-(maleimido)propionic acid; 4, SA-40 or LTP; 5, rBet v 1 conjugate with peptide.

нм. Программным обеспечением прибора высчитывалась разница между ОП450 и ОП620 (ΔОП). Число повторов – 3. Значимость различий определялась по критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Результаты

Получение пептидов

Были получены C-амиды пептидов с аминокислотными последовательностями, приведенными в таблице 1.

Масс-спектры, подтверждающие подлинность синтезированных пептидов, а также электрофореграммы, подтверждающие их чистоту, представлены на рисунке 2. Целевой пик с $m/z = 2754,4$ соответствует расчетной молекулярной массе 2756 Да для SA-40; пик с $m/z = 2337,6$ соответствует расчетной молекулярной массе 2338 Да для LTP, что говорит об успешном получении исследуемых пептидов. Чистота для полученных пептидов составила 95% для SA-40 и 100% для LTP.

Получение конъюгата rBet v 1 с пептидами

Электрофорез в ПААГ представлен на рисунке 3. Из полученных данных видно, что конъюгаты SA-40 – rBet v 1 и LTP – rBet v 1 находятся выше уровня rBet v 1, что свидетельствует об успешной функционализации белка пептидами – предположительно, от 1 до 5 остатками пептидов на молекулу rBet v 1.

Оценка уровня индукции IgG

Адьювантный эффект пептидов определялся по индукции IgG к rBet v 1. Для этого сыворотка животных анализировалась на реактивность к антигену, rBet v 1 и пептиду-адьюванту, как указано в таблице 2.

Полученные результаты приведены на рисунке 4. Из них следует, что во всех иммунизированных группах был получен специфичный антительный ответ к rBet v 1, при этом конъюгаты индуцировали IgG к rBet v 1 сильнее, чем чистый протеин. У сыворотки группы 1, иммунизированной LTP-rBet v 1, наблюдалась интен-

ТАБЛИЦА 1. СТРУКТУРЫ ПЕПТИДНЫХ ДЕНДРИМЕРОВ

TABLE 1. STRUCTURES OF DENDRIMERIC PEPTIDES

| Наименование Name | Структура Structure | Расчетная среднеизотопная молекулярная масса, Да Calculated average isotopic molecular weight, Da | Заряд Charge |
|----------------------|---|--|-----------------|
| SA-40 | (ArgArgArgLeulleLysPhelle) ₂ Lys-LysAsnThrCys | 2756 | +11 |
| LTP | ((Arg) ₂ Lys) ₂ Lys) ₂ LysAlaCys | 2338 | +16 |

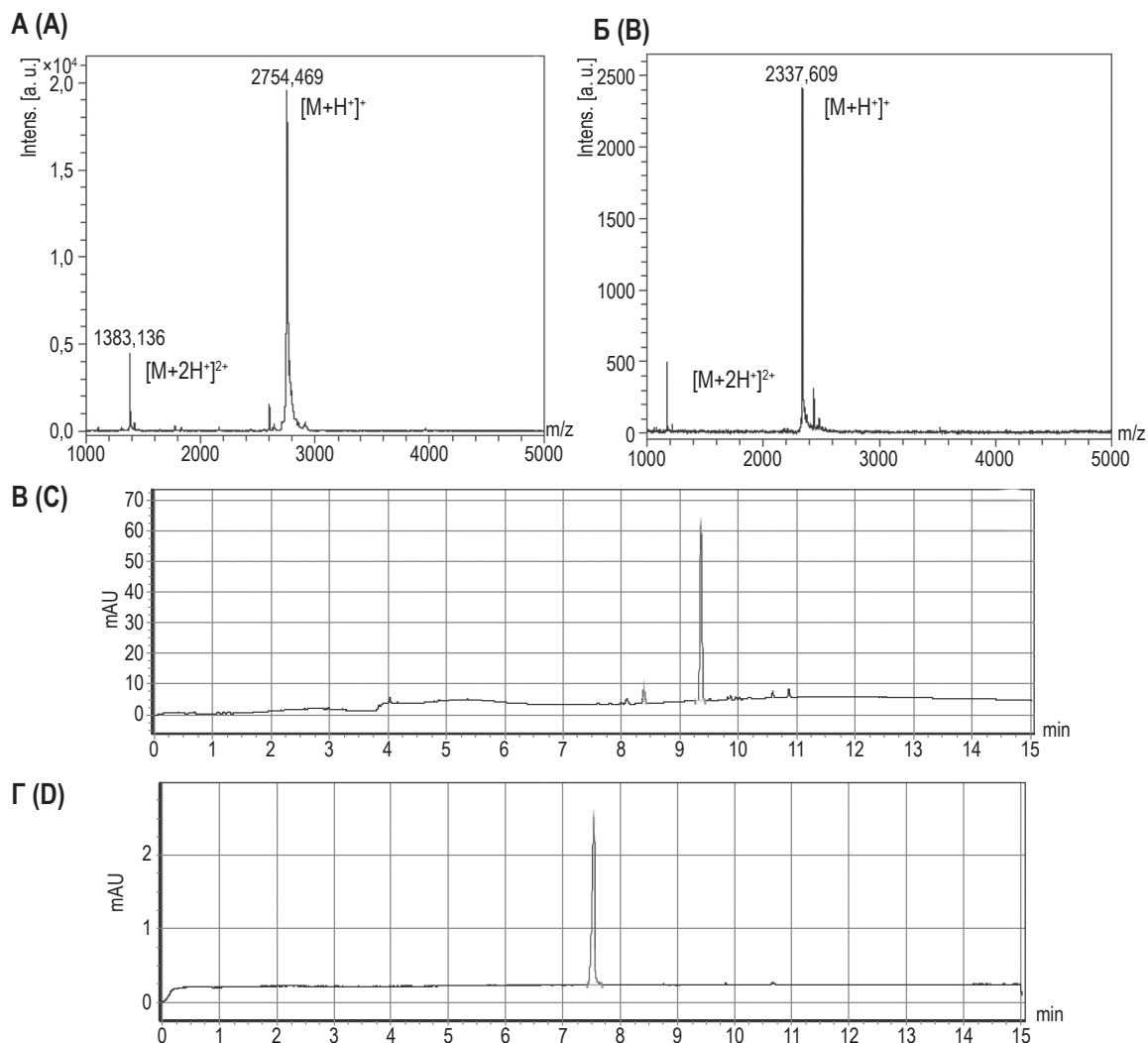


Рисунок 2. Масс-спектры пептидов SA-40 (А) и LTP (Б), и электрофореграммы SA-40 (В) и LTP (Г)

Figure 2. Mass spectrum of peptides SA-40 (A) and LTP (B) and electrophoregrams SA-40 (C) и LTP (D)

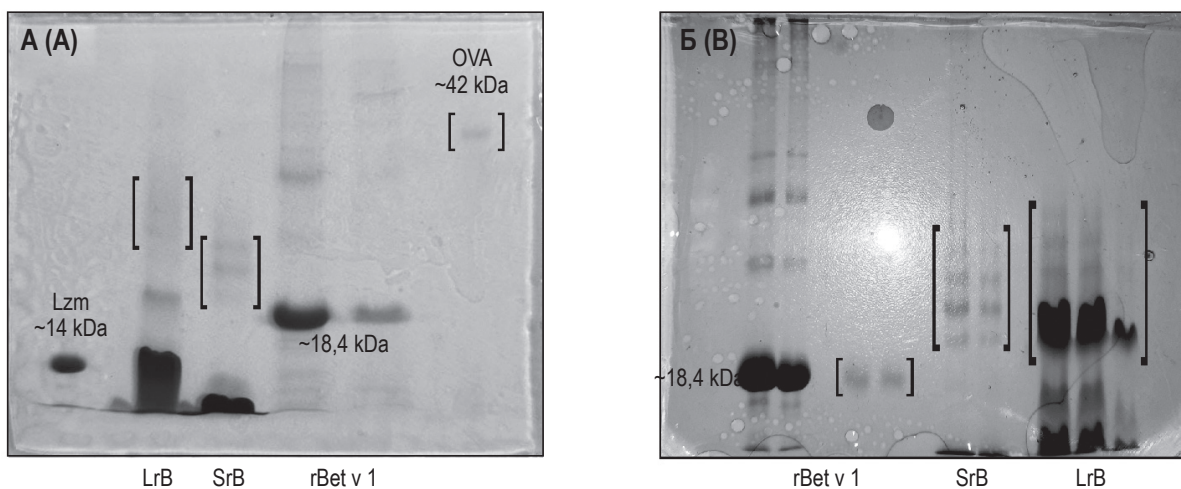


Рисунок 3. Электрофорез в ПААГ для rBet v 1 и конъюгатов в 14% геле (А) и 15% геле (Б)

Примечание. L-rB – LTP-rBet v 1, S-rB – SA-40-rBet v 1, Lzm – лизоцим, OVA – куриный овальбумин.

Figure 3. Polyacrylamide gel electrophoresis for rBet v 1 and conjugates in 14% gel (A) and 15% gel (B)

Note. L-rB, LTP-rBet v 1; S-rB, SA-40-rBet v 1; Lzm, lysozyme; OVA, chicken egg ovalbumin.

ТАБЛИЦА 2. СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

TABLE 2. SCHEME OF ELISA EXPERIMENT

| Группа Group | Антиген при иммунизации Antigen used during immunization | Аналит в иммуноферментном анализе Analyte used in ELISA |
|-----------------|---|--|
| 1 | LTP-rBet v 1 | rBet v 1 |
| | | LTP-rBet v 1 |
| | | LTP |
| | | BSA – отрицательный контроль специфичности BSA, negative control for specificity |
| 2 | SA-40-rBet v 1 | rBet v 1 |
| | | SA-40-rBet v 1 |
| | | SA-40 |
| | | BSA – отрицательный контроль специфичности BSA, negative control for specificity |
| 3 | rBet v 1 | rBet v 1 |
| | | BSA – отрицательный контроль специфичности BSA, negative control for specificity |
| 4 | Интактные Intact | Сыворотка использовалась как отрицательный контроль для других групп Serum was used as negative control for all other groups |

сивная реактивность в отношении LTP-rBet v 1 и LTP. Сыворотка группы 2, иммунизированной SA-40-rBet v 1, значительно менее активно связывала SA-40-rBet v 1 и SA-40, чем rBet v 1.

Обсуждение

Из представленных результатов ИФА следует, что конъюгаты обладали большей иммуногенностью, чем рекомбинантный протеин, однако следует обратить внимание на разницу, наблюдаемую в ответе сывороток на антигены, использованные при иммунизации. Так, на рисунке 4 заметно, что при иммунизации SA-40-rBet v 1 максимальная реактивность сыворотки формируется к rBet v 1, и значительно меньшая – к SA-40 и SA-40-rBet v 1. В свою очередь, сыворотка группы 1, иммунизированной LTP-rBet v 1, имея сравнимый со второй группой уровень неспецифического связывания БСА, наиболее активно реагирует с LTP-rBet v 1, а также интенсивно связывает чистый LTP, при этом ответ к rBet v 1 был несколько сильнее такового у второй группы, и в случае обеих групп он был выше, чем у третьей группы, иммунизированной rBet v 1, в 3-4 раза. На наш взгляд, такие различия обусловлены строением дендримерных пептидов (рис. 5) и, соответственно, их физико-химическими свойствами.

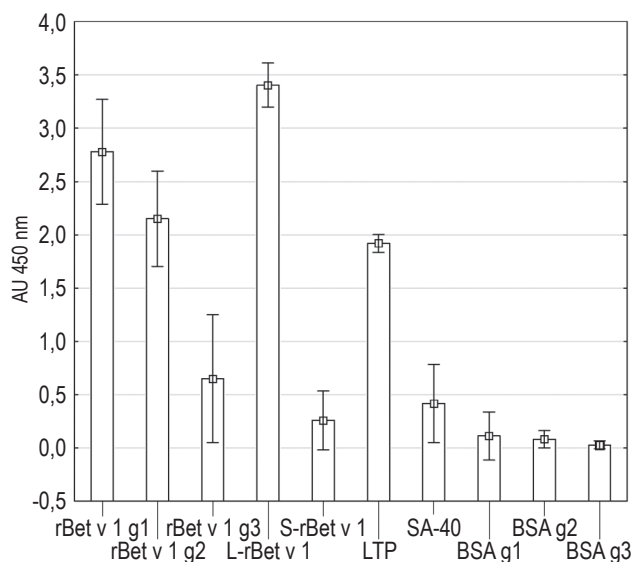


Рисунок 4. Оценка уровня индукции IgG исследуемыми веществами у иммунизированных животных

Примечание. L-rBet v 1 – LTP-rBet v 1, S-rBet v 1 – SA-40-rBet v 1. Представлены средние значения ± доверительный интервал 95%. n – 3. p ≤ 0,05.

Figure 4. Evaluation of IgG induction in mice by compounds of interest

Note. L-rBet v 1, LTP-rBet v 1; S-rBet v 1, SA-40-rBet v 1.

Means ± 95% confidence intervals are presented. n – 3. p ≤ 0.05.

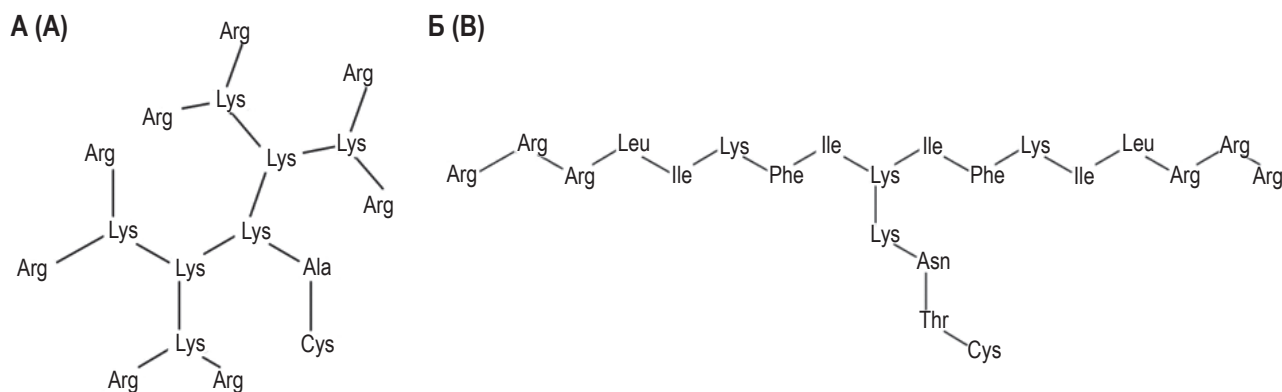


Рисунок 5. Структуры LTP (А) и SA-40 (Б)

Figure 5. Structures of LTP (A) and SA-40 (B)

LTP имеет 16 основных центров, в то время как SA-40 лишь 11, при этом у LTP они выражены 8 гуанидиновыми группами (рКа ~12,48) и 8 аминогруппами (рКа ~9,04), а у SA-40 есть лишь 6 гуанидиновых групп и 5 аминогрупп. Расчетные значения рI этих пептидов близки и составляют: ~12,96 для LTP и ~12,81 для SA-40, однако различия в зарядах более наглядны на электрофореграммах, полученных для данных пептидов в идентичных условиях. Так, при капиллярном электрофорезе время миграции LTP меньше такового у SA-40 на 1,75 мин (рис. 2В, Г), а при электрофорезе в ПААГ свободный LTP в образце LTP-гBet v 1 при миграции образует мало разделимую зону 0~13 кДа (рис. 3). С учетом повышенного напряжения при капиллярном зонном электрофорезе данный факт может говорить о склонности LTP, в отличие от SA-40, к образованию супрамолекулярных структур. Данное явление в настоящее время изучается нами, однако можно сделать предположение, что LTP может создавать в растворе мицеллы, и, в случае присутствия чистого LTP в составе LTP-гBet v 1 по причине неполного присоединения или протекания ретро-реакции Михаэля, мицеллярный слой может образовываться вокруг гBet v 1. Структура SA-40, в свою очередь, обладает меньшей полярностью, чем у LTP, в связи с чем для него мицеллообразование мы считаем менее вероятным и ненаблюдаемым в результатах данного исследования. Следует отметить, что на полученную разницу в уровнях ответа к дендримерам также может влиять неодинаковый процесс гидролиза конъюгатов в АПК, который может приводить к выраженной презентации LTP, но не SA-40. Мы считаем, что реактивность антисыворотки к LTP и его конъюгату с гBet v 1 является негативным фактором в вопросе его перспективности в качестве адьюванта в сравнении с SA-40, впрочем, это также может свидетельствовать о более выраженной способности LTP к образованию некова-

лентного комплекса с протеином и проявлению адьювантной активности в таком состоянии.

Наблюдаемую повышенную иммуногенность конъюгатов, на наш взгляд можно объяснить тремя факторами: во-первых, пептиды могут переносить протеин внутрь АПК, во-вторых, конъюгаты могут обладать значительно увеличенным поверхностным зарядом, что может провоцировать их захват АПК, в-третьих, конъюгация могла реструктурировать гBet v 1 предпочтительным для процессирования и презентации образом.

В случае первого фактора мы полагаем, что конъюгаты могут попасть в АПК благодаря трансмембранной активности пептидов, но не могут покинуть лизосому. Ввиду основности использованных пептидов, на наш взгляд, они могут действовать как дополнительные «якоря» для протеина в лизосоме. Необходимо упомянуть, что в настоящее время нами не изучена трансмембранная активность конъюгатов на клеточных культурах.

Второй возможный фактор — действие дендримеров в качестве приманки для АПК — характерен для описанных в литературе ковалентных адьювантов [4, 11] и также может быть экстраполирован на использованные дендримерные пептиды, так как их заряд составляет +16 и +11.

Третий фактор — реструктуризация гBet v 1 в ходе конъюгации — нами в рамках описываемых испытаний не изучался, однако можно предположить значительное влияние пептидов на структуру протеина ввиду относительно больших молекулярных масс пептидов (составляют около 13% от массы протеина).

Заключение

В настоящей работе были получены два клеточно-проникающих пептидных дендримера, их подлинность была подтверждена масс-спектрометрией, а чистота, по данным зонного капиллярного электрофореза, составила не менее 95%.

Нами показано, что их конъюгация с rBet v 1 повысила индукцию IgG к последнему приблизительно в три раза, что свидетельствует о наличии у обоих пептидов адъювантных свойств. Мы предполагаем, что SA-40 предпочтительнее ЛТР в качестве ковалентного адъюванта, в то время как ЛТР может проявлять более выраженную активность в качестве нековалентного адъюванта, и данные структурно-обусловленные различия следует принимать во внимание при получении новых пептидов с адъювантной активностью. В работе кратко

приведена гипотеза, объясняющая адъювантный эффект, однако в дальнейшем планируется проведение работ по прояснению механизма иммунного эффекта таких пептидов. Дальнейшие перспективы данной работы мы видим в разработке и получении стандартных пептидных адъювантов, а также в изучении сопутствующих иммунизации явлений: аллергенности и толерогенности таких комплексов и потенциального влияния присутствия пептидов в их составе на эпитопный профиль рекомбинантного протеина.

Список литературы / References

1. Кожихова К.В., Андреев С.М., Успенская Д.В., Шатилова А.В., Турецкий Е.А., Шатилов А.А., Лушникова А.А., Вишнякова Л.И., Шиловский И.П., Смирнов В.В., Кудлай Д.А., Хаитов М.Р. Суперкатионные пептидные дендримеры как векторы для доставки нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих // Иммунология, 2022. Т. 43, № 3. С. 320-332. [Kozhikhova K.V., Andreev S.M., Uspenskaya D.V., Shatilova A.V., Turetsky E.A., Shatilov A.A., Lushnikova A.A., Vishnyakova L.I., Shilovskiy I.P., Smirnov V.V., Kudlay D.A., Khaitov M.R. Supercationic peptide dendrimers as vectors for nucleic acids delivery to mammalian cells. *Immunologiya = Immunologia*, 2022, Vol. 43, no. 3, pp. 320-332. (In Russ.)]
2. Козулина И.Е., Курбачева О.М., Ильина Н.И. Аллергия сегодня. Анализ новых эпидемиологических данных // Российский аллергологический журнал, 2014. Т. 11, № 3. С. 3-10. [Kozulina I.E., Kurbacheva O.M., Ilyina N.I. Allergy today. Analysis of new epidemiological data. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2014, Vol. 11, no. 3, pp. 3-10. (In Russ.)]
3. Apostólo J.D.S., Lunardelli V.A.S., Coirada F.C., Boscardin S.B., Rosa D.S. Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 2016, 1459394. doi: 10.1155/2016/1459394.
4. Blanco-Pérez F., Papp G., Goretzki A., Möller T., Anzaghe M., Schülke S. Adjuvant allergen fusion proteins as novel tools for the treatment of type I allergies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2019, Vol. 67, no. 5, pp. 273-293.
5. Brazhnikov G., Smolnikov E., Litovkina A., Jiang T., Shatilov A., Tulaeva I., Tulaev M., Karaulov A., Poroshina A., Zhernov Yu., Focke-Tejkl M., Weber M., Akinfenwa O., Elisyutina O., Andreev S., Shilovskiy I., Shershakova N., Smirnov V., Fedenko E., Lepeshkova T.S., Beltyukov E.C., Naumova V.V., Kundi M., Khaitov M., Wiedermann U., Valenta R., Campana R. Natural human Bet v 1-specific IgG antibodies recognize non-conformational epitopes whereas IgE reacts with conformational epitopes. *Allergy*, 2023, Vol. 78, no. 12, pp. 3136-3153.
6. Del Giudice G., Rappuoli R., Didierlaurent A.M. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin. Immunol.*, 2018, Vol. 39, pp. 14-21.
7. DuToit G., Smith P., Muraro A., Fox A.T., Roberts G., Ring J., Worm M. Identifying patients at risk of anaphylaxis. *World Allergy Organ. J.*, 2024, Vol. 17, no. 6, 100904. doi: 10.1016/j.waojou.2024.100904
8. Facciola A., Visalli G., Laganà A., Di Pietr A. An overview of vaccine adjuvants: current evidence and future perspectives. *Vaccines*, 2022, Vol. 10, no. 5, 819. doi: 10.3390/vaccines10050819.
9. Gamazo C., D'Ameli C., Gastaminza G., Ferrer M., Irache J.M. (2017) Adjuvants for allergy immunotherapeutics. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2017, Vol. 13, no. 10, pp. 2416-2427.
10. Kozhikhova K.V., Shilovskiy I.P., Shatilov A.A., Timofeeva A.V., Turetskiy E.A., Vishniakova L.I., Nikolskii A.A., Barvinskaya E.D., Karthikeyan S., Smirnov V.V., Kudlay D.A., Andreev S.M., Khaitov M.R. Linear and dendrimeric antiviral peptides: Design, chemical synthesis and activity against human respiratory syncytial virus. *J. Mater. Chem. B*, 2020, Vol. 8, no. 13, pp. 2607-2617.
11. Li Q., Li Z., Deng N., Ding F., Li Y., Cai H. Built-in adjuvants for use in vaccines. *Eur. J. Med. Chem.*, 2022, Vol. 227, 113917. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113917.
12. Lingnau K., Riedl K., von Gabain A. IC31⁺ and IC30, novel types of vaccine adjuvant based on peptide delivery systems. *Expert Rev. Vaccines*, 2007, Vol. 6, no. 5, pp. 741-746.
13. Luo K., Li C., Wang G., Nie Y., He B., Wu Y., Gu Z. Peptide dendrimers as efficient and biocompatible gene delivery vectors: Synthesis and in vitro characterization. *J. Control. Release*, 2011, Vol. 155, no. 1, pp. 77-87.
14. McKee A.S., Marrack P. Old and new adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.*, 2017, Vol. 47, pp. 44-51.
15. Mueller R.S. Allergen-specific immunotherapy. *Vet. Allergy*, 2013, pp. 85-89.
16. Nagpal G., Chaudhary K., Agrawal P., Raghava G.P. Computer-aided prediction of antigen presenting cell modulators for designing peptide-based vaccine adjuvants. *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, pp. 1-15.
17. Ogawa C., Liu Y.J., Kobayashi K. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Curr. Bioact. Compd.*, 2011, Vol. 7, no. 3, pp. 180-197.
18. Ring J., Gutermuth J. 100 years of hyposensitization: history of allergen-specific immunotherapy (ASIT). *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 6, pp. 713-724.

19. Rudra J.S., Tian Y.F., Jung J.P., Collier J.H. A self-assembling peptide acting as an immune adjuvant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 2, pp. 622-627.

20. Stawikowski M., Fields G.B. Introduction to peptide synthesis. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 2012, Chapter 18, pp. 18.1.1-18.1.13.

21. Vogel F.R. Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin. Infect. Dis.*, 2000, Vol. 30, no. 3, pp. 266-270.

Авторы:

Шатилов А.А. — научный сотрудник лаборатории пептидных иммуногенов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Шатилова А.В. — научный сотрудник лаборатории пептидных иммуногенов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Асанбаева А.А. — лаборант лаборатории пептидных иммуногенов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства»; аспирант ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Копылова А.Д. — лаборант лаборатории пептидных иммуногенов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Черченко Н.Г. — к.б.н., технолог лаборатории моделирования иммунологических процессов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Миславский О.В. — к.фарм.н., старший научный сотрудник лаборатории фармакологии и фармацевтической разработки ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Андреев С.М. — к.х.н., заведующий лабораторией пептидных иммуногенов ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Смирнов В.В. — д.фарм.н., доцент, заведующий лабораторией фармакологии и фармацевтической разработки ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства»; профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Хайтов М.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства»; заведующий кафедрой иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Shatilov A.A., Researcher, Laboratory of Peptide Immunogens, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Shatilova A.V., Researcher, Laboratory of Peptide Immunogens, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Asanbaeva A.A., Laboratory Assistant, Laboratory of Peptide Immunogens, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; PhD student, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Kopylova A.D., Laboratory Assistant, Laboratory of Peptide Immunogens, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Cherchenko N.G., PhD (Biology), Technologist, Laboratory of Modeling of Immunological Processes, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Mislavskii O.V., PhD (Pharmacy), Senior Researcher, Pharmacology and Pharmaceutical Development Laboratory, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Andreev S.M., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Peptide Immunogens, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Smirnov V.V., PhD, MD (Pharmacy), Associate Professor, Head, Pharmacology and Pharmaceutical Development Laboratory, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; Professor, A. Arzamastsev, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, A. Neliubin Institute of Pharmacy, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Khaitov M.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency; Head, Department of Immunology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 14.12.2024

Отправлена на доработку 18.12.2024

Принята к печати 23.03.2025

Received 14.12.2024

Revision received 18.12.2024

Accepted 23.03.2025

ОЦЕНКА ВЗАИМООТНОШЕНИЙ МЕЖДУ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И УРОВНЯМИ IL-12

**Садех Моради, Мохаммад Рашно, Мохсен Саркарян,
Голам Аббас Кайдани, Ладан Фатахи, Мариам Сейедтабиб,
Муса Шариффат, Али Хоодадади**

Университет медицинских наук Ахваза Джундишанура, Ахваз, Иран

Резюме. Рак предстательной железы (РПЖ) является второй по значимости причиной смертности от рака среди мужчин. Вирус папилломы человека (ВПЧ) является наиболее распространенной причиной рака шейки матки, тесно связанного с анальным и вагинальным раком. Кроме того, интерлейкин-12 (IL-12) индуцирует противоопухолевый иммунитет. Целью данного исследования было изучение роли ВПЧ в РПЖ и определение его влияния на сывороточный уровень IL-12. В период с 2018 по 2022 год в Ахвазе исследователи получили 55 парафинированных образцов злокачественных поражений предстательной железы и 55 контрольных образцов тканей доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Образцы крови были взяты у 24 диагностированных онкологических пациентов для оценки уровня IL-12 до начала лечения. Кроме того, в качестве контроля участвовали 24 пациента с доброкачественной гиперплазией предстательной железы. Мы провели экстракцию ДНК фенол-хлороформным методом и исследовали наличие ДНК папилломавируса в тканях с помощью ПЦР в гнездном варианте. Кроме того, в сыворотке крови измеряли уровень IL-12 с помощью ИФА. Результаты не выявили связи между ВПЧ и РПЖ; наличие ВПЧ-инфекции не коррелировало с наличием секреции IL-12. Однако по мере прогрессирования рака уровень IL-12 у пациентов значительно снижался по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). ВПЧ может присутствовать в ткани предстательной железы, хотя это не означает, что данный вирус способствует развитию РПЖ. Наиболее значимыми штаммами, инфицирующими ткань предстательной железы, являются типы 16 и 18. По сравнению с контрольной группой и у пациентов с разной суммой баллов по шкале Глисона, уровень секреции интерлейкина-12 достоверно ниже у пациентов с РПЖ. Использование этого важнейшего цитокина позволяет принимать эффективные меры для оценки прогноза, регулирования заболевания или оказания помощи в лечении пациентов.

Ключевые слова: цитокины, опухоль, ПЦР, ИФА, шкала Глисона

Адрес для переписки:

Али Хоодадади
Университет медицинских наук Ахваза Джундишанура
Р.О. Box 61355-45, Ахваз, Иран
E-mail: akhodadadi2@gmail.com

Address for correspondence:

Ali Khodadadi
Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences
P.O. Box 61355-45, Ahvaz, Iran
E-mail: akhodadadi2@gmail.com

Образец цитирования:

С. Моради, М. Рашно, М. Саркарян, Г.А. Кайдани, Л. Фатахи, М. Сейедтабиб, М. Шариффат, А. Хоодадади «Оценка взаимоотношений между папилломавирусной инфекцией, раком предстательной железы и уровнями IL-12» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 1043-1052.
doi: 10.15789/1563-0625-ETR-3021

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

For citation:

S. Moradi, M. Rashno, M. Sarkarian, G.A. Kaydani, L. Fatahi, M. Seyedtabib, M. Shariffat, A. Khodadadi
“Evaluating the relationship between human papilloma virus infections, prostate cancer and interleukin-12 levels”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 5, pp. 1043-1052.
doi: 10.15789/1563-0625-ETR-3021

© Moradi S. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ETR-3021

EVALUATING THE RELATIONSHIP BETWEEN HUMAN PAPILLOMA VIRUS INFECTIONS, PROSTATE CANCER AND INTERLEUKIN-12 LEVELS

Sadegh Moradi, Mohammad Rashno, Mohsen Sarkarian, Gholam Abbas Kaydani, Ladan Fatahi, Maryam Seyedtabib, Moosa Shariffat, Ali Khodadadi

Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Abstract. Prostate cancer (PC); is the second leading cause of cancer mortality among men. Human papillomavirus (HPV) is the most common cause of cervical cancer, strongly associated with anal and vaginal cancers. Also, interleukin-12 (IL-12) induces antitumor immunity. This study aimed to investigate the role of HPV in PC; and determine its effects on serum IL-12. Between 2018 and 2022 in Ahvaz, researchers obtained 55 paraffin samples of malignant prostate lesions and 55 control samples of benign hyperplasia tissues from the prostate. Blood samples were collected from 24 diagnosed cancer patients to assess IL-12 levels before treatment initiation. Additionally, 24 patients with benign prostatic hyperplasia participated as controls. We performed DNA extraction using the phenol-chloroform method and examined the presence of papillomavirus DNA in tissues through Nested-PCR. Subsequently, IL-12 levels in serum were measured using ELISA. The findings did not show the relationship between HPV and PC; HPV infection was not correlated to the presence of IL-12 secretion. However, with the progression of cancer, the level of IL-12 decreased significantly in patients compared to the control group ($p < 0.05$). HPV infection can exist in prostate tissue, although this does not mean that it contributes to P.C. development. The most significant strains infecting prostate tissue are types 16 and 18. Compared to the control group and with different Gleason scores, prostate cancer patient's levels of IL-12 secretion are significantly lower. One can make effective measures to assess the prognosis, regulate the condition, or aid in treating individuals using this crucial cytokine.

Keywords: cytokine, tumor, nested-PCR, ELISA, Gleason score

The Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences financially supported this study (grant number CRC-9917).

Abbreviations: CTL, cytotoxic T lymphocyte; DC, dendritic cell; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HPV, human papilloma virus; IFN γ , interferon gamma; IL-12, interleukin-12; MDSCs, myeloid-derived suppressor cells; NK, natural killer cell; PC, prostate cancer; PCR, polymerase chain reaction; STAT, signal transducer and activator of transcription protein; T CD4 $^+$, CD4-positive T cell; T CD8 $^+$, CD8-positive T cell; Th1, T helper 1; Th2, T helper 2.

Introduction

Papilloma is a small virus of the *Papillomaviridae* family with a double-stranded, lipid-free DNA genome that can infect both the nucleus and the cytoplasm in superficial squamous cells, cause structural and morphological changes in these cells, and produce non-cancerous tumors. The virus is called "papillomavirus" (HPV) because non-cancerous tumors of the skin are known as papillomas [34].

Human papillomavirus is the most common sexually transmitted virus infection in humans. Most men and women are most likely to become infected sometime after sexual activity, and skin-to-skin contact can also transmit the virus. The virus has various types, and most of them do not cause any problems. Also, most HPV infections clear without treatment. They clear after a few months. Specific HPV types can cause a small percentage of infections to linger in the body for years and progress into cancer, but medical treatment resolves 90% of cases within two years [47].

Human papillomavirus is the cause of almost all cervical cancers. It is also strongly associated with other types of cancers, including anal, vaginal, and ovarian cancers [26, 31]. Previous studies show that prostate tissue is also susceptible to some sexually transmitted viruses, including human papillomavirus [35]. At some point in their lives, sexually active individuals can become infected [44]. The involvement of papillomavirus in the development of cervical cancer was first proposed by Zur Hausen [4]. Cervical and prostate cancers are similar in factors such as

sexual activity and the location of the infection [1]. Therefore, since reports have linked papillomavirus to cancer over the years, papillomavirus infection may be linked to prostate cancer [15, 18].

Interleukin-12 (IL-12), on the other hand, is a bridge between nonspecific primary immunity and specific immunity. In response to pathogens, monocyte cells, macrophages, dendritic cells (DCs), B lymphocytes, neutrophils, and microglia secrete IL-12, which also acts via STAT4 to stimulate the production of IFN in T and NK cells. IFN γ mediates the activation of pro-inflammatory agents and activates T-bet [9]. After identifying and linking it to Th1 commitment, researchers placed high hopes on IL-12 to become a target for immunotherapy and cancer treatment programs. *In vitro*, IL-12 induces tumor eradication, prevents metastasis, and enhances antitumor immunity [13, 30]. This cytokine performs the above functions by activating CTLs, Th1-dependent cellular response, and NK cells [46]. Treating the IL-12 gene in a cervical tumor model from human papillomavirus type 16 activates cellular immunity. It also boosts the expression of Th1 cytokines. This activation is linked to the inhibition of tumor growth [33]. Numerous studies have shown the benefits of IL-12 in controlling tumors in mouse models [7, 21, 39, 42]. In the advanced stages of many cancers, including cervical cancer, Th2 levels increase [5, 6, 10, 19, 41].

In light of the potential for cancer in other organs, such as the prostate, and the function of the human papillomavirus in some cancers, such as cervical cancer, as well as the significance of IL-12 in promoting immunity and limiting the growth of malignancies, this study analyzed the correlation between prostate cancer and the human papillomavirus. Furthermore, the Gleason grade (a grading system for prostate cancer that assesses the aggressiveness of the cancer cells) and the age of prostate cancer patients were utilized to compare their IL-12 levels with those of individuals diagnosed with benign prostatic hyperplasia. Furthermore, researchers compared the levels of this interleukin in persons with prostate cancer and papilloma infection to those with cancer but no papilloma infection.

Materials and methods

Subjects

We collected samples of malignant prostate lesions from 55 patients with prostate cancer and collected 55 control samples of prostate tissue from patients with benign hyperplasia. These samples were collected from laboratories in the Pathology of Ahvaz City between 2018 and 2022. Out of the 55 patients with malignant prostate lesions, 24 newly diagnosed cases were selected for the study. Blood samples were

taken from these patients to measure the levels of IL-12 before their treatment began. In addition, we selected 24 patients with benign prostatic hyperplasia as controls and also took blood samples from them. We cut each tissue sample into four sections with a diameter of five microns. An experienced pathologist examined the first and last sections and confirmed that they were cancerous.

Nested-PCR

We used the second and third sections to extract DNA, using the Phenol-Chloroform method. Then, used the Nested-PCR method to determine the presence of papillomavirus DNA in tissues. The HPV L1 gene was done in two stages by an outer primer called MY09/11 (450 bp) and a nested primer called GP5/6 (150 bp). In this method, 12.5 μ L of Master Mix (ampliqon taq2x, Denmark), 1 μ L of Forward and Rivers primers (10 pmol), and 9.5 μ L of sterile distilled water were mixed with 1 μ L of extracted DNA for the first and 0.5 μ L for the second steps, respectively. The first temperature cycle or outer PCR consisted of the 30 s at 95 °C, 1 min at 50 °C, 1 min at 72 °C, and 5 min at 95 °C as pre denaturation and an additional expansion step for 8 min at 72°. This stage consists of 35 cycles. The nested PCR step began with an initial denaturation at 95 °C for 5 min. It ended with 30 cycles: 30 s at 95 °C, 30 s at 50°C, 30 s at 72°C, and 8 min at 72 °C. The product of the second stage was examined using gel electrophoresis. DNA extracted from HPV_18 from HeLa cell tissue was used as a positive control.

We sent product to the Genetics Research Laboratory for sequencing, then it was subjected to BLAST to determine the type (NCBI database):

My09 primer:

5'CGTCCMARRGGAWACTGATC3';

My10 primer:

5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG3' ;

Gp5 primer:

5TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3',

Gp6 primer:

5'GAAAATAAACTGTAAATCATATTC3.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

The amounts of IL-12 in the patients' and controls' sera were measured at the same time by the same technician, using ELISA-kits (Thermo Fisher, USA). Briefly, the standard stocks were serially diluted in Reagent Diluent to generate 7 points for the standard curves. Diluted capture antibody was added to a microtiter plate. Plates were sealed and incubated overnight at room temperature, then washed with Wash Buffer. Premixed standards or samples were added to each well, and incubated for overnight at 4 °C. After incubation and washing, premixed Detection Antibody was added to each well and the plate was incubated for 2 h at room temperature. After incubation and washing, Streptavidin-HRP was added

to each well. The incubation was terminated after 20 min at room temperature. Then, Stop Solution was added to each well, and the optical density of each well was immediately determined using a microplate reader set to 450 nm. The results were expressed in pg/mL.

Statistical analysis

We used SPSS 24 software to analyze the collected data and, evaluated the normality of the research data by the Kolmogorov–Smirnov test. We also ran the Mann–Whitney U test to compare the means in the two groups and used the Kruskal–Wallis test to compare the means in several groups. Finally, we utilized the Chi-square test to compare the ratios.

Results

Evaluation of the relationship between human papillomavirus and prostate cancer incidence

The chi-square test showed that there was no significant relationship between human papillomavirus

and prostate cancer ($p > 0.05$). Also, among the 12 positive cases, the virus was type 16 in 10 cases (83.3%) and type 18 in 2 cases (16.7%) (Table 1).

Comparison of serum IL-12 between patients and control group

Serum level of IL-12 in the patients with prostate cancer and controls showed that there was a significant difference between the mean of IL-12 in the cases and control groups, and the mean of IL-12 in the control group was significantly higher ($p < 0.05$). Also, we compared the mean level of serum IL-12 in various stages (Gleason score 7 to 9) of prostate cancer. It showed a significant difference between the mean IL-12 levels in the stages ($p < 0.05$). In addition, the results of the serum IL-12 levels in positive or negative papilloma cases showed no significant difference between the mean of IL-12 in the two groups of positive and negative papilloma cases ($p < 0.05$) (Table 2, Figure 1).

TABLE 1. THE RELATIONSHIP BETWEEN HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND PROSTATE CANCER AND DETERMINE TYPES OF PAPILLOMA IN POSITIVE CASES

| Group | Number of cases reviewed | Condition (virus type) | Human papillomavirus | | | | p-value |
|----------------|--------------------------|------------------------|----------------------|---------|----------|---------|---------|
| | | | positive | | negative | | |
| | | | number | percent | number | percent | |
| Case | 55 | – | 5 | 9.09 | 50 | 91.90 | 0.761 |
| Control | 55 | – | 7 | 12.73 | 48 | 87.27 | |
| Total | 110 | – | 12 | 10.91 | 98 | 89.09 | |
| Positive cases | 12 | Type 16 papilloma | 10 | 83.3 | – | – | – |
| | | Type 18 papilloma | 2 | 16.7 | – | – | |

TABLE 2. COMPARISON OF IL-12 (CON-, PG/ML) LEVELS BASED ON GLEASON SCORE (A) PRESENCE AND ABSENCE OF PAPILLOMA VIRUS (B) IN EXPERIMENTAL AND CONTROL GROUPS

| Group | Number (percent) | Mean ± SD | Indicator | Group | Number (percent) | Mean ± SD | | |
|---------------------|------------------|---------------|---------------------|--------------------|------------------|--------------|-----------|--|
| Case | 24 (50) | 95.17±53.40 | (A) Gleason score | 7 | 8 (33.33) | 140.33±13.50 | | |
| | | | | 8 | 8 (33.33) | 115.32±37.90 | | |
| | | | | 9 | 8 (33.33) | 29.86±8.25 | | |
| | | | Kruskal–Wallis test | | | | p < 0.001 | |
| | | | (B) Papillomavirus | Papilloma positive | 4 (16.7) | 88.83±36.11 | | |
| | | | | Papilloma negative | 20 (83.3) | 96.44±56.99 | | |
| Mann–Whitney Test | | | | 0.535 | | | | |
| Control | 24 (50) | 284.97±133.56 | – | – | – | – | | |
| Mann–Whitney U test | | p < 0.001 | | – | | – | | |

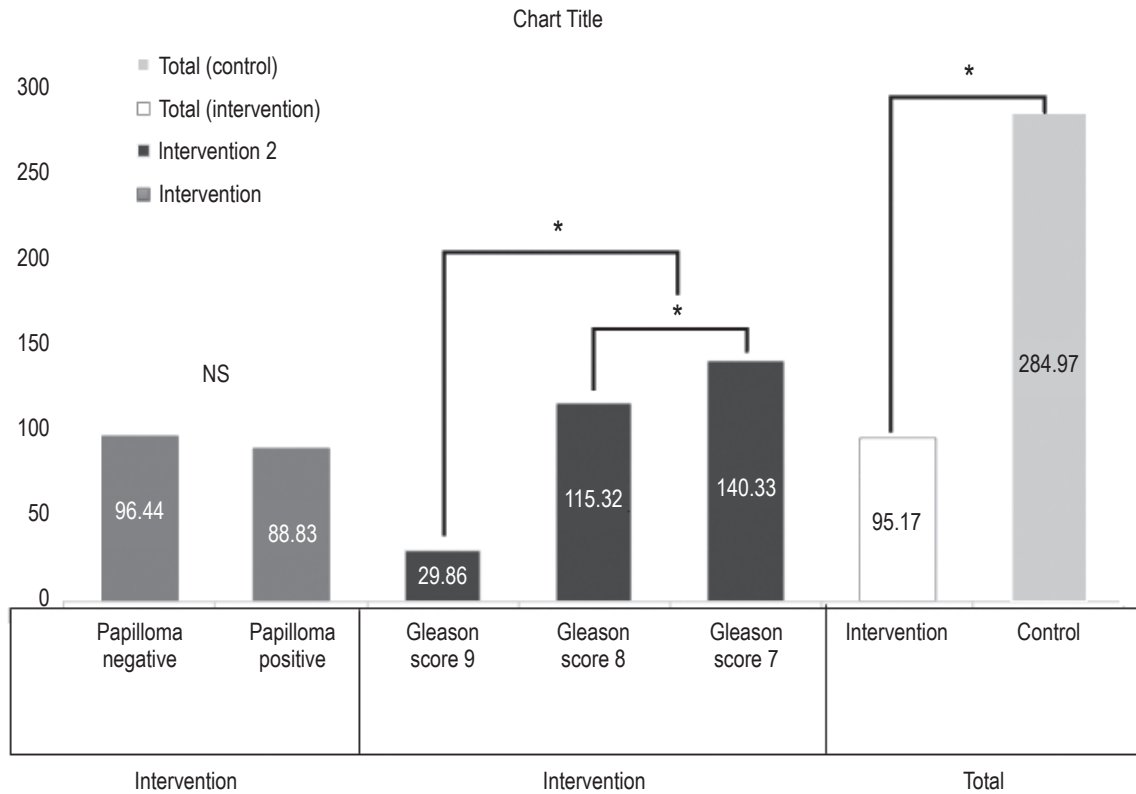


Figure 1. Comparison of IL-12 levels (Con-, pg/mL) in experimental and control groups, based on condition (positive or negative Papillomavirus) and Gleason score

Note. There was no significant difference between the levels of IL-12 in different age groups ($p > 0.05$). The difference between the levels of IL-12 in Gleason score 7, 8 and 9 was significant ($p < 0.05$) and the difference between the levels of IL-12 in the experimental and control was significant too ($p < 0.05$). NS, no significant. *, significant symbol.

TABLE 3. COMPARISON OF IL-12 LEVELS BY AGE GROUPS IN CONTROL AND EXPERIMENTAL GROUPS

| Group | Age | Age category | Number (percent) | IL-12 level (Con-, pg/mL) Mean \pm SD | Kruskal-Wallis test | Meaningful level |
|------------------|------------------|--------------------|------------------|---|---------------------|------------------|
| Case | 71.16 \pm 6.40 | Less than 70 years | 13 (54.2) | 102.62 \pm 51.52 | 1.302 | 0.522 |
| | | 70-75 years | 5 (20.8) | 105.36 \pm 63.49 | | |
| | | More than 75 years | 6 (25) | 70.52 \pm 50.88 | | |
| Control | 73.16 \pm 6.04 | Less than 70 years | 8 (33.3) | 335.36 \pm 154.89 | 3.171 | 0.205 |
| | | 70-75 years | 9 (37.5) | 256.75 \pm 119.82 | | |
| | | More than 75 years | 7 (29.2) | 263.64 \pm 127.04 | | |
| p = 0.227 | | | | | | |

Comparison of IL-12 levels by age groups in control and experimental groups

The mean age of patients in the control and experimental groups showed no significant difference between the two groups. Also, no significant difference was observed between the levels of IL-12 in different age groups ($p > 0.05$) (Table 3).

Discussion

We analyzed records for 110 patients referred to Ahvaz hospitals from 2018 to 2022 in this study. First, the case study results revealed that no significant relationship exists between the prevalence of prostate cancer and the human papillomavirus ($p > 0.05$).

The research also revealed that, out of the 12 cases where the human papillomavirus was detected, 3.83% had the virus type 16 and 7.16% had the virus type 18. Comparing the amount of IL-12 in the serum of patients with prostate cancer and healthy controls is another objective of this study. The mean levels of IL-12 in the experimental and control groups differed significantly ($p < 0.05$), with the mean levels in the control group being substantially higher than those in the experimental group. The study investigated the quantity of serum IL-12 in patients with various Gleason scores and found a significant difference between the mean levels of IL-12 in different stages of prostate cancer. The level of serum IL-12 was then evaluated to determine whether the papilloma was present in individuals with prostate cancer. The findings indicated that IL-12 averages in the two papilloma positive and negative groups did not significantly differ ($p > 0.05$). Finally, the mean age of the respondents was analyzed. It showed that there was no difference in their ages between the patients in the two groups. Additionally, neither the control nor the experimental groups' levels of IL-12 varied significantly by age group ($p > 0.05$).

According to an analysis of these findings, the human papillomavirus typically modifies tumor suppressor and proto-oncogene genes, changes cellular structure, and induces cancer. Oncogenes activate cellular proto-oncogenes. These genes produce proteins that are specifically necessary for controlling cell division and growth. Proto-oncogenes can turn into oncogenes through mutation or improper expression, and as a result of these changes, oncogenes can lead to abnormal cell division and the growth of tumors [22]. Papillomavirus infection influences cancer development in two different ways: through cell death and persistent inflammation [24]. The prostate gland, surrounding tissues, and the urinary system get contaminated as a result of this viral infection, which also causes chronic inflammation of the prostate [12, 40]. The primary role of the prostate gland is that of a reservoir for the sexual transmission of the papillomavirus through a seminal fluid. Infection of the reproductive system's mucous membrane can result in the growth of mucous cells and cancer. Consequently, HPV may cause prostate cancer [45]. However, further study is necessary before it can be said with certainty that this virus causes cancer in the prostate tissue.

The results of a study by J.S. Nahand et al. in 2020 that evaluated the potential relationship between HPV-mediated inflammation, apoptosis, and angiogenesis in prostate cancer revealed that there is no significant relationship between the human papillomavirus and the development of prostate cancer [29], which is in line with the results of the current study. However, in 2020, a study was conducted by A. Shariat et al.

in Ahvaz hospitals to investigate the relationship between human papillomavirus (HPV) and prostate cancer. The study used immunohistochemistry and PCR methods to analyze the samples. The research showed that there is a significant correlation between HPV infection and prostate cancer, which contradicts the findings of our study [37].

In addition, in different studies, it was reported a positive significant relationship between HPV infection and prostate cancer [2, 23, 25, 27], which is not in line with the results of the present study. Additionally, A.C.-H. Chen et al., in 2017 [8], S. Mahmoudi et al., in 2022 [20] and two studies with the help of the Bradford Hill criteria found no relationship between this virus and prostate cancer [32, 43], which is in line with results of current research. The use of various techniques to identify viral infection in cancer samples, as well as technical issues with these techniques, such as contamination of the PCR product and variations in HPV genome detection, as well as limitations like the small sample size, maybe the reason why this study's findings differ from those of earlier studies. Additionally, the location, patient's age, immunological health, and unique genetic variables all influence the frequency and prevalence of HPV infection in men with prostate cancer.

The study also revealed that among 12 instances where the human papillomavirus was detected, viruses' types 16 and 18 affected 3.38% and 7.16%, respectively. These results are in line with those of the study by J.S. Nahand et al., in 2020, which revealed that high-risk HPV 16 and 18 were present in the majority of positive papilloma samples taken from prostate cancer tissue [29]. Our study supports previous research, indicating that high-risk HPVs such as HPV16 and HPV18 were primarily responsible for prostate infection [3, 23].

Also, we compared the amount of IL-12 in the serum of men with prostate cancer and healthy controls and, the mean levels of IL-12 differed significantly ($p < 0.05$). The mean levels in the control group are much higher than in the experimental group. The findings show that IL-12 is a natural interleukin. Dendritic cells and macrophages produce it in response to antigenic stimulation. Because of its immune-stimulating and angiogenesis-inhibiting properties, it is thought to be a potential cancer treatment [11]. As a result, its quantity will be lower in cancer patients than in healthy individuals. In a 2017 study by J. Salimu et al., it showed clearly how exosomes from prostate cancer suppress the production of IL-12 [36]. However, these findings are not in line with those of M. Kundu et al. in 2017, A.M. Shekar et al. in 2008 and, E. Kovacs in 2001, showing that in line with the progression of the illness,

IL-12 serum levels were higher in cancer patients than in healthy people [16, 17, 38].

Our investigation results showed a significant difference in the mean level of serum IL-12 among patients with different Gleason scores in various stages of prostate cancer. Subsequently, we examined the amount of serum IL-12 to determine whether a patient had a positive or negative papilloma. The results of this study revealed that there was no statistically significant difference between the mean levels of IL-12 in the two papilloma positive and negative groups ($p > 0.05$). Analyzing the results mentioned above and evaluating IL-12 serum levels may lead to the conclusion that a decrease in IL-12 serum levels in patients with severe illness could indicate a lack of increase in inhibitory responses. Additionally, it can indicate the lack or improper operation of Th1⁺CD4 cells, other cytokine-secreting cells, or tumor microenvironment inhibitory agents such as MDSCs, which would suppress the immune response against the tumor. Additionally, the non-significance of the mean of IL-12 in the two papillomavirus positive and negative groups may suggest that the human papillomavirus has little or no impact on immune system suppression and IL-12 production.

The findings mentioned above are in line with those of S. Murakami et al. in 2004, who found that patients with metastasized gastric cancer had significantly lower levels of IL-12 [28], and A. Jebreel et al. who analyzed head and neck cancer [14]. Finally, the study compared the mean age of the respondents between the patients of the control and experimental groups. The results showed no significant difference in the mean age of patients in the two groups. Furthermore,

the levels of IL-12 did not vary significantly by age group in either the control or the experimental groups ($p > 0.05$).

Conclusion

In conclusion, we showed that HPV infection can exist in prostate tissue, although this does not mean that it contributes to PC development. The most significant strains infecting prostate tissue are types 16 and 18. In addition, compared to the control group and across different Gleason scores, levels of IL-12 secretion are significantly lower in prostate cancer patients. Furthermore, by measuring this cytokine, it is possible to obtain a favorable prognosis for prostate cancer and develop effective treatment plans in this area because IL-12 levels significantly decline as prostate cancer progresses. There is also a need for further investigations into the impact of HPV on prostate tumor tissue samples and the evaluation of additional cytokines in prostate cancer cases.

Declaration

The ethics committee of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences approved this study with the identification code IR.AJUMS.MEDICINE.REC.1399.021. The participants signed the consent form in this study. Also, all information about individuals is confidential. In addition, in this study, no costs were incurred by patients and controls.

Acknowledgments

We appreciate the contributions of the members of the Research Council of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences and the staff at Ahvaz Golestan Hospital.

References

1. Amadi, V., Nwiabu N., Anireh V. Case-based reasoning system for the diagnosis and treatment of breast, cervical and prostate cancer. *SSRG IJCSE*, 2021, Vol. 8, no. 8, pp. 13-20.
2. Atashafrooz F, Rokhbakhsh-Zamin F. Frequency and type distribution of human papilloma virus in patients with prostate cancer, Kerman, Southeast of Iran. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2022, 174, pp. 57-67.
3. Bae J.M. Human papillomavirus 16 infection as a potential risk factor for prostate cancer: an adaptive meta-analysis. *Epidemiol. Health*, 2015, Vol. 37, e2015005. doi: 10.4178/epih/e2015005.
4. Bagcchi S. Harald zur Hausen. *Lancet Infect. Dis.*, Vol. 23, no. 9, 1001. doi: 10.1016/S1473-3099(23)00511-X.
5. Bermúdez-Morales V.H., Fierros-Zarate G., García-Meléndrez C., Alcocer-Gonzalez J.M., Morales-Ortega A., Peralta-Zaragoza O., Torres-Poveda k., Burguete-García AI., Hernández-Márquez E., Madrid-Marina V. In vivo Antitumor Effect of an HPV-specific Promoter driving IL-12 Expression in an HPV 16-positive Murine Model of Cervical Cancer. *J. Cancer*, 2016, Vol. 7, no. 14, pp. 1950-1959.
6. Bermúdez-Morales V.H., Peralta-Zaragoza O., Alcocer-González J.M., Moreno J., Madrid-Marina V. IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. *Mol. Med. Rep.*, 2011, Vol. 4, no. 2, pp. 369-375.
7. Berraondo P., Prieto J., Aseguinolaza G.G. Advances in interleukin-12 gene therapy for acquired liver diseases. *Curr. Gene Ther.*, 2009, Vol. 9, no. 2, pp. 62-71.
8. Chen A.C.-H., Waterboer T., Keleher A., Morrison B., Jindal S., McMillan D., Nicol D., Gardiner R.A., McMillan N.A.J., Antonsson A. Human papillomavirus in benign prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma patients. *Pathol. Oncol. Res.*, 2011, Vol. 17, no. 3, pp. 613-617.
9. Croxford A.L., Kulig P., Beche B. IL-12-and IL-23 in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2014, Vol. 25, no. 4, pp. 415-421.

10. Feng Q., Wei H., Morihara J., Stern J., Yu M., Kiviat N., Hellstrom I., Hellstrom K.E. Th2 type inflammation promotes the gradual progression of HPV-infected cervical cells to cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 2012, Vol. 127, no. 2, pp. 412-419.
11. Guenova E., Volz T., Sauer K., Kaesler S., Müller M.R., Wölbing F., Chen K., Schwärzler C., Brossart P., Röcken M., Biedermann T. IL-4-mediated fine tuning of IL-12p70 production by human DC. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 11, pp. 3138-3149.
12. Guma S., Maglantay R., Lau R., Wieczorek R., Melamed J., Deng F.M., Zhou M., Makarov D., Lee P., Pincus M.R., Pei Z.H. Papillary urothelial carcinoma with squamous differentiation in association with human papilloma virus: case report and literature review. *Am. J. Clin. Exp. Urol.*, 2022, Vol. 174, pp. 57-67.
13. Habiba U.E., Rafiq M., Khawar M.B., Nazir B., Haider G., Nazir N. The multifaceted role of IL-12 in cancer. *Adv. Cancer Biol.-Met.*, 2022, Vol. 5, 100053. doi: 10.1016/j.adcanc.2022.100053.
14. Jebreel A., Mistry D., Loke D., Dunn G., Hough V., Oliver K., Stafford N., Greenman J. Investigation of interleukin 10, 12 and 18 levels in patients with head and neck cancer. *J. Laryngol. Otol.*, 2007, Vol. 121, no. 3, pp. 246-252.
15. Khatami A., Sadri Nahand J., Kiani S.J., Khoshmirsafa M., Moghoofei M., Khanaliha K., Tavakoli A., Emtiazi N., Bokharaei-Salim F. Human papilloma virus (HPV) and prostate cancer (PCa): The potential role of HPV gene expression and selected cellular MiRNAs in PCA development. *Microb. Pathog.*, 2022, Vol. 166, 105503. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105503.
16. Kovacs E. The serum levels of IL-12 and IL-16 in cancer patients. Relation to the tumour stage and previous therapy. *Biomed. Pharmacother.*, 2001, Vol. 55, no. 2, pp. 111-116.
17. Kundu M., Roy A., Pahan K. Selective neutralization of IL-12 p40 monomer induces death in prostate cancer cells via IL-12-IFN- γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, Vol. 114, no. 43, pp. 11482-11487.
18. Lawson J.S., Glenn W.K. Evidence for a causal role by human papillomaviruses in prostate cancer – a systematic review. *Infect. Agent. Cancer*, 2020, Vol. 15, 41. doi: 10.1186/s13027-020-00305-8.
19. Ma W., Wang K., Du J., Luan J., Lou G. Multi-dose parecoxib provides an immunoprotective effect by balancing T helper 1 (Th1), Th2, Th17 and regulatory T cytokines following laparoscopy in patients with cervical cancer. *Mol. Med. Rep.*, 2015, Vol. 11, no. 4, pp. 2999-3008.
20. Mahmoudia S., Jafari-Salesb A., Nasiric R., Baghi H.B. Prostate cancer and human papillomavirus infection: a recent literature review. *Rev. Res. Med. Microbiol.*, 2022, Vol. 33, pp. 100-108.
21. Mahvi D.M., Henry M.B., Albertini M R., Weber S., Meredith K., Schalch H., Rakhmilevich A., Hank J., Sondel P. Intratumoral injection of IL-12 plasmid DNA – results of a phase I/IB clinical trial. *Cancer Gene Ther.*, 2007, Vol. 14, no. 8, pp. 717-723.
22. Marcuccilli F., Farchi F., Mirandola W., Ciccozzi M., Paba P., Bonanno E., Perno C.F., Ciotti M. Performance evaluation of Anyplex™II HPV28 detection kit in a routine diagnostic setting: comparison with the HPV Sign® Genotyping Test. *J. Virol. Methods*, 2015, Vol. 217, pp. 8-13.
23. Medel-Flores O., Valenzuela-Rodríguez V.A., Ocádiz-Delgado R., Castro-Muñoz L.J., Hernández-Leyva S., Lara-Hernández G., Silva-Escobedo J.G., Vidal P.G., Sánchez-Monroy V. Association between HPV infection and prostate cancer in a Mexican population. *Genet. Mol. Biol.*, 2018, Vol. 41, no. 4, pp. 781-789.
24. Mesri E.A., Feitelson M.A., Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe*, 2014, Vol. 15, no. 3, pp. 266-282.
25. Michopoulou V., Derdas S.P., Symvoulakis E., Mourmouras N., Nomikos A., Delakas D., Sourvinos G., Spandidos D.A. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA prevalence and p53 codon 72 (Arg72Pro) polymorphism in prostate cancer in a Greek group of patients. *Tumour Biol.*, 2014, Vol. 35, no. 12, pp. 12765-12773.
26. Minichsdorfer C. HPV-associated cancers. *Memo*, 2019, Vol. 12, pp. 352-356.
27. Moghoofei M., Keshavarz M., Ghorbani S., Babaei F., Nahand J.S., Tavakoli A., Mortazavi H.S., Marjani A., Mostafaei S., Monavari S.H. Association between human papillomavirus infection and prostate cancer: A global systematic review and meta-analysis. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.*, 2019, Vol. 15, no. 5, pp. e59-e67.
28. Murakami S., Okubo K., Tsuji Y., Sakata H., Hamada S., Hirayama R. Serum interleukin-12 levels in patients with gastric cancer. *Surg. Today*, 2004, Vol. 34, no. 12, pp. 1014-1019.
29. Nahand J.S., Esghaei M., Monavari S.H., Moghoofei M., Kiani S.J., Mostafaei S., Mirzaei H., Bokharaei-Salim F. The assessment of a possible link between HPV-mediated inflammation, apoptosis, and angiogenesis in Prostate cancer. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 88, 106913. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106913.
30. Negin F.A. Immunotherapy of prostate cancer by a combination of treatments aiming at activation of OX40 and intratumoral production of IL-12. *Amazon*, 2012, Vol. 72, no. 1, pp. 12-23.
31. Okunade K.S. Human papillomavirus and cervical cancer. *J. Obstet. Gynaecol.*, 2020, Vol. 40, no. 5, pp. 602-608.
32. Opeyemi Bello R., Willis-Powell L., James O., Sharma A., Marsh E., Ellis L., Gaston K., Siddiqui Y. Does human papillomavirus play a causative role in prostate cancer? A systematic review using Bradford Hill's criteria. *Cancers*, 2023, Vol. 15, no. 15, 3897. doi: 10.3390/cancers15153897.
33. Paz F.G., Marina V.M., Ortega A.M., González A.S., Zaragoza O.P., García A.B., Poveda K.T., Moreno J., González J.A., Marquez E.H., Morales V.B. The Relationship between the antitumor effect of the IL-12 gene therapy and the expression of Th1 cytokines in an HPV16-positive murine tumor model. *Mediators Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, 510846. doi: 10.1155/2014/510846.

34. Rosalik K., Tarney C., Han J. Human papilloma virus vaccination. *Viruses*, 2021, Vol. 13, no. 6, 1091. doi: 10.3390/v13061091.
35. Russo G., Calogero A.E., Condorelli R.A., Scalia G., Morgia G., Vignera S.L. Human papillomavirus and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Aging Male*, 2020, Vol. 23, no. 2, pp. 132-138.
36. Salimu J., Webber J., Gurney M., Al-Taei S., Clayton A., Tabi Z. Dominant immunosuppression of dendritic cell function by prostate-cancer-derived exosomes. *J. Extracell. Vesicles*, 2017, Vol. 6, no. 1, 1368823. doi: 10.1080/20013078.2017.1368823.
37. Shariat A., Arzani P., Shirali M. Studying the association between human papillomavirus and prostate cancer by immunohistochemistry and PCR techniques in ahvaz hospitals. *JSMJ*, 2020, Vol. 19, no. 4, pp. 425-434.
38. Shekar A.M., Bahar B., Behbin M., Atri M., Falak R., Imani M., Danesh P. The evaluation of serum levels of IFN- γ , IL-12 and percentage of CD4⁺, CD8⁺ and NK cells in peripheral blood of metastatic, nonmetastatic breast cancer patients and normal individuals. *RJMS*, 2008, Vol. 14, no. 57, pp. 113-120.
39. Shi G., Edelblute C., Arpag S., Lundberg C., Heller R. IL-12 gene electrotransfer triggers a change in immune response within mouse tumors. *Cancers*, 201, Vol. 10, no. 12, 498. doi: 10.3390/cancers10120498.
40. Tolstov Y., Hadaschik B., Pahernik S., Hohenfellner M., Duensing S. Human papillomaviruses in urological malignancies: a critical assessment. *Urol. Oncol.*, 2014, Vol. 32, no. 1, pp. 46.e19-e27.
41. Torres-Poveda K., Bahena-Román M., Madrid-González C., Burguete-García A., Bermúdez-Morales V.H., Peralta-Zaragoza O., Madrid-Marina V. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World J. Clin. Oncol.*, 2014, Vol. 5, no. 4, pp. 753-763.
42. Tugues S., Burkhard S.H., Ohs I., Vrohings M., Nussbaum K., Vom Berg J., Kulig P., Becher B. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ.*, 2015, Vol. 22, no. 2, pp. 237-246.
43. Usman M., Ahmad M., Hameed Y., Ahmed H., Safdar Hussain M., Rehman J.U., Arshad R., Atif M. Identification of correlation between human papillomavirus and prostate cancer: Bradford Hill Criteria Based Evaluation. *Int. J. Endorsin*, 2021, pp. 248-256.
44. Videla S., Darwich L., Cañadas M., Clotet B., Sirera G. Incidence and clinical management of oral human papillomavirus infection in men: a series of key short messages. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2014, Vol. 12, no. 8, pp. 947-957.
45. Yang L., Xie S., Feng X., Chen Y., Zheng T., Dai M., Zhou C.k., Hu Z., Li N., Hanga D. Worldwide prevalence of human papillomavirus and relative risk of prostate cancer: A Meta-analysis. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 14667. doi: 10.1038/srep14667.
46. Yin X., Yan X., Yang Q., Cao H., Liang H. Antitumor mechanism of recombinant murine interleukin-12 vaccine. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2010, Vol. 25, no. 3, pp. 263-268.
47. Yu L., Majeriac V., Zheng Z.-M. HPV16 and HPV18 genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 23, no. 9. 4943. doi: 10.3390/ijms23094943.

Авторы:

Садех Моради – отдел иммунологии, медицинский факультет, Университет медицинских наук Ахваза Джундишапура, Ахваз, Иран

Мохаммад Рашино – ассистент Центра микробиологии, клеточных и молекулярных исследований, Университет медицинских наук Ахваза Джундишапура, Ахваз, Иран

Мохсен Саркарян – ассистент кафедры урологии, Школа медицины, госпиталь Голестан Университет медицинских наук Ахваза Джундишапура, Ахваз, Иран

Голам Аббас Кайдани – ассистент кафедры медицинской вирусологии, отдел лабораторных наук, Общая школа медицины, Университет медицинских наук Ахваза Джундишапура, Ахваз, Иран

Authors:

Sadegh Moradi, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Mohammad Rashno, Assistant Professor of Microbiology Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Mohsen Sarkarian, Assistant Professor of Urology Department of Urology, School of Medicine, Golestan Hospital, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Gholam Abbas Kaydani, Assistant Professor of Medical Virology Department of Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Ладан Фатахи – ассистент кафедры патологии, Школа медицины, госпиталь имама Хомейни, госпиталь Голестан, Университет медицинских наук Ахваза Джундишапура, Ахваз, Иран

Мариам Сейедтабиб – ассистент кафедры биостатистики, отдел биостатистики и эпидемиологии, Школа здравоохранения, Университет медицинских наук Ахваза Джундишапура, Ахваз, Иран

Муса Шариффат – отдел иммунологии, медицинский факультет, Университет медицинских наук Ахваза Джундишапура, Ахваз, Иран

Али Ходадади – отдел иммунологии, медицинский факультет, Университет медицинских наук Ахваза Джундишапура, Ахваз, Иран

Ladan Fatahi, Assistant Professor of Pathology Department of Pathology, School of Medicine, Imam Khomeini Hospital, Golestan Hospital, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Maryam Seyedtabib, Assistant Professor of Biostatistics Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Health, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Moosa Shariffat, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Ali Khodadadi, Department of Immunology, Faculty of Medicine. Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Поступила 26.06.2024
Принята к печати 13.06.2025

Received 26.06.2024
Accepted 13.06.2025

ДНКазы 1L3 и ДНКазы II КАК ИНДИКАТОРЫ КАЧЕСТВА ЭЯКУЛЯТА

Минасова А.А.¹, Савочкина А.Ю.¹, Федорова К.С.¹, Нохрин Д.Ю.²,
Саматова А.И.¹, Абрамовских О.С.¹

¹ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

² ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Резюме. Основным методом оценки репродуктивной функции мужчин является спермиологический анализ, который не всегда является показательным для установления причины бесплодия. В литературных данных особая роль в нарушении мужской фертильности отводится оксидативному стрессу, в результате которого повреждаются мужские половые клетки. Повреждение мембран сперматозоидов сопровождается выходом их ДНК во внеклеточное пространство, что является индуктором развития местной воспалительной реакции. В таком случае, поддержание гомеостаза семенной жидкости будет зависеть от эффективности деградации внеклеточной ДНК. У человека данную функцию осуществляют ферменты ДНКазы, локализованные во всех тканях и биологических жидкостях организма. Также отмечена их роль в процессе оплодотворения и фрагментации генетического материала сперматозоидов. Избыток или недостаток ДНКаз может привести к развитию широкого спектра заболеваний. Целью настоящего исследования являлось установление референтных интервалов для ДНКазы 1L3 и ДНКазы II эякулята и поиск связей между концентрацией нуклеаз и показателями спермиологического анализа. В качестве материала для исследования использовали семенную жидкость 82 условно здоровых мужчин в возрасте 18–49 лет, обследованных на базе НИИ иммунологии ЮУГМУ. Критериями исключения являлось наличие воспалительных заболеваний урогенитального тракта и ИППП. Спермиологический анализ проводился согласно лабораторному руководству ВОЗ. Обследование на ИППП проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Концентрацию ДНКаз в эякуляте определяли методом ИФА. Описательную статистику, построение гистограмм и референтных интервалов, проводили в программе R. Нами впервые были определены уровни ДНКазы 1L3 и ДНКазы II в семенной жидкости и установлены для них референтные интервалы. Сдвиги значений концентраций ДНКазы 1L3 и ДНКазы II, вероятнее всего, могут рассматриваться как индикаторы возможных патологических состояний. В частности,

Адрес для переписки:

Минасова Анна Александровна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (909) 068-45-28.
E-mail: pandora_anna@mail.ru

Address for correspondence:

Anna A. Minasova
South Ural State Medical University
64 Vorovsky St
Chelyabinsk
454092 Russian Federation
Phone: +7 (909) 068-45-28.
E-mail: pandora_anna@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Минасова, А.Ю. Савочкина, К.С. Федорова,
Д.Ю. Нохрин, А.И. Саматова, О.С. Абрамовских
«ДНКазы 1L3 и ДНКазы II как индикаторы качества
эякулята» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27,
№ 5. С. 1053-1062. doi: 10.15789/1563-0625-DAD-3210
© Минасова А.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Minasova, A. Yu. Savochkina, K.S. Fedorova,
D. Yu. Nokhrin, A.I. Samatova, O.S. Abramovskikh “DNase
1L3 and DNase II as indicators of ejaculate quality”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025,
Vol. 27, no. 5, pp. 1053-1062.
doi: 10.15789/1563-0625-DAD-3210
© Minasova A.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DAD-3210

повышенная концентрация ДНКазы 1L3 — индикатор патологического процесса, связанного с низкой подвижностью сперматозоидов, а высокие уровни ДНКазы II можно рассматривать как индикатор местной воспалительной реакции.

Ключевые слова: дезоксирибонуклеазы, сперматозоиды, спермиологический анализ, мужское бесплодие, качество эякулята, воспаление

DNase 1L3 AND DNase II AS INDICATORS OF EJACULATE QUALITY

Minasova A.A.^a, Savochkina A.Yu.^a, Fedorova K.S.^a, Nokhrin D.Yu.^b, Samatova A.I.^a, Abramovskikh O.S.^a

^a South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Sperm analysis is the main method of assessing male reproductive function, which is not always informative in cases of infertility. In the literature, a special role in the disturbed male fertility is attributed to oxidative stress which results into damage of male germ cells. Damage of spermatozoa membranes is accompanied by the release of their DNA into the extracellular space, which is an inducer of local inflammatory reaction. In this case, the maintenance of seminal fluid homeostasis will depend on the efficiency of extracellular DNA degradation. In human beings, this function is performed by DNase enzymes localized in all tissues and body fluids. Their role in the process of fertilization and fragmentation of spermatozoal genetic material was also noted. Excess or deficiency of DNases may lead to the development of different disorders. The aim of the present study was to establish reference intervals for ejaculate DNase 1L3 and DNase II and to search for relationships between the concentration of nucleases and sperm analysis parameters. The seminal fluid of 82 conditionally healthy men aged 18-49 years examined at the Research Institute of Immunology of South Ural State Medical University was used as a material for the study. Exclusion criteria were the presence of urogenital inflammatory disorders and sex-transmitted infections (STI). Sperm analysis was performed according to the WHO laboratory manual. Screening for STI was performed by real-time PCR. DNase concentration in ejaculate was determined by ELISA method. Descriptive statistics, construction of histograms and reference intervals were performed in the “R” platform. Primarily, we have determined the levels of DNase 1L3 and DNase II in seminal fluid and established appropriate reference intervals. Shifts in DNase 1L3 and DNase II concentrations can most likely be considered as markers of possible pathologic conditions. In particular, an increased concentration of DNase 1L3 is an index of a pathological process associated with low sperm motility, whereas high levels of DNase II may be considered an indicator of a local inflammatory reaction.

Keywords: deoxyribonucleases, spermatozoa, sperm analysis, male infertility, ejaculate quality, inflammation

Введение

На сегодняшний день в развитых странах фиксируется низкий уровень рождаемости [7]. Примерно 15% сексуально активных пар репродуктивного возраста считаются бесплодными, причем более 50% случаев бесплодия приходится на мужской фактор [5, 21]. В России в том числе отмечена устойчивая тенденция к росту мужского фактора бесплодия на основании обращений семейных пар в репродуктивные клиники [19].

Снижение мужской фертильности может быть обусловлено разными факторами: врожденными пороками, травмами мочеполовой системы, опухолями репродуктивных органов, гормональным дисбалансом, генетическими, иммунологическими и инфекционными факторами, а также образом жизни [2]. Оценка фертильного потенциала мужчины начинается с лабораторного исследования эякулята — спермиологического анализа. Снижение качественных и количественных показателей семенной жидкости, в частности

уменьшение концентрации сперматозоидов в семенной жидкости, нарушение их морфологии и подвижности, может привести к бесплодию [1, 3, 4, 21].

В 30-40% случаев не удается выявить фактор, снижающий фертильность. В таком случае говорят об идиопатическом бесплодии, т. е. бесплодии неясного генеза. В литературных данных особая роль в нарушении мужской фертильности отводится избыточному образованию активных форм кислорода (АФК), т. е. оксидативному стрессу [8, 10]. Одной из ключевых причин развития окислительного стресса являются воспалительные процессы инфекционного и неинфекционного характера. АФК оказывают токсическое действие на клеточные мембраны сперматозоидов, что сопровождается нарушением их целостности. Под агрессивное действие АФК также попадает генетический материал сперматозоидов. В совокупности эти процессы приводят к дисфункциональности мужских половых клеток. В результате повреждения мембран сперматозоидов их нуклеиновые кислоты попадают во внеклеточное пространство, что является индуктором развития местной воспалительной реакции [3, 18, 20].

Внеклеточная ДНК (вкДНК) представляет собой генетический материал поврежденных и умирающих клеток, который может быть распознан иммунной системой как чужеродный объект, вызывая воспалительную реакцию и выработку антител [14].

В свою очередь, индуцированный вкДНК воспалительный процесс приводит к образованию АФК. В таком случае поддержание гомеостаза семенной жидкости будет зависеть от эффективности деградации вкДНК. В организме человека данную функцию осуществляют ферменты семейства ДНКазы I и ДНКазы II [14].

ДНКазы представляют собой гидролитические ферменты, которые расщепляют фосфодиэфирные связи между пентозой и фосфатным остовом ДНК. Эти ферменты принимают участие в процессах репликации, рекомбинации и репарации ДНК, конденсации хроматина, а также участвуют в метаболизме вкДНК [14]. Множество функций обуславливает разнообразие ферментов данной группы и их локализацию в различных органах и тканях организма [17].

В предыдущих исследованиях семенной жидкости было доказано, что при высоком уровне ДНКазы I обнаруживаются низкие уровни антиспермальных антител (АСАТ), а эякулят характеризуется меньшей вязкостью и коротким временем разжижения. Также авторами была предпринята попытка установить референтные интервалы для данного фермента [6].

На данный момент в литературе нет информации о присутствии в эякуляте ДНКазы 1L3, однако этот фермент относится к семейству ДНКазы I, представители которого наиболее изучены и встречаются во многих биологических жидкостях, в том числе и в эякуляте. ДНКазы 1L3 (она же ДНКазы γ) активна в нейтральной или слабощелочной среде (pH 6,5-8,0). Кроме того, участвует в деградации генетического материала при апоптозе клеток и расщепляет внеклеточно расположенную ДНК. Некоторые авторы предполагают, что ДНКазы 1L3 может проникать в неповрежденные клетки и, возможно, способна разрушать хроматин [9, 14, 15, 16, 17, 18].

Согласно литературным данным, в семенной жидкости присутствует также ДНКазы II [14, 18]. ДНКазы II проявляет активность при кислых значениях среды (pH 4,8-5,2), поэтому наибольшая концентрация отмечена в лизосомах. В составе фаголизосом ДНКазы II принимает участие в деградации фагоцитированной ДНК [12, 13, 16, 17, 18].

Биологическая роль вышеперечисленных ДНКаз в эякуляте заключается в элиминации генетического материала патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, разрушенных компонентов клеток собственного организма. Также в литературных данных отмечена роль нуклеаз в процессе оплодотворения: они способствуют продвижению сперматозоидов по женским репродуктивным путям [12, 14]. Отсутствие или недостаточный уровень ДНКаз может привести к развитию широкого спектра заболеваний в результате накопления вкДНК [17].

С другой стороны, согласно исследованиям J. Gosálvez et al., ДНКазы способны проникать через мембраны неповрежденных клеток и вызывать одноцепочечные и двухцепочечные разрывы ДНК. В таком случае эти ферменты представляют потенциальную угрозу как для мужских половых клеток, так и женских, за счет фрагментации их генетического материала [14].

Таким образом, оценка концентрации ДНКаз обоих семейств в семенной жидкости позволит получить дополнительную информацию о репродуктивном потенциале мужчин за счет понимания физиологической роли этих ферментов. Полученные данные помогут изучить одну из возможных причин развития идиопатического бесплодия и, в дальнейшем, стать дополнительным критерием оценки мужской фертильной функции.

В настоящее время в литературных источниках нет данных о референтных показателях концентрации ДНКазы 1L3 и ДНКазы II в семенной жидкости, в связи с этим мы решили установить референтные интервалы для этих нуклеаз.

Материалы и методы

В качестве материала для исследования использовали семенную жидкость 82 условно здоровых мужчин в возрасте 18–49 лет (средний возраст $34 \pm 0,9$ года), обследованных на базе НИИ иммунологии ЮУГМУ. Участники исследования были проинформированы о целях исследования, процедурах и анализах, проводимых в его рамках. Они дали добровольное письменное согласие на участие в исследовании. Критериями включения были репродуктивный возраст от 18 до 49 лет, исключение приема алкоголя, антибиотикотерапии, массажа предстательной железы, перегревания и переохлаждения в течение последних 3 месяцев, а также половое воздержание в течение 3–5 дней перед обследованием. Критериями исключения являлось наличие воспалительных заболеваний урогенитального тракта и ИППП. Образцы эякулята отбирались путем мастурбации в стерильный пластиковый контейнер и в течение часа доставлялись в лабораторию.

Спермиологический анализ проводился согласно лабораторному руководству ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека, шестое издание [4]. Для определения АСАТ в эякуляте использовали наборы SpermMar Test IgG и SpermMar Test IgA (FertiPro N.V., Бельгия). Обследование на ИППП (*Chlamidia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*) осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием тест-систем «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis*/*Mycoplasma genitalium*» и «РеалБест ДНК *Trichomonas vaginalis*/*Neisseria gonorrhoeae*» (АО «Вектор-Бест», Россия). Для определения уровней концентраций ДНКазы 1L3 и ДНКазы II использовали тест-системы ELISA Kit for Deoxyribonuclease I Like Protein 3 и ELISA Kit for Deoxyribonuclease II (Cloud-Clone Corp., США).

Описательную статистику, построение диаграмм и референтных интервалов для ДНКаз проводили в программе R. При установлении

референтных интервалов опирались на руководство EP28-A3c Института клинических и лабораторных испытаний (CLSI) [11]. Анализ главных компонент (ГК) проводили в программе и PAST (version 4.13).

Результаты

На первом этапе исследования мы получили данные о концентрациях ДНКазы 1L3 и ДНКазы II в эякуляте мужчин репродуктивного возраста и проанализировали их с помощью описательных методов статистики (табл. 1).

При проверке полученных данных на нормальность было обнаружено ненормальное распределение (рис. 1, 2).

В связи с асимметричным распределением ДНКаз использовали нормализующее преобразование Бокса–Кокса. На основе преобразованных данных были построены точечные диаграммы референтных интервалов для ДНКазы 1L3 и ДНКазы II. На графике сплошной линией обозначены границы интервалов (верхние и нижние), пунктирными линиями – 90% доверительные интервалы для установленных границ (рис. 3, 4).

Рассчитанные референтные интервалы концентрации ДНКаз в семенной жидкости мужчин репродуктивного возраста имели следующие значения:

- для ДНКазы 1L3 нижняя граница составила 0,02 (0,01–0,03) пг/мл, верхняя граница – 1,76 (1,30–2,36) пг/мл;
- для ДНКазы II нижняя граница составила 0,78 (0,50–1,16) пг/мл, верхняя граница – 25,91 (21,19–31,42) пг/мл.

На следующем этапе были определены связи между концентрациями ДНКазы 1L3 и ДНКазы II эякулята и показателями спермиологического анализа (табл. 2).

С помощью корреляционного анализа Спирмена были выявлены связи между концентрацией ДНКазы 1L3 и такими показателями спермио-

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ДНКазы 1L3 И ДНКазы II В СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ МУЖЧИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА, пг/мл

TABLE 1. LEVELS OF DNase 1L3 AND DNase II IN SEMINAL FLUID OF MEN OF REPRODUCTIVE AGE, pg/mL

| Показатели Indicators | Среднее (95% ДИ) Mean (95% CI) | Xmin; Xmax Xmin; Xmax | Me (Q _{0,25} - Q _{0,75}) Me (Q _{0,25} - Q _{0,75}) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--|
| ДНКазы 1L3 DNase 1L3 (n = 82) | 0,38±0,04 (0,30-0,47) | 0,016; 1,64 | 0,20 (0,11-0,55) |
| ДНКазы II DNase II (n = 80) | 8,01±0,71 (6,65-9,38) | 0,49; 30,20 | 6,35 (3,47-11,25) |

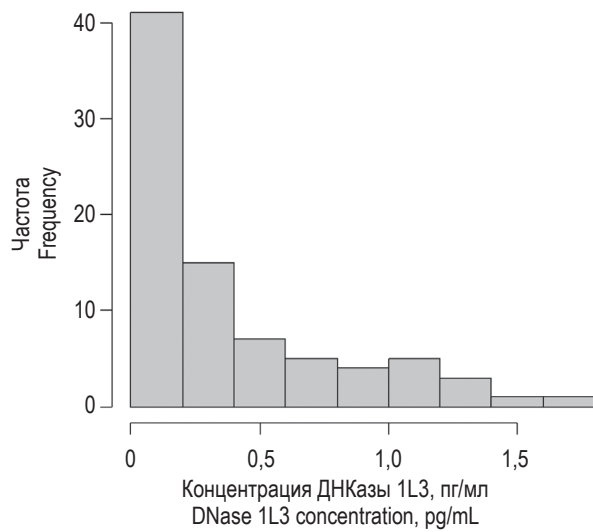


Рисунок 1. Гистограмма распределения ДНКазы 1L3
Figure 1. Histogram of the distribution of DNase 1L3

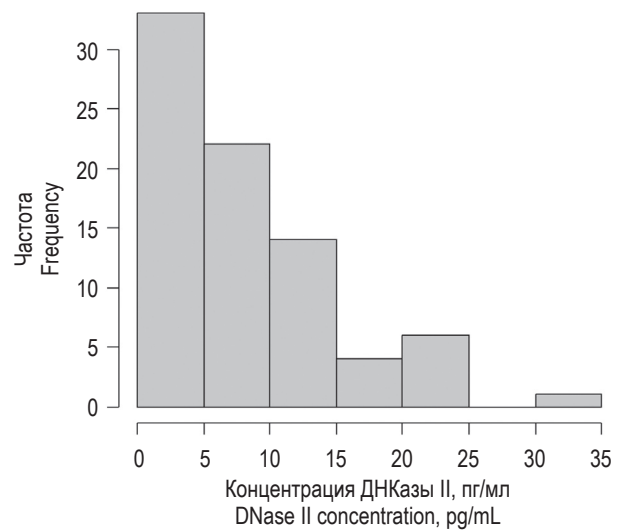


Рисунок 2. Гистограмма распределения ДНКазы II
Figure 2. Histogram of the distribution of DNase II

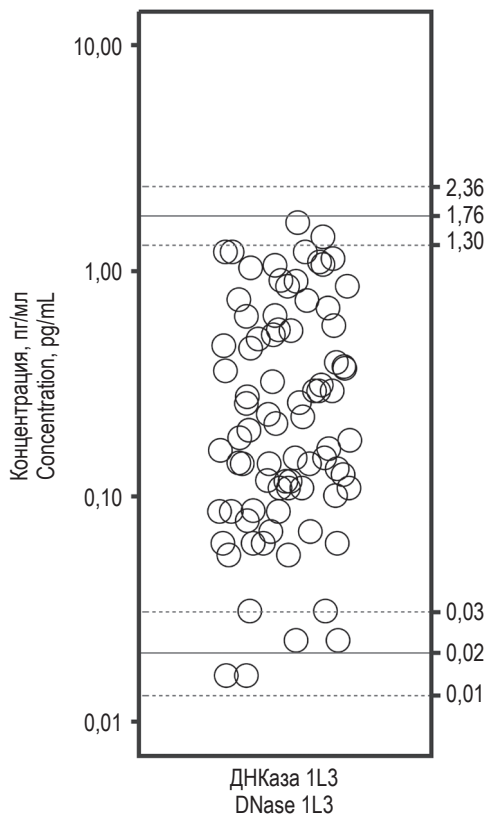


Рисунок 3. Точечная диаграмма концентрации ДНКазы 1L3 в семенной жидкости с референтными интервалами
Примечание. Сплошные линии обозначают границы интервалов, пунктирные – 90% ДИ для границ.
Figure 3. Dot plot of DNase 1L3 concentration in seminal fluid with reference intervals
Note. Solid lines indicate interval boundaries, dashed lines indicate 90% CI for the boundaries.

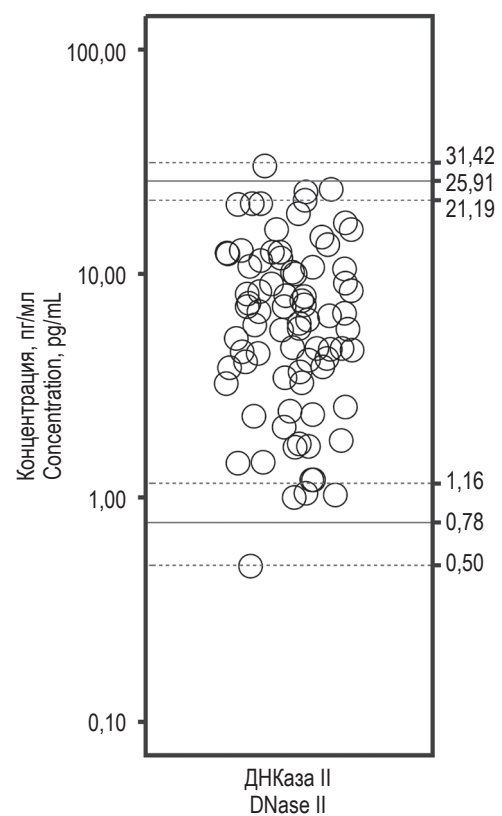


Рисунок 4. Точечная диаграмма концентрации ДНКазы II в семенной жидкости с референтными интервалами
Примечание. См. примечание к рисунку 3.
Figure 4. Dot plot of DNase II concentration in seminal fluid with reference intervals
Note. As for Figure 3.

ТАБЛИЦА 2. КОЭФФИЦИЕНТЫ РАНГОВОЙ КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМЕНА МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ СПЕРМИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ЗНАЧЕНИЯМИ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДНКазы 1L3 И ДНКазы II

TABLE 2. SPEARMAN'S RANK CORRELATION COEFFICIENTS BETWEEN SPERM ANALYSIS PARAMETERS AND THE VALUES OF DNase 1L3 AND DNase II CONCENTRATIONS

| Показатели спермиологического анализа Sperm analysis parameters | ДНКазы 1L3 DNase 1L3 | | ДНКазы II DNase II | |
|---|-------------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| | r_s | p | r_s | p |
| Возраст Age | 0,11 | 0,320 | 0,03 | 0,797 |
| Воздержание Sexual abstinence | -0,03 | 0,814 | 0,09 | 0,423 |
| Цвет Color | 0,21 | 0,063** | -0,15 | 0,173 |
| Мутность Turbidity | -0,01 | 0,939 | -0,16 | 0,145 |
| pH | 0,30 | 0,006* | -0,21 | 0,068** |
| Время разжижения Liquefaction | 0,20 | 0,076** | -0,25 | 0,027* |
| Вязкость Viscosity | 0,12 | 0,266 | -0,15 | 0,173 |
| Объем эякулята Volume | -0,14 | 0,200 | 0,10 | 0,357 |
| Концентрация сперматозоидов Sperm concentration | 0,01 | 0,903 | 0,11 | 0,336 |
| Общее количество сперматозоидов Total sperm number | -0,06 | 0,596 | 0,18 | 0,113 |
| Прогрессивно-подвижные сперматозоиды (PR) Progressive motility (PR) | -0,17 | 0,120 | 0,11 | 0,313 |
| Непрогрессивно-подвижные сперматозоиды (NP) Non-progressive motility (NP) | -0,02 | 0,886 | 0,03 | 0,799 |
| Общая подвижность (PR + NP) Total motility (PR + NP) | -0,21 | 0,057** | 0,10 | 0,392 |
| Неподвижные сперматозоиды (IM) Immotile spermatozoa (IM) | 0,21 | 0,057** | -0,10 | 0,392 |
| Агглютинация сперматозоидов Agglutination | -0,11 | 0,338 | -0,06 | 0,584 |
| Неспецифическая агрегация Non-specific aggregation | -0,05 | 0,648 | -0,02 | 0,882 |
| Нормальные формы сперматозоидов Normal forms | 0,00 | 0,969 | 0,04 | 0,756 |
| Патологические формы сперматозоидов Pathologic forms | 0,02 | 0,827 | -0,09 | 0,437 |

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

| Показатели спермиологического анализа Sperm analysis parameters | ДНКазы 1L3 DNase 1L3 | | ДНКазы II DNase II | |
|--|-------------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| | r_s | p | r_s | p |
| Патология головки сперматозоидов Abnormal heads | 0,01 | 0,899 | -0,06 | 0,607 |
| Патология шейки сперматозоидов Abnormal midpieces | -0,04 | 0,717 | 0,10 | 0,384 |
| Патология хвоста сперматозоидов Abnormal tails | 0,05 | 0,671 | -0,01 | 0,901 |
| Клетки сперматогенеза Spermatogenic cells | 0,17 | 0,116 | -0,05 | 0,673 |
| Лейкоциты в эякуляте Leukocyte | -0,02 | 0,883 | 0,14 | 0,206 |
| Слизь в эякуляте Mucus | -0,03 | 0,814 | -0,06 | 0,611 |
| Антиспермальные антитела класса А MAR test (anti-IgA) | -0,16 | 0,160 | 0,12 | 0,288 |
| Антиспермальные антитела класса G MAR test (anti-IgG) | -0,34 | 0,002* | 0,26 | 0,018* |

Примечание. Значения коэффициента корреляции: до 0,4 – слабая корреляция; 0,4-0,7 – средняя корреляция; более 0,7 – сильная корреляция. * – статистически значимая связь ($p \leq 0,05$). ** – тенденция к связи ($0,05 < p \leq 0,10$).

Note. Correlation coefficient values: up to 0.4, weak correlation; 0.4-0.7, moderate correlation; more than 0.7, strong correlation. *, statistically significant correlation ($p \leq 0.05$). **, correlation trend ($0.05 < p \leq 0.10$).

логического анализа, как рН ($r = 0,30$; $p = 0,006$) и уровнем АСАТ класса G ($r = -0,34$; $p = 0,002$). Также были обнаружены тенденции к положительной корреляции с показателями «цвет», «время разжижения» и «неподвижные сперматозоиды», и отрицательной корреляции с показателем «общая подвижность». Были установлены корреляции между концентрацией ДНКазы II и показателями спермиологического анализа, а именно со временем разжижения ($r = -0,25$; $p = 0,027$) и уровнем АСАТ класса G ($r = 0,26$; $p = 0,018$). Также была обнаружена тенденция к отрицательной корреляции с показателем «рН».

Обсуждение

Мы допускаем, что физиологическое участие ДНКазы 1L3 заключается в обеспечении условий для успешной транспортировки сперматозоидов к месту оплодотворения через цервикальный канал, так как оптимум активности рН для ДНКазы 1L3 находится в диапазоне 6,5-8,0. В середине менструального цикла (овуляция) цервикальная слизь характеризуется значениями рН 7,0-8,5.

Это оптимальные условия для сохранения жизнеспособности и подвижности сперматозоидов в ходе реализации их биологических функций [4]. Нами было выявлено, что эякулят с повышенной концентрацией ДНКазы 1L3 сопровождается более высокими значениями рН (щелочная среда), минимальными значениями концентрации АСАТ класса G (IgG), снижением количества подвижных сперматозоидов. Возможно, ДНКазы 1L3 ответственна за утилизацию поврежденных сперматозоидов. Однако, опираясь на литературные данные, ДНКазе 1L3 отводят серьезную роль в патогенезе аутоиммунных процессов [15, 16, 18]. Полученные данные позволяют выдвинуть предположение, что ДНКазы 1L3 способна проникать сквозь мембраны сперматозоидов, повреждать хроматин, что, вероятно, способствует увеличению количества неподвижных сперматозоидов [9, 14, 15].

Физиологическая роль ДНКазы II в эякуляте предположительно может заключаться в обеспечении оптимальных условий для продвижения сперматозоидов в кислой среде влагалища. Однако нами была выявлена связь повышенной кон-

центрации ДНКазы II с повышенным уровнем АСАТ класса G и смещением pH к нейтральным значениям. Учитывая преимущественно внутриклеточную локализацию ДНКазы II в составе лизосом, можно сделать предположение, что обнаружение более высоких значений ДНКазы II в эякуляте свидетельствуют о повреждении клеток семенной жидкости вследствие оксидативного стресса. Данное обстоятельство подкрепляется высокими значениями уровней IgG, что указывает на возможное участие ДНКазы II в воспалительном процессе.

Заключение

Нами впервые были определены уровни и установлены референтные интервалы для ДНКазы IЛЗ и ДНКазы II в семенной жидкости мужчин репродуктивного возраста. На сегодняшний день нет данных о референтных интервалах концентрации этих нуклеаз в семенной жидкости. В условиях отсутствия информации относи-

тельно референтных интервалов для ДНКазы IЛЗ и ДНКазы II в семенной жидкости предлагаем ориентироваться на установленные в данном исследовании референтные интервалы. Полученные знания о концентрациях ДНКаз в семенной жидкости будут дополняться с увеличением выборки обследуемых лиц. Определение референтных интервалов, действительно, является важной задачей, в связи с серьезной физиологической ролью изученных ферментов. Сдвиги значений концентраций ДНКазы IЛЗ и ДНКазы II, вероятнее всего, могут рассматриваться как индикаторы возможных патологических состояний. В частности, повышенная концентрация ДНКазы IЛЗ — индикатор патологического процесса, связанного с низкой подвижностью сперматозоидов, а высокие уровни ДНКазы II можно рассматривать как индикатор местной воспалительной реакции.

Для поддержания гомеостаза эякулята, а значит, нормальной репродуктивной функции, необходима оптимальная концентрация обеих нуклеаз.

Список литературы / References

1. Жанбырбекулы У., Аскарров М.Б., Жанкина Р.А., Сайпиева Д.Т., Айнаев Е.И., Жапаров У.С., Ахметов Д.Э. Роль мезенхимальных стволовых клеток в лечении мужского бесплодия // Медицинский журнал Астаны, 2019. Т. 102, № 4. С. 54-59. [Zhanbyrbekuly U., Askarov M., Zhankina R., Saipieva D., Ainaev E., Zhaparov U., Akhmetov D. The role of mesenchymal stem cells in the treatment of Male infertility. *Meditsinskiy zhurnal Astany = Astana Medical Journal*, 2019, Vol. 102, no. 4, pp. 54-59. (In Russ.)]
2. Ибишев Х.С., Рябенченко Н.Н., Магомедов Г.А. Идиопатическое мужское бесплодие и папилломавирусная инфекция // Вестник урологии, 2019. Т. 7, № 2. С. 51-58. [Ibishev Kh.S., Riabenchenko N.N., Magomedov G.A. Idiopathic male infertility and human papillomavirus infection. *Vestnik urologii = Urology Herald*, 2019, Vol. 7, no. 2, pp. 51-58. (In Russ.)]
3. Кузьменко А.В., Кузьменко В.В., Гяургиев Т.А. Особенности лечения пациентов с мужским фактором бесплодия в условиях пандемии COVID-19 // РМЖ, 2020. Т. 28, № 13. С. 10-12. [Kuzmenko A.V., Kuzmenko V.V., Gyaurgiev T.A. Treatment characteristics of patients with male factor infertility in COVID-19. *RMZh = RMJ*, 2020, Vol. 28, no. 13, pp. 10-12. (In Russ.)]
4. Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 6-е изд. 2023. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://iris.who.int/handle/10665/371010>. [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. 2023. [Electronic resource]. Available at: <https://iris.who.int/handle/10665/371010>.]
5. Лебедев Г.С., Голубев Н.А., Шадеркин И.А., Шадеркина В.А., Аполихин О.И., Сивков А.В., Комарова В.А. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000-2018 годы // Экспериментальная и клиническая урология, 2019. № 4. С. 4-12. [Lebedev G.S., Golubev N.A., Shaderkin I.A., Shaderkina V.A., Apolikhin O.I., Sivkov A.V., Komarova V.A. Male infertility in the Russian Federation: statistical data for 2000-2018. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology*, 2019, no. 4, pp. 4-12. (In Russ.)]
6. Минасова А.А., Савочкина А.Ю., Нохрин Д.Ю., Шарбакина К.А., Пашкина Н.В., Никушкина К.В. Взгляд на иммунологическое мужское бесплодие с точки зрения сохранения гомеостаза семенной жидкости // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 4. С. 967-974. [Minasova A.A., Savochkina A.Yu., Nokhrin D.Yu., Sharabakina K.A., Pashkina N.V., Nikushkina K.V. A view of immunologic male infertility from the perspective of preserving seminal fluid homeostasis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2024, Vol. 27, no. 4, pp. 967-974. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-16904-AVO.
7. Aitken R.J. What is driving the global decline of human fertility? Need for a multidisciplinary approach to the underlying mechanisms. *Front. Reprod. Health*, 2024, Vol. 6, 1364352. doi: 10.3389/frph.2024.1364352.
8. Aitken R.J., Baker M.A. The role of genetics and oxidative stress in the etiology of male infertility – a unifying hypothesis? *Front. Endocrinol.*, 2020, Vol. 11, 581838. doi: 10.3389/fendo.2020.581838.

9. Basnakian A.G., Moore C. L. Apoptotic DNase network: Mutual induction and cooperation among apoptotic endonucleases. *J. Cell. Mol. Med.*, 2021, Vol. 25, pp. 6496-6499.
10. Cannarella R., Condorelli R.A., Jezek D., Calogero A.E. Editorial: Male idiopathic infertility: novel possible targets, volume I. *Front. Endocrinol.*, 2021, Vol. 12, 797228. doi: 10.3389/fendo.2021.797228.
11. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. Available at: https://webstore.ansi.org/preview-pages/CLSI/preview_CLSI+EP28-A3C.pdf.
12. Demkow U. Molecular Mechanisms of Neutrophil Extracellular Trap (NETs) Degradation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 5, 4896. doi: 10.3390/ijms24054896.
13. Evans C.J., Aguilera R.J. DNase II: genes, enzymes and function. *Gene*, 2003, Vol. 322, pp. 1-15.
14. Gosálvez J., Fernández C.L., Johnston S.D., Bartolomé-Nebreda J. Role of DNase activity in human sperm DNA fragmentation. *Biomolecules*, 2024, Vol. 14, no. 3, 304. doi: 10.3390/biom14030304.
15. Han D.S.C., Lo Y.M.D. The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology. *Trends Genet.*, 2021, Vol. 37, no. 8, pp. 758-770.
16. Hernandez F.J. Nucleases: From primitive immune defenders to modern biotechnology tools. *Immunology*, 2025, Vol. 174, no. 3, pp. 279-286.
17. Keyel P.A. Dnases in health and disease. *Dev. Biol.*, 2017, Vol. 429, no. 1, pp. 1-11.
18. Laukova L., Konecna B., Janovicova L., Vlkova B., Celec P. Deoxyribonucleases and their applications in biomedicine. *Biomolecules*, 2020, Vol. 10, no. 7, pp. 1-20.
19. Rusanova N. E. Infertility and fertility: demographic problems of assisted reproduction. *Popul. Econ.*, 2024, Vol. 8, no. 1, pp. 156-167.
20. Shi G., Abbott K.N., Wu W., Salter R.D., Keyel P.A. Dnase1L3 regulates inflammasome-dependent cytokine secretion. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 522. doi: 10.3389/fimmu.2017.00522/
21. Shi Y., Zhang Y., Yuan K., Han Z., Zhao S., Zhang Z., Cao W., Li Y., Zeng Q., Sun S. Exposure to ambient ozone and sperm quality among adult men in China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2024, Vol. 283, no. 15, 116753. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.116753.

Авторы:

Минасова А.А. – к.б.н., старший научный сотрудник Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Савочкина А.Ю. – д.м.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Федорова К.С. – старший лаборант Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Minasova A.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Savochkina A.Yu., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Microbiology, Virology and Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Fedorova K.S., Senior Laboratory Assistant, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Нохрин Д.Ю. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия

Саматова А.И. — старший лаборант Научно-исследовательского института иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Абрамовских О.С. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Nokhrin D. Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Samatova A. I., Senior Laboratory Assistant, Research Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abramovskikh O. S., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 13.03.2025

Отправлена на доработку 18.03.2025

Принята к печати 24.06.2025

Received 13.03.2025

Revision received 18.03.2025

Accepted 24.06.2025

ИССЛЕДОВАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ОЦЕНКЕ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 И В УСЛОВИЯХ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА

Путков С.Б.¹, Давыдова Н.В.¹, Казаков С.П.^{1,2}

¹ ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко», Москва, Россия

² ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

Резюме. Сегодня клинические проявления у больных COVID-19 варьируют от легкого до тяжелого течения, особенно в группах пациентов, подверженных хроническим заболеваниям. Выбор наиболее информативных показателей, обеспечивающих прогноз возможного исхода или тяжелого течения заболевания у пациентов с COVID-19, необходим уже на раннем этапе для определения эффективной тактики лечения. Наиболее ранними предикторами ухудшения состояния больных при COVID-19 являются повышенные значения интерлейкина-6, интерлейкина-10, С-реактивного белка, прокальцитонина и других показателей врожденной иммунной системы. Одной из задач настоящего исследования было определение наиболее информативных показателей общеклинического анализа крови и основных субпопуляций лимфоцитов у пациентов с COVID-19, позволяющих помочь в интерпретации степеней тяжести заболевания и развития цитокинового шторма наряду с клиническими проявлениями и функциональными методами диагностики. Нами проведено ретроспективное когортное исследование периферической крови у 65 больных, из которых было 57 мужчин и 8 женщин, возраст пациентов варьировал от 32 до 82 лет, средний возраст составил 48,6 года. После исследования общего анализа крови в 65 образцах выполнен цитометрический анализ с использованием системы проточной цитофлуориметрии серии Cytomics™ FC 500 фирмы Beckman Coulter (США), моноклональных антител CD45-ECD, CD3-FITC, CD4-PC7, CD8-PE, CD19-PC-5, CD16⁺56-PE фирмы Beckman Coulter (США). Статистическая обработка результатов исследования проведена в программе IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM, США). У обследованных нами пациентов с COVID-19 при первичном обращении за медицинской помощью отмечается абсолютная лимфопения на фоне нейтрофилеза, что выражается в повышении значений нейтрофильно-лейкоцитарного и лейкоцитарно-Т-лимфоцитарного индексов. Данные индексы с достаточно высокой информативностью могут использоваться при прогнозировании рисков заболевания. Определение наиболее достоверных показателей клеточного звена иммунитета, таких как CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺

Адрес для переписки:

Казаков Сергей Петрович
ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь
имени академика Н.Н. Бурденко»
105094, Россия, Москва, Госпитальная площадь, 3.
Тел.: 8 (499) 263-01-73.
E-mail: gvkg.ckld@mail.ru

Address for correspondence:

Sergey P. Kazakov
Main Military N. Burdenko Clinical Hospital,
Russian Defense Ministry
3 Gospitalnaya Square
Moscow
105094 Russian Federation
Phone: +7 (499) 263-01-73.
E-mail: gvkg.ckld@mail.ru

Образец цитирования:

С.Б. Путков, Н.В. Давыдова, С.П. Казаков
«Исследование субпопуляционного состава лейкоцитов
крови при оценке тяжести течения COVID-19
и в условиях цитокинового шторма» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 1063-1076.
doi: 10.15789/1563-0625-SPO-3236

© Путков С.Б. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.B. Putkov, N.V. Davydova, S.P. Kazakov "Subpopulation
profile of blood leukocytes in assessing severity of COVID-19
and in conditions associated with cytokine storm", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025,
Vol. 27, no. 5, pp. 1063-1076.
doi: 10.15789/1563-0625-SPO-3236

© Putkov S.B. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-SPO-3236

лимфоциты, дополнительно к клиническому анализу крови, может дать оценку особенностям иммунного реагирования организма на инфицирование SARS-CoV-2, помочь спрогнозировать тяжесть течения заболевания, а также принять решение для изменения тактики лечения при необходимости.

Ключевые слова: лимфопения, субпопуляции лимфоцитов, показатели клеточного звена иммунитета, цитокиновый шторм, прогноз, заболевание COVID-19

SUBPOPULATION PROFILE OF BLOOD LEUKOCYTES IN ASSESSING SEVERITY OF COVID-19 AND IN CONDITIONS ASSOCIATED WITH CYTOKINE STORM

Putkov S.B.^a, Davydova N.V.^a, Kazakov S.P.^{a, b}

^a Main Military N. Burdenko Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

^b Federal Research and Clinical Center for Specialized Medical Care and Medical Technologies, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Abstract. Currently, the clinical manifestations of COVID-19 patients are classified from mild to severe, especially in groups of patients susceptible to chronic diseases. Selection of the most informative prognostic indices of possible outcome or severe course of the disease in COVID-19 patients is required at early stage in order to determine effective treatment strategy. The earliest predictors of clinical deterioration in COVID-19 are elevated levels of interleukin-6, interleukin-10, C-reactive protein, procalcitonin, and other indices of innate immune system. The objectives of this study included a search for the most informative parameters of general clinical blood analysis and the main lymphocyte subpopulations in patients with COVID-19, which may be helpful in interpreting the severity of the disease and development of a cytokine storm, along with clinical manifestations and functional diagnostic methods. We conducted a retrospective cohort study of peripheral blood in 65 patients including 57 males and 8 females. The age of the patients ranged from 32 to 82 years (an average of 48.6 years old). After examining the total blood counts in 65 samples, cytometric analysis was performed using the Cytomics™ FC 500 series flow cytometry system (Beckman Coulter, USA), with CD45-ECD, CD3-FITC, CD4-PC7, CD8-PE, CD19-PC-5, CD16⁺56-PE monoclonal antibodies from Beckman Coulter (USA). Statistical processing of the research results was carried out in the IBM SPSS Statistics 26.0 program (IBM, USA). In the group of patients with COVID-19, absolute lymphopenia is noted along with neutrophilia at the initial medical treatment, resulting into increased values of the neutrophil-leukocyte and leukocyte-T-lymphocyte indices. These indexes are quite informative and can be used in predicting disease risks. Determination of the most reliable indices of cellular immunity, such as CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3-CD16⁺CD56⁺ lymphocytes, in addition to a clinical blood test, may assess the features of the patients' immune response to SARS-CoV-2 infection, helping to predict the disease severity, and make a decision to change the treatment strategy if required.

Keywords: lymphopenia, lymphocyte subpopulations, cellular immunity, cytokine storm, prognostic indexes, COVID-19 disease

Введение

С момента окончания пандемии COVID-19 и до настоящего времени по всему миру проводится регулярный мониторинг случаев госпитализации и поступления в отделения интенсивной терапии пациентов с коронавирусной инфекцией (SARS-CoV-2) [6]. Сегодня клинические проявления у больных COVID-19 варьируют от легкого до тяжелого течения, особенно в группах пациентов, подверженных хроническим заболеваниям.

В связи с этим, есть необходимость изучения и поиска надежных прогностических показателей тяжести течения заболевания [7].

Выбор наиболее информативных показателей, обеспечивающих прогноз возможного исхода или тяжелого течения заболевания у пациентов с COVID-19, необходим уже на раннем этапе для определения эффективной тактики лечения [8]. Наиболее ранними предикторами ухудшения состояния больных при COVID-19 являются повы-

шенные значения интерлейкина-6 (IL-6), IL-10, С-реактивного белка, прокальцитонина и других показателей врожденной иммунной системы [9, 10, 34].

Также значимыми прогностическими факторами тяжелой формы COVID-19, определяющими ответ иммунной системы и ход развития заболевания, являются лейкоцитоз, нейтрофилез, лимфопения, увеличение показателя нейтрофильно-лейкоцитарного индекса (НЛИ) [14, 18].

Лимфопению некоторые исследователи связывают с прямым цитопатическим действием вируса SARS-CoV-2 на все субпопуляции клеток врожденной и адаптивной иммунной системы посредством взаимодействия со специфическими белками и рецепторами: дипептидилпептидазой-4 (CD26), индуктором металлопротеиназы внеклеточного матрикса (CD147), циклофилинами А и В, сквенджером рецептора типа В1 (CD36) [11, 35], в частности инфицированием Т-клеток и индукцией внутриклеточных механизмов апоптоза, которые коррелируют с тяжестью заболевания [12, 13]. Среди клеточных субпопуляций в периферической крови отмечается значительное снижение количества клеток как врожденной иммунной системы – макрофагов, дендритных клеток, лимфоидных клеток, нейтрофилов, естественных натуральных киллеров NK-клеток (CD3⁺CD16/56⁺), Т-NK-клеток (CD3⁺CD16/56⁺), так и адаптивной иммунной системы – общего количества Т-лимфоцитов CD3⁺, CD3⁺CD4⁺Т-хелперов, CD3⁺CD8⁺Т-цитотоксических клеток (Т-ЦТК), NK-клеток, В-лимфоцитов [15, 16, 19, 20], что может быть обусловлено их гиперактивацией с последующей клеточной гибелью или ингибированием функции и временным нарушением их дифференцировки в костном мозге [24].

NK-клетки, являясь важным звеном ответных реакций, направленных на ликвидацию пораженных вирусом клеток, обладают множеством различных механизмов их уничтожения. Пациенты с выявленным дефицитом NK-клеток предрасположены к особенно тяжелым рецидивирующим вирусным инфекциям [17]. Инфекция SARS-CoV-2 влияет на противовирусные эффекторные функции NK-клеток, на взаимодействие между NK-клетками и другими клетками врожденного иммунитета, на их миграцию из периферической крови в очаги воспаления [22, 23, 33]. Было высказано предположение, что высокие концентрации IL-6 в периферической крови могут способствовать нарушению эффекторных функций циркулирующих NK-клеток [21].

У пациентов с COVID-19 отмечается снижение содержания CD19⁺В-лимфоцитов в периферической крови. Это снижение было особенно

заметно у тяжелых пациентов по сравнению с пациентами с легкой и средней степенью тяжести заболевания [15, 19, 25, 26].

Одним из тяжелых проявлений COVID-19 является поражение легких, в ходе которого развивается диффузное альвеолярное повреждение с одновременным тяжелым поражением сосудистого русла, приводящее к нарастанию провоспалительных цитокинов с развитием цитокинового шторма (ЦШ), что в свою очередь часто приводит к развитию острого респираторного дистресс-синдрома и полиорганной недостаточности с летальным исходом [20, 27, 28]. Отличительной чертой синдрома ЦШ является неконтролируемый иммунный ответ, включающий постоянную активацию клеточного звена иммунитета в условиях ограниченного количества эффекторных типов клеток иммунной системы в начале заболевания. В ряде исследований были определены наиболее важные показатели прогноза тяжести течения (с развитием ЦШ), такие как общее количество лейкоцитов, нейтрофилов, субпопуляции лимфоцитов – CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, NK-клеток в периферической крови [15, 29].

Одной из задач настоящего исследования было определение наиболее информативных показателей общеклинического анализа крови и основных субпопуляций лимфоцитов у пациентов с COVID-19, позволяющих помочь в интерпретации степеней тяжести заболевания и развития ЦШ наряду с клиническими проявлениями и функциональными методами диагностики.

Цель – выявить у больных COVID-19 на ранних этапах заболевания наиболее значимые показатели клеточного звена иммунитета, которые могут использоваться в качестве дополнительных критериев в оценке тяжести течения, прогнозе развития заболевания и возникновения ЦШ.

Материалы и методы

Нами проведено ретроспективное когортное исследование периферической крови у 65 больных, из которых было 57 мужчин и 8 женщин, возраст пациентов варьировал от 32 до 82 лет, средний возраст составил 48,6 года (группа «заболевшие», далее – группа 3). Выполнен одномоментный анализ иммунологических исследований у больных с различной степенью тяжести течения COVID-19, поступавших на лечение в инфекционный стационар ФГБУ «ГВКГ им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России (далее – госпиталь) с марта 2020 года по февраль 2021 года. Общими критериями включения больных в исследование являлись: наличие у пациента диагноза «COVID-19», подтвержденного положительным результатом лабораторного исследования на наличие РНК SARS-CoV-2 методом полимераз-

ной цепной реакции, возраст старше 18 лет, добровольное информированное согласие больного. Диагноз и тяжесть заболевания устанавливали в соответствии с клиническими показателями и критериями временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 6-9».

В соответствии с клиническими проявлениями группа 3 распределена на 3 группы по степени тяжести течения заболевания: легкая степень (I) – 15 пациентов, средняя степень (II) – 40 пациентов и тяжелая степень (III) – 10 пациентов.

Нами также были сформированы 2 группы пациентов по следующим критериям: первая группа (больные с ЦШ) включала в себя 10 мужчин, средний возраст 45,1 года, с наличием клинических проявлений, характерных для этого осложнения и пороговым значением интерлейкина-6 (IL-6) более 100 пг/мл; вторая группа (больные без ЦШ) состояла из 55 человек, из которых было 47 мужчин и 8 женщин, средний возраст 49,6 года, с уровнем IL-6 менее 100 пг/мл. Данное деление основывалось на опытных исследованиях [1, 2, 3], что ЦШ является крайним проявлением клинического течения COVID-19 с дальнейшим развитием такого осложнения, как ОРДС [4, 5], при пороговом значении показателя IL-6 равного 100 пг/мл и ранее проведенных нами исследованиях по тяжести течения заболевания и исходу у этих пациентов.

Контрольная группа (далее – группа К) в количестве 17 человек, из которых было 11 мужчин и 6 женщин со средним возрастом 31,6 года, была отобрана из условно здоровых добровольцев без клинических признаков острых респираторных вирусных инфекций. Исследования биоматериала группы К проводились в период с октября по ноябрь 2018 года.

Сбор биоматериала осуществлялся в соответствии с разработанной нами инструкцией по проведению преаналитического этапа [36]. Всем пациентам проводилось исследование венозной крови, отобранной в вакуумные пробирки с антикоагулянтом ЭДТА-К2, с определением уровня лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов на автоматическом гематологическом анализаторе XN 1000 компании Sysmex (Япония). Нами в работу были взяты следующие показатели: общее количество лейкоцитов, абсолютные значения нейтрофилов и лимфоцитов, рассчитывался НЛИ.

После проведения клинического анализа крови 65 образцов были подготовлены к цитометрическому анализу с использованием проточной цитофлюориметрии на анализаторе серии Cytomics™ FC 500 компании Beckman Coulter (США) по стандартизированной стратегии гей-

тирования. Использовались для многопараметрического анализа моноклональные антитела CD45-ECD, CD3-FITC, CD4-PC7, CD8-PE, CD19-PC-5, CD16⁺56-PE компании Beckman Coulter (США). Биологические образцы инкубировали с раствором Optilyse C для проведения лизиса эритроцитов и фиксации состояния лейкоцитов в соответствии с инструкцией той же компании. Рассчитывали лейкоцитарный-Т-лимфоцитарный индекс (ЛТИ), определяли по отношению абсолютного количества лейкоцитов к CD3⁺Т-лимфоцитам, иммунорегуляторный индекс (ИРИ) по соотношению клеток с фенотипом CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺.

Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрических методов анализа. Сравнительный анализ между группами выполняли с использованием рангового непараметрического метода U-критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался < 0,05. Все полученные результаты лабораторных исследований внесены в электронные таблицы в программе Microsoft Excel для последующего экспорта данных и их статистической обработки в программе IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM, США).

Результаты

Изучено исходное состояние иммунной системы при поступлении в стационар у больных COVID-19 в сравнении с группой К пациентов, результаты представлены в таблице 1.

Исследование клеточного звена иммунитета у пациентов с COVID-19 выявило ряд показателей, достоверно отличающихся по U-критерию Манна–Уитни от пациентов группы К, за исключением некоторых. Так, общее количество лейкоцитов со средним значением и стандартным отклонением, равным $7,2 \pm 4,7 \times 10^9/\text{л}$, в группе 3 достоверно не отличалось ($p = 0,093$) от группы К с показателем $7,16 \pm 1,32 \times 10^9/\text{л}$. В показателях абсолютного числа нейтрофилов также не обнаружено достоверных отличий ($p = 0,904$) между группами 3 и К, средние значения составили $5,06 \pm 3,58 \times 10^9/\text{л}$ и $3,94 \pm 1,0 \times 10^9/\text{л}$ соответственно.

Напротив, абсолютное количество лимфоцитов периферической крови у группы 3 (среднее значение $1,52 \pm 0,7 \times 10^9/\text{л}$) было снижено почти в 2 раза по сравнению с лимфоцитами группы К, где среднее значение равнялось $2,79 \pm 0,59 \times 10^9/\text{л}$, с достоверностью $p < 0,0001$. Однако показатель абсолютного количества лимфоцитов находился в референсном интервале, несмотря на тенденцию к уменьшению.

НЛИ со средним значением $4,66 \pm 5,4$ в группе 3 было увеличено в 2 раза в сравнении с груп-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ

TABLE 1. INDICATORS OF THE SUBPOPULATION COMPOSITION OF BLOOD LEUKOCYTES IN COVID-19 AND CONTROL GROUP PATIENTS

| № п/п No. n/a | Показатель, референсные значения Indicator, reference values | Среднее значение, стандартное отклонение (SD), минимум–максимум Average value, standard deviation (SD), minimum-maximum | | Достоверность, р Reliability, p |
|------------------------|---|--|---|---------------------------------------|
| | | Контрольная группа (n = 17) The control group (n = 17) | Больные COVID-19 (n = 65) COVID-19 patients (n = 65) | |
| 1 | Кол-во лейкоцитов, × 10 ⁹ /л (4-9) White blood cell count, × 10 ⁹ /L (4-9) | 7,16±1,32 (5,1-9,3) | 7,2±4,7 (2,1-25,8) | p = 0,093 |
| 2 | Кол-во нейтрофилов, × 10 ⁹ /л (1,8-7,7) Number of neutrophils, × 10 ⁹ /L (1.8-7.7) | 3,94±1,00 (2,18-5,83) | 5,06±3,58 (0,87-24,31) | p = 0,904 |
| 3 | Кол-во лимфоцитов, × 10 ⁹ /л (1,2-4,0) Number of lymphocytes, × 10 ⁹ /L (1.2-4.0) | 2,79±0,59 (1,19-3,46) | 1,52±0,70 (0,43-3,28) | p < 0,0001 |
| 4 | НЛИ (1,76-3,92) Neutrophilic leukocyte index (1.76-3.92) | 1,47±0,53 (0,65-3,15) | 4,66±5,40 (0,46-29,44) | p < 0,0001 |
| 5 | CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ – истинные натуральные киллеры (НК-клетки), × 10 ⁹ /л (0,123-0,369) CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ – true natural killers (NK cells), × 10 ⁹ /L (0.123-0.369) | 0,280±0,135 (0,079-0,539) | 0,190±0,155 (0,024-0,783) | p = 0,015 |
| 6 | CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ (Т-киллеры) – Т-НК-клетки, × 10 ⁹ /л (0,07-0,165) CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ (T killers) – T-NK-cells, × 10 ⁹ /L (0.07-0.165) | 0,053±0,034 (0,013-0,121) | 0,062±0,069 (0,006-0,507) | p = 0,977 |
| 7 | CD3 ⁺ – Т-лимфоциты, × 10 ⁹ /л (0,946-2,079) CD3 ⁺ – T lymphocytes, × 10 ⁹ /L (0.946-2.079) | 2,06±0,42 (0,905-2,541) | 1,070±0,524 (0,284-2,487) | p < 0,0001 |
| 8 | ЛТИ (4-7) Leukocyte-T lymphocyte index (4-7) | 3,55±0,74 (2,5-5,7) | 9,16±9,11 (2,16-53,97) | p < 0,0001 |
| 9 | CD3 ⁺ CD4 ⁺ – Т-лимфоциты (хелперы/индукторы), × 10 ⁹ /л (0,576-1,336) CD3 ⁺ CD4 ⁺ – T lymphocytes (helpers/inductors), × 10 ⁹ /L (0.576-1.336) | 1,281±0,393 (0,530-1,976) | 0,625±0,351 (0,073-1,638) | p < 0,0001 |
| 10 | CD3 ⁺ CD8 ⁺ – Т-лимфоциты (Т-ЦТЛ) × 10 ⁹ /л (0,372-0,974) CD3 ⁺ CD8 ⁺ – T lymphocytes (T-CTL) × 10 ⁹ /L (0.372-0.974) | 0,698±0,221 (0,312-1,359) | 0,397±0,231 (0,058-0,965) | p < 0,0001 |
| 11 | ИРИ CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ (1,5-2,1) Immunoregulatory index CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ (1.5-2.1) | 1,92±0,58 (0,62-2,81) | 1,87±0,92 (0,20-4,84) | p = 0,236 |
| 12 | CD19 ⁺ – В-лимфоциты, × 10 ⁹ /л (0,111-0,376) CD19 ⁺ – B lymphocytes, × 10 ⁹ /L (0.111-0.376) | 0,261±0,116 (0,131-0,491) | 0,181±0,133 (0,002-0,829) | p = 0,006 |

пой К, где среднее значение НЛИ составляло $1,47 \pm 0,53$ ($p < 0,0001$).

При сравнении $CD3^+CD16/56^+$ истинных натуральных киллеров (НК-клетки) в группе 3 отмечалось достоверное снижение среднего значения показателя до $0,119 \pm 0,155 \times 10^9/л$, тогда как в группе К данный показатель равнялся $0,286 \pm 0,135 \times 10^9/л$ ($p < 0,0001$). Дефицит НК-клеток в группе 3, возможно, указывает на более высокую тропность вируса SARS-CoV-2 к этой группе клеток на ранних этапах инфицирования.

В отличие от НК-клеток, при сравнении средних значений Т-НК-клеток в группе 3 и в группе К достоверных отличий не обнаружено, $p = 0,977$.

С достоверностью $p < 0,0001$ общее количество $CD3^+$ в группе 3 (среднее значение $1,07 \pm 0,524 \times 10^9/л$) снижено вдвое по сравнению с показателем группы К (среднее значение $2,06 \pm 0,42 \times 10^9/л$).

Также в группе 3 отмечалось достоверное снижение ($p < 0,0001$) показателя $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов (хелперы/индукторы), среднее значение которого составило $0,625 \pm 0,351 \times 10^9/л$, тогда как в К показатель равнялся $1,281 \pm 0,351 \times 10^9/л$.

Кроме того, с достоверностью $p < 0,0001$ снижен показатель $CD3^+CD8^+$ Т-ЦТЛ в группе 3 по сравнению с К, средние значения составили $0,397 \pm 0,231 \times 10^9/л$ и $0,698 \pm 0,221 \times 10^9/л$ соответственно. Расчет ИРИ при сравнении К и 3 равно $1,92 \pm 0,58$ и $1,87 \pm 0,92$ оказался недостоверным ($p = 0,236$).

Исследование наивных В-лимфоцитов, экспрессируемых молекулой $CD19^+$, показало снижение среднего значения до $0,181 \pm 0,133 \times 10^9/л$ в группе 3 по сравнению с К, где показатель был равен $0,261 \pm 0,116 \times 10^9/л$ ($p = 0,006$).

ЛТИ со средним значением $9,16 \pm 9,11$ у заболевших COVID-19 был достоверно выше в сравнении с группой К, где он равнялся $3,55 \pm 0,74$ ($p < 0,0001$). Повышение данного показателя может указывать на активацию иммунной системы у группы 3.

Подводя итог, можно отметить, что в группе 3 абсолютные показатели клеточного звена иммунитета не имели сильных сдвигов, но отмечалась тенденция к их снижению в рамках референсного интервала, и данные показатели достоверно отличались от группы К. Такие показатели, как НЛИ и ЛТИ, имели выраженные сдвиги в сторону повышения, что свидетельствует в одном случае о специфическом ответе иммунной системы на появление SARS-CoV-2, а во втором – о развитии системного вторичного иммунодефицитного состояния уже на начальном этапе взаимодействия SARS-CoV-2 с иммунной системой.

Анализ результатов показателей лейкоцитов крови, основных субпопуляций лимфоцитов у

пациентов COVID-19 с различными степенями тяжести течения заболевания в сравнении с группой К, представлен в таблице 2.

При сравнении общего количества лейкоцитов группы К и группы пациентов I с легкой степенью течения заболевания, где средние значения составляли $7,16 \pm 1,32 \times 10^9/л$ и $6,44 \pm 1,32 \times 10^9/л$ соответственно, отмечалось достоверное снижение показателя в группе I ($p = 0,013$). Также достоверно был снижен ($p < 0,0001$) показатель абсолютного числа лимфоцитов в группе I, среднее значение которого равнялось $1,88 \pm 0,68 \times 10^9/л$, по сравнению с данным показателем в группе К, где среднее значение было $2,79 \pm 0,59 \times 10^9/л$. Достоверных отличий между средними значениями абсолютного количества нейтрофилов и НЛИ между группами К и I выявлено не было ($p = 0,089$ и $p = 0,076$). При сравнении показателей субпопуляций, отвечающих за врожденный клеточный иммунный ответ – НК-клеток и Т-НК-клеток, отмечена тенденция к их увеличению в группе I, однако достоверных отличий получено не было ($p = 0,882$, $p = 0,105$ соответственно). В группе I отмечалось достоверное ($p < 0,0001$) снижение абсолютного количества общих Т-лимфоцитов с результатами $1,29 \pm 0,47 \times 10^9/л$ в сравнении с группой К, где среднее значение составляло $2,06 \pm 0,42 \times 10^9/л$. ЛТИ в группе I был достоверно ($p = 0,0007$) выше, чем в группе К, и составлял $5,61 \pm 3,65 \times 10^9/л$ и $3,55 \pm 0,74$ соответственно. При сравнении средних значений Т-хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+$ отмечалось достоверное ($p < 0,0001$) значительное снижение этого показателя в группе I $0,743 \pm 0,291 \times 10^9/л$ в сравнении с группой К, где количество Т-хелперов составляло $1,281 \pm 0,393 \times 10^9/л$. Также в опытной группе I отмечалось достоверное ($p = 0,01$) снижение количества Т-ЦТЛ с фенотипом $CD3^+CD8^+$ до показателя $0,478 \pm 0,233 \times 10^9/л$, тогда как в группе К абсолютное количество Т-ЦТЛ было равным $0,698 \pm 0,22 \times 10^9/л$. У ИРИ в группах сравнения достоверность не определена ($p = 0,370$).

Анализ В-клеточного звена адаптивной иммунной системы выявил относительную тенденцию к снижению количества наивных В-лимфоцитов в опытной группе I в сравнении с К, но без достоверных отличий ($p = 0,246$).

При анализе данных субпопуляционного состава лейкоцитов крови было отмечено, что в группе пациентов I в сравнении с группой пациентов II была отмечена тенденция к незначительному увеличению количества нейтрофилов до уровня $4,5 \pm 3 \times 10^9/л$. Абсолютное количество лимфоцитов в группе больных II имело дальнейшую тенденцию к снижению в сравнении с этим показателем в группе I до уровня $1,54 \pm 0,69 \times 10^9/л$. Как следствие, выявлена дальнейшая тенденция

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 С РАЗЛИЧНЫМИ СТЕПЕНЯМИ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ В СРАВНЕНИИ С КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППОЙ

TABLE 2. INDICATORS OF THE SUBPOPULATION COMPOSITION OF BLOOD LEUKOCYTES IN COVID-19 PATIENTS WITH VARYING DEGREES OF SEVERITY OF DISEASE COMPARED WITH THE CONTROL GROUP

| № п/п No. n/a | Показатель, референсные значения Indicator, reference values | Контрольная группа (К) Control group (C) n = 17 | Легкая степень (I) Mild degree (I) n = 15 | Средняя степень (II) Moderate degree (II) n = 40 | Тяжелая степень (III) Severe degree (III) n = 10 | Досто- верность, p Reliability, p |
|---------------------|---|--|---|--|--|--|
| | | Среднее значение, стандартное отклонение (SD), минимум–максимум The average value, standard deviation (SD), minimum-maximum | | | | |
| 1 | Кол-во лейкоцитов, × 10⁹/л (4-9) White blood cell count, × 10 ⁹ /L (4-9) | 7,16±1,32 (5,1-9,3) | 6,44±14,30 (3,9-17,7) | 6,67±3,19 (2,1-16,8) | 10,46±6,51 (4,8-25,8) | p = 0,013 p = 0,712* p = 0,032** |
| 2 | Кол-во нейтрофилов, × 10⁹/л (1,8-7,7) Number of neutrophils, × 10 ⁹ /L (1.8-7.7) | 3,94±1,00 (2,18-5,83) | 3,87±3,08 (1,34-14,38) | 4,5±3,0 (0,87-14,68) | 9,12±6,28 (3,88-24,31) | p = 0,089 p = 0,473* p = 0,002** |
| 3 | Кол-во лимфоцитов, × 10⁹/л (1,2-4,0) Number of lymphocytes, × 10 ⁹ /L (1.2-4.0) | 2,79±0,59 (1,19-3,46) | 1,88±0,68 (0,58-2,90) | 1,54±0,69 (0,43-3,28) | 0,883±0,333 (0,51-1,52) | p < 0,0001 p = 0,112* p = 0,004** |
| 4 | НЛИ (1,76-3,92) Neutrophilic leukocyte index (1.76-3.92) | 1,47±0,53 (0,65-3,15) | 2,49±2,24 (0,46-8,32) | 3,98±4,93 (0,46-29,44) | 10,62±6,70 (4,63-27,76) | p = 0,076 p = 0,174* p < 0,0001** |
| 5 | CD3⁺CD16/56⁺ – истинные натуральные киллеры (NK-клетки), × 10⁹/л (0,123-0,369) CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ – true natural killers (NK cells), × 10 ⁹ /L (0.123-0.369) | 0,280±0,135 (0,079-0,539) | 0,317±0,215 (0,035-0,783) | 0,181±0,113 (0,031-0,590) | 0,088±0,071 (0,024-0,242) | p = 0,882 p = 0,014* p = 0,006** |
| 6 | CD3⁺CD16/56⁺ (Т-киллеры) – Т-НК-клетки, × 10⁹/л (0,07-0,165) CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ (T killers) – T-NK-cells, × 10 ⁹ /L (0.07-0.165) | 0,053±0,034 (0,013-0,121) | 0,105±0,122 (0,022-0,507) | 0,051±0,031 (0,006-0,144) | 0,039±0,049 (0,010-0,178) | p = 0,105 p = 0,07* p = 0,034** |
| 7 | CD3⁺ – Т-лимфоциты, × 10⁹/л (0,946-2,079) CD3 ⁺ – T lymphocytes, × 10 ⁹ /L (0.946-2.079) | 2,06±0,42 (0,905-2,541) | 1,29±0,47 (0,458-1,914) | 1,10±0,52 (0,284-2,487) | 0,584±0,249 (0,324-1,065) | p < 0,0001 p = 0,241* p = 0,003** |
| 8 | ЛТИ (4-7) Leukocyte-T lymphocyte index (4-7) | 3,55±0,74 (2,5-5,7) | 5,61±3,65 (2,6-16,9) | 7,88±7,41 (2,2-45,3) | 19,61±13,48 (8,5-54,0) | p = 0,0007 p = 0,345* p < 0,0001** |

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

| № п/п No. n/a | Показатель, референсные значения Indicator, reference values | Контрольная группа (К) Control group (C) n = 17 | Легкая степень (I) Mild degree (I) n = 15 | Средняя степень (II) Moderate degree (II) n = 40 | Тяжелая степень (III) Severe degree (III) n = 10 | Досто- верность, p Reliability, p |
|------------------------|---|--|---|--|--|---|
| | | Среднее значение, стандартное отклонение (SD), минимум–максимум The average value, standard deviation (SD), minimum-maximum | | | | |
| 9 | CD3⁺CD4⁺ – Т-лимфоциты (хелперы/ индукторы), × 10⁹/л (0,576-1,336) CD3 ⁺ CD4 ⁺ – T lymphocytes (helpers/inductors), × 10 ⁹ /L (0.576-1.336) | 1,281±0,393 (0,530-1,976) | 0,743±0,291 (0,296-1,302) | 0,654±0,368 (0,073-1,638) | 0,330±0,187 (0,095-0,642) | p < 0,0001 p = 0,385* p = 0,007** |
| 10 | CD3⁺CD8⁺ –Т-лимфоциты (Т-ЦТЛ) × 10⁹/л (0,372-0,974) CD3 ⁺ CD8 ⁺ – T lymphocytes (T-CTL) × 10 ⁹ /L (0.372-0.974) | 0,698±0,221 (0,312-1,359) | 0,478±0,233 (0,099-0,900) | 0,408±0,235 (0,058-0,965) | 0,235±0,123 (0,094-0,485) | p = 0,01 p = 0,257* p = 0,025** |
| 11 | ИРИ CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ (1,5-2,1) Immunoregulatory index CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ (1.5-2.1) | 1,92±0,58 (0,62-2,81) | 1,77±0,75 (0,92-3,00) | 1,87±1,03 (0,26-4,84) | 1,97±1,10 (0,2-4,7) | p = 0,370 p = 0,835* p = 0,971** |
| 12 | CD19⁺ – В-лимфоциты, × 10⁹/л (0,111-0,376) CD19 ⁺ – B lymphocytes, × 10 ⁹ /L (0.111-0.376) | 0,261±0,116 (0,131-0,491) | 0,213±0,117 (0,066-0,398) | 0,179±0,143 (0,028-0,829) | 0,144±0,113 (0,002-0,319) | p = 0,246 p = 0,219* p = 0,465** |

Примечание. U-критерий Манна–Уитни для выявления достоверности показателей между контрольной группой и легкой степенью тяжести течения заболевания; * – U-критерий Манна–Уитни для выявления достоверности показателей между легкой и средней степенью тяжести течения заболевания; ** – U-критерий Манна–Уитни для выявления достоверности показателей между средней и тяжелой степенью тяжести течения заболевания.

Note. Mann–Whitney U test for identifying the reliability of indicators between the control group and the mild severity of the disease; *, Mann–Whitney U test for identifying the reliability of indicators between mild and moderate severity of the disease; **, Mann–Whitney U test for identifying the reliability of indicators between moderate and severe severity of the disease.

к повышению НЛИ до уровня $3,98 \pm 4,93$ в группе II в сравнении с группой I, по всей видимости, за счет более выраженного падения количества лимфоцитов и относительно невысокого повышения количества нейтрофилов. Анализ клеток врожденной иммунной системы показывает достоверное ($p = 0,014$) снижение НК-лимфоцитов до уровня $0,181 \pm 0,113 \times 10^9/\text{л}$ в группе со средней тяжестью заболевания, против $0,317 \pm 0,215$ в группе I и $0,280 \pm 0,135 \times 10^9/\text{л}$ в группе K. Была отмечена тенденция к выраженному снижению Т-НК-клеток $0,51 \pm 0,031 \times 10^9/\text{л}$ в группе II, в сравнении с этим показателем $0,105 \pm 0,122 \times 10^9/\text{л}$ в группе I. Сравнительный анализ основной субпопуляции лимфоцитов адаптивной иммунной

системы – общих Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺ показал продолжающуюся тенденцию к снижению количества этих клеток до уровня $1,1 \pm 0,52 \times 10^9/\text{л}$ в группе II в сравнении с группой I – $1,29 \pm 0,47 \times 10^9/\text{л}$ без достоверности ($p = 0,241$). Схожая тенденция в динамике в группе II была отмечена по уровню ЛТИ, который продолжал увеличиваться до уровня $7,88 \pm 7,41$ ($p = 0,345$), в сравнении с группой I, характеризующая нарастание иммунодефицитного состояния у пациентов с более тяжелым течением заболевания. Аналогично отмечается тенденция к снижению количества лимфоцитов адаптивной иммунной системы. Так, количество субпопуляций Т-хелперов и Т-ЦТЛ продолжило снижение

в группе II в сравнении с группой I до уровней $0,654 \pm 0,368 \times 10^9/\text{л}$ и $0,743 \pm 0,291 \times 10^9/\text{л}$ соответственно ($p = 0,385$ и $p = 0,257$). ИРИ со значением в группе II $1,87 \pm 1,03$ в сравнении с группой I – $1,77 \pm 0,75$ также не имело достоверных отличий ($p = 0,835$).

По мере прогрессирования тяжести заболевания отмечается тенденция закономерного снижения количества наивных В-лимфоцитов. Так, в группе I данный показатель снизился до уровня $0,213 \pm 0,177 \times 10^9/\text{л}$, а в группе II – до $0,179 \pm 0,143 \times 10^9/\text{л}$. Однако достоверных отличий не получено ($p = 0,219$).

Достоверно высокими в группе пациентов III по сравнению с группой II были такие показатели, как общее количество лейкоцитов (средние значения $10,46 \pm 6,51 \times 10^9/\text{л}$ и $6,67 \pm 3,19 \times 10^9/\text{л}$ соответственно, $p = 0,032$), абсолютное количество нейтрофилов (средние значения $9,12 \pm 6,28 \times 10^9/\text{л}$ в группе III и $4,5 \pm 3,0 \times 10^9/\text{л}$ в группе II ($p = 0,002$), ЛТИ ($19,61 \pm 13,48$ в группе III и $7,88 \pm 7,41$ в группе II ($p < 0,0001$), отражающие развитие воспалительного компонента, возможно, за счет присоединения вторичной инфекции и ответа иммунной системы в виде развития выраженного вторичного иммунодефицитного состояния. В группе с тяжелым течением отмечается дальнейшее достоверное ($p < 0,0001$) усугубление НЛИ до значения $10,62 \pm 6,7$, в сравнении с этим показателем в группе II – $3,98 \pm 4,93$ за счет повышения количества нейтрофилов и продолжающегося более выраженного снижения абсолютного количества лимфоцитов. Так, достоверно сниженным в группе III по сравнению с группой II было абсолютное количество лимфоцитов, где среднее значение этого показателя составляло $0,883 \pm 0,333 \times 10^9/\text{л}$ и $1,54 \pm 0,69 \times 10^9/\text{л}$ соответственно ($p < 0,0001$). Отмечается достоверное снижение лимфоцитов врожденной иммунной системы: NK-клеток до уровня $0,088 \pm 0,071 \times 10^9/\text{л}$ в группе III в сравнении с группой II $0,181 \pm 0,113 \times 10^9/\text{л}$ ($p = 0,006$), T-NK-клеток до уровня $0,039 \pm 0,049 \times 10^9/\text{л}$ в группе пациентов с тяжелым течением заболевания в сравнении с этим показателем в группе II $0,051 \pm 0,031 \times 10^9/\text{л}$ ($p = 0,034$). Изменения клеточного звена адаптивной иммунной системы в виде выраженного снижения общего количества T-лимфоцитов до уровня $0,584 \pm 0,2493 \times 10^9/\text{л}$ было достоверно ($p = 0,003$) в группе III в сравнении с группой II, где этот показатель составил $1,1 \pm 0,52 \times 10^9/\text{л}$. Аналогичная тенденция с достоверным ($p = 0,007$) значением характеризовала субпопуляцию T-лимфоцитов хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+$ в группе III, где показатель этой субпопуляции составил всего лишь $0,33 \pm 0,187 \times 10^9/\text{л}$, что в 2 раза мень-

ше, чем в группе II, где его значение было равным $0,654 \pm 0,368 \times 10^9/\text{л}$. Достоверные отличия ($p = 0,025$) были выявлены при исследовании T-ЦТЛ фенотипом $CD3^+CD8^+$, количество которых в группе III составляло всего $0,235 \pm 0,123 \times 10^9/\text{л}$, что значительно меньше нижнего референсного значения. Так, в сравнении с этим показателем в группе II $0,408 \pm 0,235 \times 10^9/\text{л}$ со значением $0,408 \pm 0,235 \times 10^9/\text{л}$. ИРИ в группе III, равный $1,97 \pm 1,10$, в сравнении с группой II – $1,87 \pm 1,03$, имел лишь тенденцию к незначительному росту в рамках референсного интервала ($p = 0,971$).

Исследование субпопуляционного состава лейкоцитов крови и клеточного звена иммунитета у пациентов COVID-19 без ЦШ и с ЦШ позволило проанализировать и разобраться в механизмах дезрегуляции в клеточном звене иммунной системы (табл. 3).

Количество лейкоцитов в группе пациентов с ЦШ было достоверно ($p = 0,001$) выше, чем в группе пациентов без ЦШ, и составило $11,58 \pm 3,28 \times 10^9/\text{л}$ и $6,76 \pm 3,9 \times 10^9/\text{л}$ соответственно. Было отмечено значительное достоверное ($p < 0,0001$) увеличение абсолютного количества нейтрофилов в группе пациентов с ЦШ до уровня $10,09 \pm 3,2 \times 10^9/\text{л}$, против $4,55 \pm 3,79 \times 10^9/\text{л}$ в группе больных COVID-19, но без ЦШ. Абсолютное значение лимфоцитов имело достоверное ($p = 0,03$) снижение этого показателя до уровня $0,953 \pm 0,427 \times 10^9/\text{л}$, что меньше нижнего референсного уровня в группе больных с ЦШ, в сравнении с этим же показателем $1,57 \pm 0,7 \times 10^9/\text{л}$ в группе пациентов без ЦШ. Отмечается трехкратное достоверное ($p = 0,001$) увеличение НЛИ до уровня $13,08 \pm 8,64$ у больных с ЦШ в сравнении с этим индексом у пациентов без ЦШ, где среднее значение этого показателя составляло всего $3,8 \pm 4,2$, находясь в пределах референсного интервала.

Анализ субпопуляционного состава абсолютного количества лимфоцитов, представляющих клеточное звено врожденной иммунной системы – NK-лимфоциты, показал достоверное ($p = 0,008$) двукратное снижение количества этой субпопуляции от нижнего референсного уровня у пациентов с ЦШ и составил $0,076 \pm 0,554 \times 10^9/\text{л}$, в сравнении с количеством NK-лимфоциты в группе пациентов без ЦШ со значением $0,21 \pm 0,156 \times 10^9/\text{л}$. Аналогичную достоверную ($p = 0,001$) динамику показала субпопуляция абсолютного количества T-NK-клеток, где у пациентов с ЦШ уровень этих клеток упал до $0,017 \pm 0,007 \times 10^9/\text{л}$, против $0,066 \pm 0,071 \times 10^9/\text{л}$ в группе пациентов без ЦШ.

Исследование клеточного звена адаптивной иммунной системы показало достовер-

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 БЕЗ И С ЦИТОКИНОВЫМ ШТОРМОМ

TABLE 3. INDICATORS OF THE SUBPOPULATION COMPOSITION OF BLOOD LEUKOCYTES IN COVID-19 PATIENTS WITHOUT AND WITH CYTOKINE STORM

| № п/п No. n/a | Показатель, референсные значения Indicator, reference values | Среднее значение, стандартное отклонение (SD), минимум–максимум Average value, standard deviation (SD), minimum-maximum | | Достоверность, р Reliability, p |
|------------------------|---|--|--|---------------------------------------|
| | | Больные без ЦШ Patients without CS (n = 55) | Больные с ЦШ Patients with CS (n = 10) | |
| 1 | Кол-во лейкоцитов, × 10 ⁹ /л (4-9) White blood cell count, × 10 ⁹ /L (4-9) | 6,76±3,90 (2,1-25,8) | 11,58±3,28 (8,0-15,7) | p = 0,001 |
| 2 | Кол-во нейтрофилов, × 10 ⁹ /л (1,8-7,7) Number of neutrophils, × 10 ⁹ /L (1.8-7.7) | 4,55±3,79 (0,87-24,31) | 10,09±3,20 (6,61-14,03) | p < 0,0001 |
| 3 | Кол-во лимфоцитов, × 10 ⁹ /л (1,2-4,0) Number of lymphocytes, × 10 ⁹ /L (1.2-4.0) | 1,57±0,70 (0,49-3,28) | 0,953±0,427 (0,43-1,52) | p = 0,03 |
| 4 | НЛИ (1,76-3,92) Neutrophilic leukocyte index (1.76-3.92) | 3,8±4,2 (0,46-27,76) | 13,08±8,64 (6,61-14,03) | p = 0,001 |
| 5 | CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ – истинные натуральные киллеры (НК-клетки), × 10 ⁹ /л (0,123-0,369) CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ – true natural killers (NK cells), × 10 ⁹ /L (0.123-0.369) | 0,210±0,156 (0,024-0,783) | 0,076±0,554 (0,034-0,178) | p = 0,008 |
| 6 | CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ (Т-киллеры) – Т-НК-клетки, × 10 ⁹ /л (0,070-0,165) CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ (T killers) – T-NK-cells, × 10 ⁹ /L (0.070-0.165) | 0,066±0,071 (0,006-0,507) | 0,017±0,007 (0,006-0,027) | p = 0,001 |
| 7 | CD3 ⁺ – Т-лимфоциты, × 10 ⁹ /л (0,946-2,079) CD3 ⁺ – T lymphocytes, × 10 ⁹ /L (0.946-2.079) | 1,110±0,524 (0,284-2,487) | 0,647±0,304 (0,294-1,065) | p = 0,03 |
| 8 | ЛТИ (4-7) Leukocyte-T lymphocyte index (4-7) | 7,830±7,523 (2,16-53,97) | 22,31±13,33 (8,45-45,29) | p < 0,0001 |
| 9 | CD3 ⁺ CD4 ⁺ – Т-лимфоциты (хелперы/индукторы), × 10 ⁹ /л (0,576-1,336) CD3 ⁺ CD4 ⁺ – T lymphocytes (helpers/inductors), × 10 ⁹ /L (0.576-1.336) | 0,651±0,351 (0,073-1,638) | 0,365±0,240 (0,095-0,642) | p = 0,048 |
| 10 | CD3 ⁺ CD8 ⁺ – Т-лимфоциты (Т-ЦТЛ) × 10 ⁹ /л (0,372-0,974) CD3 ⁺ CD8 ⁺ – T lymphocytes (T-CTL) × 10 ⁹ /L (0.372-0.974) | 0,411±0,234 (0,058-0,965) | 0,262±0,146 (0,094-0,485) | p = 0,128 |
| 11 | ИРИ CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ (1,5-2,1) Immunoregulatory index CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ (1.5-2.1) | 1,83±0,94 (0,26-4,84) | 1,63±0,77 (0,20-2,36) | p = 0,974 |
| 12 | CD19 ⁺ – В-лимфоциты, × 10 ⁹ /л (0,111-0,376) CD19 ⁺ – B lymphocytes, × 10 ⁹ /L (0.111-0.376) | 0,184±0,135 (0,026-0,829) | 0,158±0,114 (0,002-0,319) | p = 0,851 |

ное ($p = 0,03$) снижение общего количества Т-лимфоцитов до уровня $0,647 \pm 0,304 \times 10^9/\text{л}$ в группе пациентов с ЦШ, что было на 90% меньше этого показателя в группе больных без ЦШ, где количество Т-лимфоцитов составляло $1,11 \pm 0,524 \times 10^9/\text{л}$ и находилось на нижней границе референсного уровня. Оценка ЛТИ показала значительное достоверное ($p < 0,0001$) увеличение этого показателя в группе пациентов с ЦШ и составляла $22,31 \pm 13,33$ против $7,83 \pm 7,523$ у пациентов без ЦШ. Анализ Т-хелперной популяции с фенотипом $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ в группе пациентов с ЦШ выявил достоверное ($p = 0,048$) снижение количества этого типа лимфоцитов до уровня $0,365 \pm 0,24 \times 10^9/\text{л}$ против $0,651 \pm 0,351 \times 10^9/\text{л}$ у пациентов без ЦШ. Также была выявлена тенденция к значительному снижению Т-ЦТЛ у пациентов с ЦШ до уровня $0,262 \pm 0,146 \times 10^9/\text{л}$, что было значительно ниже, чем в группе пациентов с COVID-19, но без ЦШ, где этот показатель был на нижнем референсном уровне и составлял $0,411 \pm 0,234 \times 10^9/\text{л}$. Снижение лимфоцитов в Т-хелперном звене было более выраженным, чем у субпопуляции лимфоцитов, представленных Т-ЦТЛ. Значение ИРИ в группе с ЦШ имело тенденцию к снижению до $1,63 \pm 0,77$ в сравнении с группой без ЦШ $1,83 \pm 0,94$, но достоверностью не отличалось ($p = 0,974$).

При анализе В-клеточного звена лимфоцитов выявлена тенденция к снижению количества этой субпопуляции у пациентов с ЦШ до $0,158 \pm 0,114 \times 10^9/\text{л}$ в сравнении с группой больных COVID-19 без ЦШ, где этот показатель был равен $0,184 \pm 0,135 \times 10^9/\text{л}$, но статистической достоверности не получено ($p = 0,851$).

Таким образом, изменения в клеточном звене врожденной и адаптивной иммунной системы в группе сравнения больных COVID-19 без ЦШ и с ЦШ были информативными и характеризовались выраженными изменениями в виде снижения абсолютного количества лимфоцитов, НК-клеток и Т-НК-клеток общих Т-лимфоцитов и их Т-хелперной популяции, а НЛИ и ЛТИ, напротив, повышением.

Обсуждение

В нашем исследовании в группе 3 в клиническом анализе крови обращает на себя внимание то, что среднее значение общего числа лейкоцитов не отличается от такового группы К и не выходит за рамки референсного интервала, однако с развитием клинически тяжелого течения заболевания достоверно проявляется лейкоцитозом в группе сравнения II и III ($p = 0,032$) и в группах без ЦШ и с ЦШ ($p = 0,001$).

Аналогичная картина наблюдается в отношении количества нейтрофилов. В группе 3 и

К данный показатель не имеет достоверных отличий, но отмечается достоверно выраженный нейтрофилез в группе III по сравнению с группой II ($p = 0,002$) и в группе без ЦШ по сравнению с группой с ЦШ ($p < 0,0001$).

В группах сравнения 3/К, II/III и без ЦШ/с ЦШ определяется достоверное повышение показателя НЛИ у пациентов с диагнозом «COVID-19», с тяжелым течением заболевания и у пациентов с ЦШ ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ и $p = 0,001$ соответственно). Выявленные на ранних этапах госпитализации изменения в виде лейкоцитоза, нейтрофилеза, увеличения НЛИ могут определять ход развития болезни и являться дополнительными прогностическими факторами тяжелой формы COVID-19, что и отмечалось у ряда исследователей [14, 18].

Проведенное нами исследование показало, что регистрируемая абсолютная лимфопения была статистически значимой $p < 0,0001$ у группы 3 в сравнении с группой К, и абсолютное количество лимфоцитов достоверно снижалось в зависимости от степени тяжести заболевания в группах сравнения К и I $p < 0,0001$, II и III $p = 0,004$ и в группах без ЦШ и с ЦШ $p = 0,03$.

Среди субпопуляций лимфоцитов в периферической крови отмечается достоверное снижение среднего значения абсолютного содержания Т-клеток CD3^+ у 3 по сравнению с К ($p < 0,0001$), и далее по мере прогрессирования клинических проявлений заболевания: в группах I и II – $p < 0,0001$, II и III – $p = 0,003$ и в группе без ЦШ и с ЦШ – $p = 0,03$. Среди Т-клеток, экспрессирующих CD3^+ , представлены Т-лимфоциты $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$, снижение которых может быть определяющим в патогенезе заболевания и обусловлено как прямым действием вируса SARS-CoV-2 [11, 35] и индукцией внутриклеточного апоптоза [12, 13], так и нарушением дифференцировки Т-клеток [24] в зависимости от степени тяжести заболевания [15, 16, 19, 20], что подтверждается в нашем исследовании. Достоверное снижение $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ определялось не только в группе 3 по сравнению с группой К ($p < 0,0001$), но и при сравнении показателя $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ при переходе от группы К к группе I ($p < 0,0001$) и от группы II к группе III ($p = 0,007$): $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ соответственно ($p = 0,01$ и $p = 0,025$). В группе сравнения пациентов без ЦШ и с ЦШ достоверная разница получена только для показателя $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ ($p = 0,048$). Многие авторы характерным признаком COVID-19 считают снижение именно абсолютного содержания $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ Т-клеток, изменение их внутренней субпопуляционной структуры [30, 31], что также прослеживается у нашей группы исследуемых.

Была выдвинута гипотеза авторами статьи, что SARS-CoV-2 вызывает снижение количества циркулирующих НК-клеток за счет угнетения их эффекторных функций, инициирует перераспределение этих лимфоцитов из периферической крови в легкие [23, 32], где во время острой фазы они потенциально могут способствовать усилению повреждения легочной ткани и гибели эпителиальных клеток [33], усугубляя ход заболевания [15, 29].

В нашем исследовании выявлено достоверное снижение среднего значения абсолютного содержания НК-клеток у пациентов с COVID-19 относительно группы К ($p = 0,015$). В зависимости от стадии течения заболевания у нашей группы исследуемых продолжает снижаться абсолютное количество НК-клеток с сохранением достоверной разницы между группами I и II – $p = 0,014$, II и III – $p = 0,006$ и в группе без ЦЩ и с ЦЩ – $p = 0,008$. Снижение количества НК-клеток в циркулирующей крови может рассматриваться как значимый лабораторный параметр для определения течения и исхода заболевания.

В нашем исследовании определены статистически значимые ($p = 0,006$) изменения показателей среднего значения абсолютного содержания зрелых наивных В-лимфоцитов CD19⁺ у пациентов с COVID-19 при сравнении с группой К, но показатель не выходил за пределы референсного интервала и составил $0,181 \pm 0,133 \times 10^9/\text{л}$. Дальнейших достоверных отличий при прогрес-

сировании тяжести клинических проявлений не выявлено. Возможно, причиной этого является значительная вариабельность показателей абсолютного содержания В-лимфоцитов у пациентов с COVID-19.

Заключение

Изменения количественных и функциональных показателей клеточного иммунитета при инфицировании SARS-CoV-2 определяются исходным типом индивидуального реагирования иммунной системы. У обследованных нами пациентов с COVID-19 при первичном обращении за медицинской помощью отмечается абсолютная лимфопения на фоне нейтрофилеза, что выражается в повышении значений НЛИ и ЛТИ. Данные индексы с достаточно высокой информативностью могут использоваться при прогнозировании рисков заболевания. Определение наиболее достоверных показателей клеточного звена иммунитета, таких как CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3-CD16⁺CD56⁺ – лимфоцитов, дополнительно к клиническому анализу крови может дать оценку особенностям иммунного реагирования организма на инфицирование SARS-CoV-2, помочь спрогнозировать тяжесть течения заболевания, а также принять решение для изменения тактики лечения при необходимости.

Список литературы / References

1. Давыдова Н.В., Путков С.Б., Решетняк Д.В., Казаков С.П. Исследование взаимосвязей и диагностической эффективности цитокинов в оценке степени тяжести больных COVID-19 // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 2. С. 379-394. [Davydova N.V., Putkov S.B., Reshetnyak D.V., Kazakov S.P. Studying interconnections of cytokines and their diagnostic effectiveness when assessing severity grade in COVID-19 patients. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2025, Vol. 27, no. 2, pp. 379-394. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-SIO-3067.
2. Кудряшов С.К., Канищев Ю.Н., Путков С.Б., Эсауленко Н.Б., Карпов В.О., Овчаренко В.П., Изгородин А.С., Жукова Э.Э., Сулова Л.А., Паршакова Е.В. Инструкция по проведению преаналитического этапа (порядок взятия, хранения и транспортировки) с биоматериалом для лабораторных исследований в центре клинической лабораторной диагностики ГВКГ им. Н.Н. Бурденко. М.: Эко-Пресс, 2016. 220 с. [Kudryashov S.K., Kanishchev Yu.N., Putkov S.B., Esaulenko N.B., Karpov V.O., Ovcharenko V.P., Izgorodin A.S., Zhukova E.E., Suslova L.A., Parshakova E.V. Instructions for conducting the preanalytical stage (procedure for taking, storing and transporting) biomaterial for laboratory research in the Center for Clinical Laboratory Diagnostics of the Main Military Clinical Hospital named after academician N.N. Burdenko]. Moscow: Eko-Press, 2016. 220 p.
3. Паценко М.Б., Зайцев А.А., Чернов С.А., Стец В.В., Кудряшов О.И., Давыдов Д.В., Чернецов В.А., Крюков Е.В. Практические подходы к лечению пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) // Военно-медицинский журнал, 2022. Т. 343, № 8. С. 20-27. [Patsenko M.B., Zaitsev A.A., Chernov S.A., Stets V.V., Kudryashov O.I., Davydov D.V., Chernetsov V.A., Kryukov E.V. Practical approaches to the treatment of patients with new coronavirus infection (COVID-19). *Voyenno-meditsinskiy zhurnal = Russian Military Medical Journal*, 2022, Vol. 343, no. 8, pp. 20-27. (In Russ.)
4. Путков С.Б., Давыдова Н.В., Троян В.Н., Казаков С.П. Исследование взаимосвязи маркеров воспаления с КТ-признаками патологических изменений легких у пациентов с COVID-19 // Медицинский вестник ГВКГ им. Н.Н. Бурденко, 2024. Т. 5, № 2. С. 22-31. [Putkov S.B., Davydova N.V., Troyan V.N., Kazakov S.P. Investigation of the relationship of inflammatory markers with CT sings of pathological lung changes in patients

with COVID-19. *Meditsinskiy vestnik GVKG im. N.N. Burdenko = Medical Bulletin of the Main Military Clinical Hospital named after N.N. Burdenko*, Vol. 5, no. 2, pp. 22-31. (In Russ.)

5. Путков С.Б., Давыдова Н.В., Казаков С.П. Исследование маркеров воспаления и их диагностической эффективности у больных COVID-19 // Медицинский алфавит, 2023. № 23. С. 11-17. [Putkov S.B., Davydova N.V., Kazakov S.P. Study of inflammatory markers and their diagnostic effectiveness in patients with COVID-19 patients. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet*, no. 23, pp. 11-17. (In Russ.)

6. Akbari H., Tabrizi R., Lankarani K.B., Aria H., Vakili S., Asadian F., Noroozi S., Keshavarz P., Faramarz S. The role of cytokine profile and lymphocyte subsets in the severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *Life Sci.*, 2020, Vol. 258, 118167. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118167

7. Assandri R., Buscarini E., Canetta C., Scartabellati A., Viganò G., Montanelli A. Laboratory biomarkers predicting COVID-19 severity in the emergency room. *Arch. Med. Res.*, 2020, Vol. 51, no. 6, pp. 598-599.

8. Chen J., Lau Y.F., Lamirande E.W., Paddock C.D., Bartlett J.H., Zaki S.R., Subbarao K. Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: CD4⁺ T cells are important in control of SARS-CoV infection. *J. Virol.*, 2010, Vol. 84, no. 3, pp. 1289-1301.

9. Chen Z., Wherry E.J. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 9, pp. 529-536.

10. COVID-19 epidemiological update – 6 November 2024. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update-edition-173>.

11. Drosten C., Seilmaier M., Corman V.M., Hartmann W., Scheible G., Sack S., Guggemos W., Kallies R., Muth D., Junglen S., Müller M.A., Haas W., Guberina H., Röhnisch T., Schmid-Wendtner M., Aldabbagh S., Dittmer U., Gold H., Graf P., Bonin F., Rambaut A., Wendtner C.M. Clinical features and virological analysis of a case of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Lancet Infect. Dis.*, 2013, Vol. 13, no. 9, pp. 745-751.

12. García L.F. Immune response, inflammation, and the clinical spectrum of COVID-19. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1441. doi: 10.3389/fimmu.2020.01441

13. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Antoniadou A., Antonakos N., Damoraki G., Gkavogianni T., Adami M.E., Katsaounou P., Ntaganou M., Kyriakopoulou M., Dimopoulos G., Koutsodimitropoulos I., Velissaris D., Koufargyris P., Karageorgos A., Katrini K., Lekakis V., Lupsé M., Kotsaki A., Renieris G., Theodoulou D., Panou V., Koukaki E., Koulouris N., Gogos C., Koutsoukou A. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*, 2020, Vol. 27, no. 6, pp. 992-1000.e3.

14. Golovkin A., Kalinina O., Bezrukikh V., Aquino A., Zaikova E., Karonova T., Melnik O., Vasilieva E., Kudryavtsev I. Imbalanced immune response of T-cell and B-cell subsets in patients with moderate and severe COVID-19. *Viruses*, 2021, Vol. 13, no. 10, 1966. doi: 10.3390/v13101966.

15. Gu J., Gong E., Zhang B., Zheng J., Gao Z., Zhong Y., Zou W., Zhan J., Wang S., Xie Z., Zhuang H., Wu B., Zhong H., Shao H., Fang W., Gao D., Pei F., Li X., He Z., Xu D., Shi X., Anderson V.M., Leong A.S. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 202, no. 3, pp. 415-424.

16. Hsieh W.C., Lai E.Y., Liu Y.T., Wang Y.F., Tzeng Y.S., Cui L., Lai Y.J., Huang H.C., Huang J.H., Ni H.C., Tsai D.Y., Liang J.J., Liao C.C., Lu Y.T., Jiang L., Liu M.T., Wang J.T., Chang S.Y., Chen C.Y., Tsai H.C., Chang Y.M., Wernig G., Li C.W., Lin K.I., Lin Y.L., Tsai H.K., Huang Y.T., Chen S.Y. NK cell receptor and ligand composition influences the clearance of SARS-CoV-2. *J. Clin. Invest.*, 2021, Vol. 131, no. 21, e146408. doi: 10.1172/JCI146408

17. Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021, Vol. 19, no. 3, pp. 141-154.

18. Izcovich A., Ragusa M.A., Tortosa F., Marzio M.A.L., Agnoletti C., Bengolea A., Ceirano A., Espinosa F., Saavedra E., Sanguine V., Tassara A., Cid C., Catalano H.N., Agarwal A., Foroutan F., Rada G. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. *PLoS One*, 2020, Vol. 15, no. 11, e0241955. doi: 10.1371/journal.pone.024195526.

19. Jiang Y., Xu J., Zhou C., Wu Z., Zhong S., Liu J., Luo W., Chen T., Qin Q., Deng P. Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2005, Vol. 171, no. 8, pp. 850-857.

20. Liao M., Liu Y., Yuan J., Wen Y., Xu G., Zhao J., Cheng L., Li J., Wang X., Wang F., Liu L., Amit I., Zhang S., Zhang Z. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients With COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 6, pp. 842-844.

21. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., Li W., Tong Q., Yi J., Zhao L., Xiong L., Guo C., Tian J., Luo J., Yao J., Pang R., Shen H., Peng C., Liu T., Zhang Q., Wu J., Xu L., Lu S., Wang B., Weng Z., Han C., Zhu H., Zhou R., Zhou H., Chen X., Ye P., Zhu B., Wang L., Zhou W., He S., He Y., Jie S., Wei P., Zhang J., Lu Y., Wang W., Zhang L., Li L., Zhou F., Wang J., Dittmer U., Lu M., Hu Y., Yang D., Zheng X. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*, 2020, Vol. 55, 102763. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102763.

22. National Research Project for SARS, Beijing Group. The involvement of natural killer cells in the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2004, Vol. 121, no. 4, pp. 507-511.

23. Orange J.S. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect.*, 2002, Vol. 4, no. 15, pp. 1545-1558.

24. Osman M.S., van Eeden C., Cohen Tervaert J.W. Fatal COVID-19 infections: Is NK cell dysfunction a link with autoimmune HLH? *Autoimmun. Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 7, 102561. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102561.
25. Putkov S., Davydova N., Kazakov S. Laboratory indicators of inflammation in the development of cytokine storm in patients with COVID-19. *Clin. Chim. Acta*, 2024, Vol. 558, 119179. doi: 10.1016/j.cca.2024.119179.
26. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., Tian D.S. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 71, no. 15, pp. 762-768.
27. Radzikowska U., Ding M., Tan G., Zhakparov D., Peng Y., Wawrzyniak P., Wang M., Li S., Morita H., Altunbulakli C., Reiger M., Neumann A.U., Lunjani N., Traidl-Hoffmann C., Nadeau K.C., O'Mahony L., Akdis C., Sokolowska M. Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. *Allergy*, 2020, Vol. 75, no. 11, pp. 2829-2845.
28. Shimizu M. Clinical Features of Cytokine Storm Syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2024, Vol. 1448, pp. 33-42.
29. Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 6, pp. 363-374.
30. Vabret N., Britton G.J., Gruber C., Hegde S., Kim J., Kuksin M., Levantovsky R., Malle L., Moreira A., Park M.D., Pia L., Risson E., Saffern M., Salomé B., Esai Selvan M., Spindler M.P., Tan J., van der Heide V., Gregory J.K., Alexandropoulos K., Bhardwaj N., Brown B.D., Greenbaum B., Gümüş Z.H., Homann D., Horowitz A., Kamphorst A.O., Curotto de Lafaille M.A., Mehandru S., Merad M., Samstein R.M.; Sinai Immunology Review Project. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity*, 2020, Vol. 52, no. 6, pp. 910-941.
31. Velavan T.P., Meyer C.G. Mild versus severe COVID-19: Laboratory markers. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 95, pp. 304-307.
32. Wang F., Hou H., Luo Y., Tang G., Wu S., Huang M., Liu W., Zhu Y., Lin Q., Mao L., Fang M., Zhang H., Sun Z. The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. *JCI Insight*, 2020, Vol. 5, no. 10, e137799. doi: 10.1172/jci.insight.137799.
33. Yang X., Yu Y., Xu J., Shu H., Xia J., Liu H., Wu Y., Zhang L., Yu Z., Fang M., Yu T., Wang Y., Pan S., Zou X., Yuan S., Shang Y. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.*, 2020, Vol. 8, no. 5, pp. 475-481.
34. Zhao S., Lin Q., Ran J., Musa S.S., Yang G., Wang W., Lou Y., Gao D., Yang L., He D., Wang M.H. Preliminary estimation of the basic reproduction number of novel coronavirus (2019-nCoV) in China, from 2019 to 2020: A data-driven analysis in the early phase of the outbreak. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 92, pp. 214-217.
35. Zheng H.Y., Zhang M., Yang C.X., Zhang N., Wang X.C., Yang X.P., Dong X.Q., Zheng Y.T. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 5, 541-543.
36. Zheng M., Gao Y., Wang G., Song G., Liu S., Sun D., Xu Y., Tian Z. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 5, pp. 533-535.

Авторы:

Путков С.Б. — врач клинической лабораторной диагностики, заведующий отделением клинических инфекционно-иммунологических исследований Центра клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко», Москва, Россия

Давыдова Н.В. — врач клинической лабораторной диагностики отделения клинических инфекционно-иммунологических исследований Центра клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко», Москва, Россия

Казakov С.П. — д.м.н., доцент, врач клинической лабораторной диагностики, начальник Центра клинической лабораторной диагностики — главный лаборант ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко»; профессор ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

Authors:

Putkov S.B., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Head, Department of Clinical Infectious and Immunological Research, Center for Clinical Laboratory Diagnostics, Main Military N. Burdenko Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Davydova N.V., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Department of Clinical Infectious and Immunological Research, Center for Clinical Laboratory Diagnostics, Main Military N. Burdenko Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Kazakov S.P., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Head, Clinical Laboratory Center, Main Military N. Burdenko Clinical Hospital; Professor, Federal Research and Clinical Center for Specialized Medical Care and Medical Technologies, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Поступила 31.05.2025
Отправлена на доработку 19.06.2025
Принята к печати 25.06.2025

Received 31.05.2025
Revision received 19.06.2025
Accepted 25.06.2025

СУБЪЕДИНИЧНАЯ ВАКЦИНА «ДЕЛЬТА-ВАК» ИНДУЦИРУЕТ СИЛЬНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРОТИВ SARS-CoV-2

Несмеянова В.С., Меркульева Ю.А., Исаева А.А., Волкова Н.В., Беленькая С.В., Боргоякова М.Б., Волосникова Е.А., Есина Т.И., Даниленко Е.Д., Зайковская А.В., Олькин С.Е., Пьянков О.В., Ильичев А.А., Щербаков Д.Н.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора,
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Пандемия COVID-19 сконцентрировала внимание исследователей всего мира на борьбе с этой инфекцией. Важнейшим подходом противодействия COVID-19 стала разработка профилактических вакцин на основе ряда платформ, включая ДНК- и РНК-вакцины, векторные и субъединичные вакцины. Одной из таких платформ стали субъединичные вакцины, которые привлекательны в первую очередь из-за непревзойденного профиля их безопасности. Однако безопасность данных вакцин часто сопряжена с невысокой эффективностью, поэтому зачастую необходимо применять адъюванты, а также использовать более сложные схемы иммунизации. В то же время важным достоинством субъединичных вакцин является масштабируемость и относительная простота производства, так как в процессе производства нет необходимости работать с живым вирусом или вирусными векторами. Целью работы была разработка кандидатной вакцины на основе рекомбинантного рецептор-связывающего домена (RBD) спайкового S-белка SARS-CoV-2 варианта Delta (B.1.617.2). В исследовании применялись иммунологические методы, методы генной инженерии и биотехнологии. В ходе работы на основе клеток млекопитающих CHO-K1 разработан продуцент рекомбинантного RBD. Для получения белка, отвечающего требованиям инъекционных препаратов, была разработана схема хроматографической очистки, включающая аффинную и ионообменную хроматографии. Предложен вариант субъединичной вакцины «Дельта-Вак» на основе полученного рекомбинантного белка. Иммуногенность кандидатной вакцины «Дельта-Вак» оценивали на модели лабораторных мышей BALB/c. Проводили двукратную иммунизацию животных дозой 50 мкг RBD в комплексе с Al(OH)₃ с двухнедельным интервалом. Показана способность кандидатной вакцины индуцировать

Адрес для переписки:

Несмеянова Валентина Сергеевна
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора
630559, Россия, Новосибирская обл., р. п. Кольцово.
Тел.: 8 (383) 363-47-10 (доб. 23-32), 363-47-14.
E-mail: nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru

Address for correspondence:

Valentina S. Nesmeyanova
State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”
Koltsovo, Novosibirsk Region
630559 Russian Federation
Phone: +7 (383) 363-47-10 (acc. 23-32), 363-47-14.
E-mail: nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru

Образец цитирования:

В.С. Несмеянова, Ю.А. Меркульева, А.А. Исаева,
Н.В. Волкова, С.В. Беленькая, М.Б. Боргоякова,
Е.А. Волосникова, Т.И. Есина, Е.Д. Даниленко,
А.В. Зайковская, С.Е. Олькин, О.В. Пьянков,
А.А. Ильичев, Д.Н. Щербаков «Субъединичная вакцина
“Дельта-Вак” индуцирует сильный гуморальный
иммунный ответ против SARS-CoV-2» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 1077-1086.
doi: 10.15789/1563-0625-DVS-2901

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

For citation:

V.S. Nesmeyanova, Yu.A. Merkulyeva, A.A. Isaeva,
N.V. Volkova, S.V. Belenkaya, M.B. Borgoyakova,
E.A. Volosnikova, T.I. Esina, E.D. Danilenko,
A.V. Zaikovskaya, S.E. Olkin, O.V. Pyankov, A.A. Ilichev,
D.N. Shcherbakov “Delta-Vac” subunit vaccine induces strong
humoral immune response against SARS-CoV-2”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025,
Vol. 27, no. 5, pp. 1077-1086.
doi: 10.15789/1563-0625-DVS-2901

© Nesmeyanova V.S. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-DVS-2901

выработку специфических IgG и нейтрализующих антител у мышей линии BALB/c. Специфические титры антител иммунизированных животных лежали в диапазоне от $1/10^5$ до $1/10^6$. При этом сыворотки крови обладали нейтрализующей активностью в отношении SARS-CoV-2 (вариант B.1.617.2 (Delta)) с титром до 1/2000. Разработанная вакцина «Дельта-Вак» обладает высокой иммуногенностью и индуцирует выработку нейтрализующих антител против гомологичного варианта Delta и гетерологичных вариантов Wuhan и Omicron SARS-CoV-2. Таким образом, «Дельта-Вак» может выступать в качестве кандидатной вакцины и служить прототипом для разработки субъединичных вакцин против COVID-19.

Ключевые слова: субъединичные вакцины, SARS-CoV-2, RBD, S-белок, иммуногенность, нейтрализующие антитела

“DELTA-VAC” SUBUNIT VACCINE INDUCES STRONG HUMORAL IMMUNE RESPONSE AGAINST SARS-CoV-2

Nesmeyanova V.S., Merkulyeva Yu.A., Isaeva A.A., Volkova N.V., Belenkaya S.V., Borgoyakova M.B., Volosnikova E.A., Esina T.I., Danilenko E.D., Zaikovskaya A.V., Olkin S.E., Pyankov O.V., Plichev A.A., Shcherbakov D.N.

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. The COVID-19 pandemic has focused the worldwide attention on the fight against this infection. Development of preventive vaccines based on different platforms, including DNA and RNA vaccines, genetic vectors and subunit vaccines A has been the key approach to combating COVID-19. The subunit vaccines were among these platforms, primarily, due to their unique safety profile. However, the safety of these vaccines is often associated with low efficiency. Hence, their application often requires usage of immune adjuvants, along with more complex immunization regimens. Meanwhile, an important advantage of subunit vaccines is their scalability and relative ease of production, since there is no need to work with live virus or viral vectors during the production process. The purpose of our work was to develop a candidate vaccine based on the recombinant receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike S-protein from the Delta variant (B.1.617.2). The study used immunological techniques employing methods of genetic engineering and biotechnology. In the course of this work, we have developed a producer of recombinant RBD based on the CHO-K1 mammalian cells. To obtain a protein meeting the requirements of injectable drugs, a chromatographic purification scheme was developed, including affinity and ion exchange chromatography. We have proposed a variant of the subunit vaccine “Delta-Vac” developed on this recombinant protein. Immunogenicity of “Delta-Vac” vaccine was tested in the BALB/c mice. The animals were immunized twice at a dose of 50 µg of RBD combined with Al(OH)₃, at a two-week interval. The ability of the candidate vaccine was assessed by induced production of specific IgG and neutralizing antibodies in BALB/c mice. Specific antibody titers of immunized animals ranged from $1/10^5$ to $1/10^6$. Moreover, the blood sera showed neutralizing activity against SARS-CoV-2 (variant Delta, B.1.617.2) at a titer of up to 1/2000. The developed vaccine “Delta-Vac” is highly immunogenic and induces production of neutralizing antibodies against homologous Delta variant as well as heterologous Wuhan and Omicron SARS-CoV-2 variants. Hence, “Delta-Vac” may act as a vaccine candidate and serve as a prototype for the development of subunit vaccines against COVID-19.

Keywords: subunit vaccines, SARS-CoV-2, RBD, S-protein, immunogenicity, neutralizing antibodies

Введение

Пандемия COVID-19 сконцентрировала внимание исследователей всего мира на борьбе с этой инфекцией. Важнейшим подходом в предотвращении распространения COVID-19 стала разработка профилактических вакцин на основе ряда платформ, включая ДНК- и РНК-вакцины,

векторные и субъединичные вакцины. Одной из таких платформ стали субъединичные вакцины, которые привлекательны в первую очередь тем, что субъединичные вакцины характеризуются высоким профилем безопасности, который подтверждается результатами исследований [6, 7, 18]. Однако безопасность данных вакцин часто сопряжена с невысокой эффективностью, поэто-

му зачастую необходимо применять адъюванты, а также использовать более сложные схемы иммунизации. В то же время важным достоинством субъединичных вакцин является масштабируемость и относительная простота производства, так как в процессе производства нет необходимости работать с живым вирусом или вирусными векторами. Важным достоинством субъединичных вакцин также является простота в производстве [5, 22, 25].

Коронавирусный спайковый белок (S-белок) является основной мишенью для нейтрализующих антител и обладает высокой иммуногенностью. Следуя этой логике, S-белок SARS-CoV-2 использовался в качестве основного антигена для большинства разработанных вакцин против COVID-19 [10, 14, 28]. Однако полноразмерный S-белок содержит области эпитопов ненейтрализующих антител, которые могут вызывать антителозависимое усиление инфекции (ADE). Существующий риск ADE дал толчок дальнейшим исследованиям по разработке более безопасного и эффективного иммуногена [5, 8, 20]. Недавно проведенные исследования показали, что рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка как компонент вакцин обладает высоким профилем безопасности [12, 21]. На сегодняшний день, вакцинные платформы, использующие в качестве иммуногена область RBD, обладают значительным преимуществом, так как фокусируют иммунитет на ключевых защитных антигенных детерминантах [3, 9]. Сравнительные исследования тримера S-белка, субъединицы S1 и только последовательности RBD показали, что использование только последовательности RBD в качестве вакцины позволяет добиться появления высоких титров нейтрализующих антител, этот факт тем более примечателен что использование тримера S или фрагмента S1 дает сходные или худшие результаты [15, 20, 24, 26].

В настоящее время накопилось достаточно свидетельств того, что вакцины на основе RBD показывают высокий уровень иммуногенности, при низкой реактогенности и хорошей переносимости поэтому выбор RBD в качестве единственного вакцинного иммуногена вполне оправдан [13, 22, 27]. В связи с этим целью работы было получение штамма-продуцента рекомбинантного рецептор-связывающего домена (RBD) варианта Delta (B.1.617.2) и исследование его иммуногенности.

Материалы и методы

Получение штамма-продуцента CHO-K1-RBDdelta

Продуцент рекомбинантного RBD варианта Delta (B.1.617.2) SARS-CoV-2 получали как

описано ранее [19]. В состав нуклеотидной последовательности, кодирующей RBD Wuhan-1 (GenBank: MN908947), вводили нуклеотидные замены для получения аминокислотных замен (L452R и T479K). Район RBDdelta амплифицировали и клонировали в составе плазмиды pVL3 в рамке считывания с N-концевой сигнальной последовательностью спайкового белка (MFVFLVLLPLVSSQC) и C-концевой 10 × His-меткой.

Клетки CHO-K1 трансфицировали pVL3-RBDdelta и хелперной плазмидой pCMV (CAT) T7-SB100, кодирующей транспозазу SB100, с использованием липофектамина 3000 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Селекцию трансформантов проводили на среде с пуромицином (10 мкг/мл) в течение 3 дней. Затем получали высокопродуктивные клоны из единичных клеток методом предельных разведений. Выбранный клон-продуцент RBDdelta адаптировали к суспензионным условиям культивирования.

Суспензионное культивирование штамма-продуцента RBDdelta

Клон-продуцент RBDdelta рассеивали в 5 мл свежей среды HyCell CHO (Cytiva, США) + 4 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, США) с концентрацией 1×10^6 живых кл/мл в 50 мл центрифужные пробирки. Культивировали на шейкере 200 об/мин, орбита 19 мм, при +37 °C во влажной атмосфере 5% CO₂ 6-7 дней до достижения концентрации 8×10^6 живых кл/мл. Суспензию клеток 5 мл с концентрацией 8×10^6 живых кл/мл инокулировали в стеклянной колбе с 35 мл свежей среды HyCell CHO (Cytiva, США) + 4 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, США). Культивировали на шейкере при тех же условиях 6-7 дней до достижения концентрации 8×10^6 живых кл/мл Суспензию клеток 5 мл с концентрацией 8×10^6 живых кл/мл переносили в новую стеклянную колбу с 35 мл свежей среды HyCell CHO (Cytiva, США) + 4 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, США). Оставшийся объем переносили на шейкере (200 об/мин, орбита 19 м) при +31 °C инкубировали 10 дней.

Выделение и очистка RBDdelta

Для получения препарата рекомбинантного RBDdelta была разработана схема двух-стадийной хроматографической очистки, включающая аффинную и ионообменную хроматографии. Аффинную хроматографию проводили с использованием сорбента Ni-IMAC сефарозы (GE Healthcare, США). Культуральную среду, содержащую рекомбинантный белок RBD, центрифугировали 10 мин при 12000 g и 4 °C и фильтровали через фильтровальные системы с размером пор 0,22 мкм для удаления клеток клеточного дебри-

са. Доочистку белка проводили с помощью ионообменной хроматографии в два этапа: фракцию целевого белка после аффинной хроматографии наносили на колонку с катионообменным сорбентом Nuvia HR-S (50 мл), затем проводили каскадную хроматографию на анионообменных сорбентах ДЭАЭ-сефароза и Q-сефароза. Оценку чистоты (посторонние примеси) препарата рекомбинантного RBDdelta проводили методом ВЭЖХ на хроматографе LC-20 Prominence. Посторонние примеси определяли методом ОФ-ВЭЖХ при следующих условиях: колонка Summetry300-C4, 5 мкм, 4,6 × 150 мм, температура колонки – 60 °С, ПФ А – 5% CH₃CN в воде с 0,1% ТФУ, ПФ В – 90% CH₃CN в воде с 0,1% ТФУ, градиент: 0,0 мин – 10% В; 15 мин – 70% В; 15,1 мин 100% В; 19,0 мин – 100% В; скорость ПФ – 1 мл/мин; регистрация хроматограммы – 214 нм, концентрация белка в пробе – 0,4 мг/мл, объем пробы – 50 мкл.

Иммунизация животных

Все экспериментальные протоколы и процедуры были проведены в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и одобрено Комитетом по биоэтике НИЦ ВБ «Вектор» (протокол Комитета по биоэтике № 5 от 1 октября 2020 г.).

В эксперименте использовали самок мышей BALB/c весом 16-18 г, которых случайным образом разделили на 2 группы по 10 животных. Группы животных содержали в отдельных клетках в стандартных условиях с постоянным свободным доступом к воде и корму. Первую группу животных дважды иммунизировали 50 мкг RBD с Al(OH)₃ с двухнедельным интервалом. Второй контрольной группе также с интервалом в две недели дважды вводили физраствор.

Иммуноферментный анализ

В 96-луночные планшеты (Corning, США) сорбировали 100 мкл антигена (1 мкг/мл) в 2 М мочевины в PBS в течение ночи при 4 °С. В качестве антигенов использовали рекомбинантные белки: RBD Delta и RBD Wuhan, а также тримеры S-белка вариантов Delta, Wuhan и Omicron SARS-CoV-2. Затем планшеты промывали PBST (PBS, содержащим 0,05% Tween-20) и блокировали блокирующим буфером (PBST, содержащим 1% казеина) 1,5 ч при комнатной температуре. Сыворотки иммунизированных животных серийно разбавляли и добавляли в заблокированные планшеты. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч планшеты трижды промывали PBST и инкубировали с козьим антимышиным IgG-HRP (Sigma-Aldrich, США) вторичными антителами при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшеты трижды промывали PBST и

добавляли субстрат HRP TMB (Amresco, США). Реакции останавливали с помощью 1 Н HCl. Поглощение измеряли при 450 нм с использованием многорежимного считывателя микропланшетов Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ вируснейтрализации

Штаммы вируса Wuhan – hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (EPI_ISL_406844), Delta – hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (EPI_ISL_7338814) и Omicron 1 – hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (EPI_ISL_8920444) SARS-CoV-2 были получены из государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Вирусосодержащий материал хранился при температуре -70 °С. Концентрация вируса в наработанном препарате составляла 5 × 10⁶ ТЦД₅₀/мл (тканевая цитопатическая доза на миллилитр).

Образцы крови получали от всех животных через две недели после 2-й иммунизации. Из крови животных были получены сыворотки путем осаждения форменных элементов с помощью центрифугирования при 1000 × g в течение 7-10 мин. Полученные сыворотки термически инактивировали при 56 °С в течение 30 мин.

Определение нейтрализующих титров сывороток проводили путем учета неповрежденного монослоя культуры клеток Vero E6 в лунках 96-луночного планшета (Corning, США). Культуру клеток выращивали в 96-луночных культуральных планшетах в ростовой питательной среде с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки и антибиотиков. Заражение клеток проводили вариантами Delta (B.1.617.2), Wuhan и Omicron (B.1.1.529) вируса SARS-CoV-2 в дозе 100 ТЦД₅₀/лунку. Исследуемые образцы сыворотки крови разводили последовательно в среде DMEM (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) с глутамином и антибиотиками с 2-кратным шагом, начиная с разведения 1:10 до 1:2560. К разведениям сыворотки добавляли вирус в равной пропорции 1:1 и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, затем смесь вируса и сыворотки наносили в дублях на монослой культуры клеток в объеме 100 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 4 сут. при 37 °С во влажной атмосфере 5% CO₂. Для окрашивания в каждую лунку планшета вносили 100 мкл 0,2%-ного раствора генцианвиолета. Через 4 сут. жидкость из лунок удаляли и промывали лунки водой. Учет результатов проводили визуально. Любое специфическое поражение культуры клеток в лунке учитывали как цитопатическое действие (ЦПД). Титром считали последнее разведение, при котором регистрировали защиту монослоя культуры клеток в лунках от ЦПД вируса. В качестве поло-

жительного контроля использовали 20-кратное разведение образца сыворотки крови реконвалесцента COVID-19 с ранее установленным титром 1:80. В качестве отрицательного контроля использовали питательную среду.

Результаты

Разработка вакцины «Дельта-Вак»

Первым этапом разработки вакцины «Дельта-Вак» стало создание штамма-продуцента, стабильно экспрессирующего RBD варианта Delta. В итоге был получен и охарактеризован стабильный клон CHO-K1-RBDdelta, экспрессирующий рекомбинантный RBD варианта Delta (B.1.617.2) SARS-CoV-2. По результатам ИФА выбран перспективный клон суперпродуцент, продуктивность которого достигла 50 мг/л. Полученный клон был адаптирован к суспензионному культивированию и охарактеризован по стабильности экспрессии. Для этого его культивировали в течение 25 пассажей и оценивали продуктивность и жизнеспособность клеток на каждом пассаже. Итоговая продуктивность полученной суспензионной культуры CHO-K1-RBDdelta составила 150 мг/л.

Одним из важных этапов разработки безопасной вакцины является стадия хроматографической очистки. Разработанная схема двухстадийной хроматографической очистки RBDdelta включала аффинную и ионообменную хроматографии. Чистота итогового препарата RBDdelta, определенная при помощи ВЭЖХ, по посторонним примесям составила 98,3% в основном пике.

Оценка иммуногенности вакцины «Дельта-Вак»

Иммуногенность вакцины «Дельта-Вак» оценивали на модели мышей BALB/с. Проводили двукратную иммунизацию животных дозой 50 мкг RBD в комплексе с $Al(OH)_3$ с двухнедельным интервалом. Через две недели после второй иммунизации получали сыворотки крови и анализировали титры специфических IgG в ИФА с использованием в качестве антигенов RBD Delta и RBD Wuhan, а также тримеров S-белка вариантов Delta, Wuhan и Omicron SARS-CoV-2. Результаты ИФА подтверждают, что вакцина «Дельта-Вак» вызывает индукцию специфических IgG у мышей линии BALB/с, как показано на рисунке 1.

Обратные титры специфических антител, выявленных в ИФА с использованием рекомбинантных антигенов, находились в диапазоне от 1×10^3 до 1×10^6 . Статистической разницы в титрах IgG иммунизированных мышей для антигенов RBD Delta и RBD Wuhan не было выявлено. При этом статистическая разница в титрах IgG иммунизированных мышей наблюдалась, ког-

да в качестве антигенов использовали S-белки вариантов Delta (B.1.617.2), Wuhan и Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2. При исследовании взаимодействия мышиных сывороток с S-белком вариантов Wuhan, Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 средние геометрические титры IgG составили $2,6 \times 10^4$, 1×10^5 , $1,3 \times 10^3$ соответственно.

Далее сыворотки крови иммунизированных мышей оценивали на наличие перекрестной нейтрализующей реактивности в отношении вариантов Delta (B.1.617.2), Wuhan и Omicron (B.1.1.529) вируса SARS-CoV-2 *in vitro* на клетках Vero E6. Результаты подтвердили, что сыворотки вакцинированных мышей обладают высокой нейтрализующей активностью в отношении варианта Delta (B.1.617.2) и Wuhan SARS-CoV-2 (рис. 2), средний геометрический титр составил $1576 \pm 1,9$ и $905,1 \pm 2,0$ соответственно.

Титр нейтрализующих антител против варианта Omicron (B.1.1.529) был ниже и составил $452,5 \pm 2,4$.

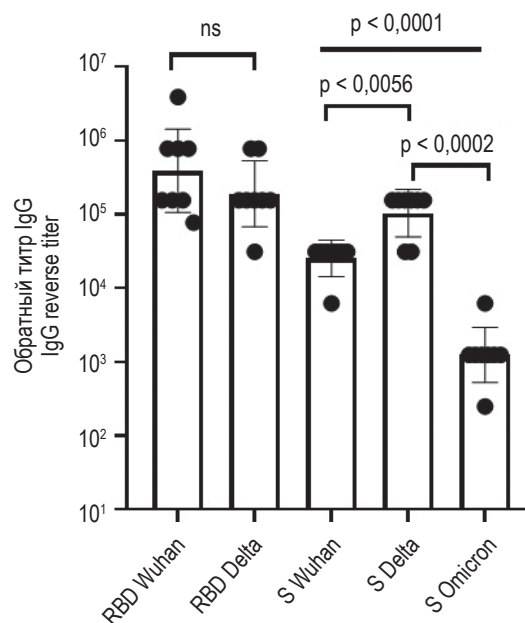


Рисунок 1. Анализ сывороточных IgG у мышей, иммунизированных дозой 50 мкг RBD Delta SARS-CoV-2 в ИФА

Примечание. Представлены средние геометрические значения \pm SD. Статистический анализ выполнен с использованием U-критерия Манна-Уитни и критерия Краскела-Уоллиса.

Figure 1. Analysis of serum IgG in mice immunized with a dose of 50 μ g of RBD Delta SARS-CoV-2 by ELISA

Note. Geometric means \pm SD are presented. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test and the Kruskal-Wallis test.

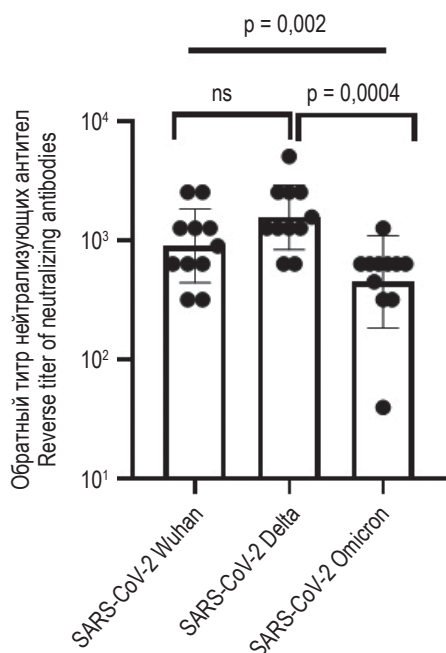


Рисунок 2. Анализ сывороточных IgG у мышей, иммунизированных дозой 50 мкг RBD Delta SARS-CoV-2 с гидроокисью алюминия, в тесте на ингибирование цитопатического действия вариантов Delta (B.1.617.2), Wuhan и Omicron (B.1.1.529) вируса SARS-CoV-2 (100 ТЦД₅₀) на культуре клеток Vero E6

Примечание. Представлены средние геометрические значения \pm SD. Статистический анализ выполнен с использованием U критерия Манна–Уитни и критерия Краскела–Уоллиса, при этом $p < 0,05$ считалось показателем статистической значимости.

Figure 2. Analysis of serum IgG in mice immunized with a dose of 50 μ g of RBD Delta SARS-CoV-2 with aluminum hydroxide in a test for inhibition of the cytopathic effect of variants Delta (B.1.617.2), Wuhan and Omicron (B.1.1.529) of the SARS-CoV-2 virus

Note. Geometric means \pm SD are presented. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney U test and the Kruskal–Wallis test, in this case, $p < 0.05$ was considered an indicator of statistical significance.

Статистических различий в титрах нейтрализующих антител в отношении варианта Delta (B.1.617.2) и Wuhan SARS-CoV-2 выявлено не было ($p < 0,0784$) на рисунке обозначается как ns. В то время как статистический анализ данных с использованием теста Манна–Уитни выявил значимые различия между титр нейтрализующих антител в отношении вариантов Omicron (B.1.1.529) и Delta (B.1.617.2) ($p < 0,0004$).

Обсуждение

Как было показано, иммунизация рекомбинантным белком RBD SARS-CoV-2 обеспечивает эффективную индукцию нейтрализующих антител, способных обеспечивать защиту иммунизированных, и поэтому считается многообещающим кандидатом для создания вакцин [4,

19]. Настоящее исследование было направлено на разработку кандидатной субъединичной вакцины против SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного рецептор-связывающего домена RBD SARS-CoV-2 варианта Delta (B.1.617.2).

Важную роль при разработке субъединичных вакцин играет выбор системы экспрессии. Необходимо обеспечить синтез целевого белка с сохранением его иммуногенных свойств. В ряде недавних исследованиях было показано, что рекомбинантные белковые вакцины на основе RBD SARS-CoV-2, полученного в клетках млекопитающих, способны индуцировать высокие титры нейтрализующих антител [12, 13, 21, 27]. Наши данные по сравнительному исследованию иммуногенности рекомбинантного RBD SARS-CoV-2, полученного в системах экспрессии клеток-прокариот и млекопитающих, согласуются с вышеуказанными результатами [17]. В качестве кандидата для вакцины выбрали RBD одного из наиболее патогенных вариантов SARS-CoV-2 – варианта Delta (B.1.617.2). Был разработан продуцент рекомбинантного RBD на основе клеток CHO-K1 и проведена адаптация клеток продуцента к суспензионному культивированию, при этом продуктивность штамма составила 150 мг с литра культуральной среды. На данный момент, достигнутый уровень продуктивности достаточен для выполнения экспериментов *in vivo* и проведения доклинических испытаний, однако, этот показатель может быть улучшен путем оптимизации состава питательных сред и режима культивирования. По литературным данным, уровень продукции коммерчески привлекательного продуцента может достигать 1 г с литра культуры [23].

Для получения белка, отвечающего требованиям инъекционных препаратов, была разработана схема хроматографической очистки, включающая аффинную и ионообменную хроматографии. Потери белка при очистке не превышали 10%, при этом чистота, определенная при помощи ВЭЖХ, составила 98,3%. На основании предварительных экспериментов по иммуногенности [16] была выбрана доза RBD 50 мкг и адъювант – гидроокись алюминия (Al(OH)₃).

Анализ иммуногенности полученного вакцинного препарата «Дельта-Вак» было решено проводить по двум основным показателям: уровню индукции специфических и нейтрализующих антител. Для анализа уровня специфических антител использовали ИФА, а для анализа уровня нейтрализующих антител – реакцию вируснейтрализации.

Несмотря на то, что ИФА является стандартным методом анализа в исследованиях гуморального иммунного ответа, большое значение имеет выбор антигена. В нашем исследовании для ИФА

были использованы два варианта антигенов: RBD и тримерный S-белок. Оказалось, что при использовании в качестве антигена RBD уровни специфических антител для вариантов Wuhan и Delta статистически не отличались, в то время как при использовании антигена на основе тримерного S-белка отличия были. При этом результаты ИФА с тримерным S-белком коррелируют с результатами вируснейтрализации. Так как для целей работы важно оценить не просто титр специфических антител, а титр функциональных антител, потенциально способных блокировать вирус, то использование тримерного S-белка в ИФА позволяет получать более корректные результаты.

Результаты анализа сывороток крови животных, иммунизированных вакцинным препаратом «Дельта-Вак» в реакции вируснейтрализации, показывают, что они содержат антитела, нейтрализующие не только гомологичный вариант SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2), но и гетерологичные Wuhan, Omicron (B.1.1.529), при этом против последнего иммунный ответ был снижен. По всей видимости, это связано с тем, что S-белок Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 содержит большое количество аминокислотных замен, 15 из которых расположены в регионе RBD [11]. Наши результаты согласуются с исследованиями, в которых показано, что аминокислотные замены в S-белке у штамма Omicron (B.1.1.529) приводят к его ускользанию от терапевтических моноклональных антител [2, 11]. Интересно отметить, что разница между специфическими и нейтра-

лизующими антителами в отношении Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2, несмотря на общее снижение, была наименьшей.

Заключение

На основании приведенных результатов можно заключить, что разработанный прототип субъединичной вакцины на основе RBD варианта Delta (B.1.617.2) SARS-CoV-2 индуцирует выраженный гуморальный иммунный ответ, характеризующийся высокими титрами нейтрализующих антител против гомологичного варианта вируса. Анализ перекрестной защиты показал наличие нейтрализующей активности против варианта Wuhan, однако уровень этой активности значительно варьировал между отдельными образцами. В отношении варианта Omicron наблюдалось значительное снижение уровня антительного ответа и высокая гетерогенность среди иммунных сывороток, что, возможно, свидетельствует о частичной утрате перекрестной защиты. Полученные данные подчеркивают необходимость дальнейших исследований по расширению спектра защитной активности за счет модификации антигенного состава вакцины или стратегий бустерной иммунизации.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» за помощь в проведении ряда экспериментов.

Список литературы / References

1. Матвеев А.Л., Хлусевич Я.А., Байков И.К., Бабкин И.В., Гончарова Е.П., Морозова В.В., Тикунова Н.В. Создание стабильного штамма-продуцента полноразмерного антитела человека на примере антитела против вируса экстремелии // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2018, Т. 21, № 8, С. 993-1000. [Matveev A.L., Khlusevich Ya.A., Baykov I.K., Babkin I.V., Goncharova E.P., Morozova V.V., Tikunova N.V. Development of a stable eukaryotic strain producing fully human monoclonal antibody on the basis of the human antibody against ectromelia virus. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2017, Vol. 21, no. 8, pp. 993-1000. (In Russ.)]
2. Arora P., Zhang L., Rocha C., Graichen L., Nehlmeier I., Kempf A., Cossmann A., Gema Morillas Ramos G.M., Baier E., Tampe B., Moerer O., Dickel S., Winkler M.S., Behrens G.M.N., Pöhlmann S., Hoffmann M. The SARS-CoV-2 Delta-Omicron Recombinant Lineage (XD) Exhibits Immune-Escape Properties Similar to the Omicron (BA. 1) Variant. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 22, 14057. doi: 10.3390/ijms232214057.
3. Coria L.M., Saposnik L.M., Pueblas Castro C., Castro E.F., Bruno L.A., Stone W.B., Pérez P.S., Darriba M.L., Chemes L.B., Alcain J., Mazzitelli I., Varese A., Salvatori M., Auguste A.J., Álvarez D.E., Pasquevich K.A., Cassataro J. A novel bacterial protease inhibitor adjuvant in RBD-Based COVID-19 vaccine formulations containing alum increases neutralizing antibodies, specific germinal center B cells and confers protection against SARS-CoV-2 Infection in Mice. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 844837. doi: 10.3389/fimmu.2022.844837.
4. Dai L., Gao G.F. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021, Vol. 21, no. 2, pp. 73-82.
5. Ghaemi A., Roshani P. Asl., Zargaran H., Ahmadi D., Hashimi A.A., Abdolalipour E., Bathaeian S., Miri S.M. Recombinant COVID-19 vaccine based on recombinant RBD/Nucleoprotein and saponin adjuvant induces long-lasting neutralizing antibodies and cellular immunity. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 974364. doi: 10.3389/fimmu.2022.974364.

6. Han X., Cai Z., Dai Y., Huang H., Cao X., Wang Y., Fang Y., Liu G., Zhang M., Zhang Y., Yang B., Xue W., Zhao G., Tai W., Li M., Re-burying Artificially Exposed Surface of Viral Subunit Vaccines Through Oligomerization Enhances Vaccine Efficacy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2022, Vol. 12, 927674. doi: 10.3389/fcimb.2022.927674.
7. Heidary M., Kaviar V.H., Shirani M., Ghanavati R., Motahar M., Sholeh M., Khoshnood S.A Comprehensive Review of the Protein Subunit Vaccines Against COVID-19. *Front. Microbiol.*, 2022, Vol. 13, 927306. doi: 10.3389/fmicb.2022.927306.
8. Karthik K., Senthilkumar T.M.A., Udhayavel S., Raj G.D. Role of antibody-dependent enhancement (ADE) in the virulence of SARS-CoV-2 and its mitigation strategies for the development of vaccines and immunotherapies to counter COVID-19. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2020, Vol. 16, no. 12, pp. 3055-3060.
9. Kleanthous H., Silverman J.M., Makar K.W., Yoon I.K., Jackson N., Vaughn D.W. Scientific rationale for developing potent RBD-based vaccines targeting COVID-19. *Vaccines*, 2021, Vol. 6, no. 1, 128. doi: 10.1038/s41541-021-00393-6.
10. Kuo T.Y., Lin M.Y., Coffman R.L., Campbell J.D., Traquina P., Lin Y.J., Liu L. T.-Ch., Cheng J., Wu Y.-Ch., Wu Ch.-Ch., Tang W.-H., Huang Ch.-G., Tsao K.-Ch., Chen C. Development of CpG-adjuvanted stable prefusion SARS-CoV-2 spike antigen as a subunit vaccine against COVID-19. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 20085. doi: 10.1038/s41598-020-77077-z.
11. Lee I.J., Sun C.P., Wu P.Y., Lan Y.H., Wang I.H., Liu W.C., Yuan J.P.-Y., Chang Y.-W., Tseng Sh.-Ch., Tsung S. I., Chou Y.-Ch., Kumari M., Lin Y.-Sh., Chen H.-F., Chen T.-Y., Lin Ch.-Ch., Chiu Ch.-W., Hsieh Ch.-H., Chuang Ch.-Y., Cheng Ch.-M., Lin H.-T., Chen W.-Y., Hsu F.-F., Hong M.-H., Liao Ch.-Ch., Chang Ch.-Sh., Liang J.J., Ma H.-H., Chiang M.-T., Liao H.-N., Ko H.-Y., Chen L.-Y., Ko Y.-A., Yu P.-Y., Yang T.-J., Chiang P.-Ch., Hsu Sh.-T., Lin Y.-L., Lee Ch.-Ch., Wu H.-Ch., Tao M.H. A booster dose of Delta × Omicron hybrid mRNA vaccine produced broadly neutralizing antibody against Omicron and other SARS-CoV-2 variants. *J. Biomed. Sci.*, 2022, Vol. 29, no. 1, 49. doi: 10.1186/s12929-022-00830-1.
12. Liao Y., Li Y., Pei R., Fang X., Zeng P., Fan R., Ou Zh., Deng J., Zhou J., Guan W., Min Y., Deng F., Peng H., Zhang Zh., Feng Ch., Xin B., He J., Hu Zh., Zhang J. Safety and immunogenicity of a recombinant interferon-armed RBD dimer vaccine (V-01) for COVID-19 in healthy adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase I trial. *Emerg. Microbes Infect.*, 2021, Vol. 10, no. 1, pp. 1589-1597.
13. Lin T.W., Huang P.H., Liao B.H., Chao T.L., Tsai Y.M., Chang S.C., Chang S.-Y., Chen H.W. Tag-Free SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain (RBD), but Not C-Terminal Tagged SARS-CoV-2 RBD, Induces a Rapid and Potent Neutralizing Antibody Response. *Vaccines*, 2022, Vol. 10, no. 11, 1839. doi: 10.3390/vaccines10111839.
14. Liu Ch., Ginn H.M., Dejnirattisai W., Supasa P., Wang B., Tuekprakhon A., Nutalai R., Zhou D., Mentzer A.J., Zhao Y., Duyvesteyn H.M.E., López-Camacho C., Slon-Campos J., Walter Th.S., Skelly D., Johnson S.A., Ritter Th.G., Mason Ch., Clemens S.A.C., Naveca F.G., Nascimento V., Nascimento F., Fernandes da Costa C., Resende P.C., Pauvidol-Correa A., Siqueira M.M., Dold Ch., Temperton N., Dong T., Pollard A.J., Knight J.C., Crook D., Lambe T., Clutterbuck E., Bibi S., Flaxman A., Bittaye M., Belij-Rammerstorfer S., Gilbert S.C., Malik T., Carroll M.W., Klenerman P., Barnes E., Dunachie S.J., Baillie V., Serafin N., Ditse Z., Silva K.D., Paterson N.G., Williams M.A., Hall D.R., Madhi Sh., Nunes M.C., Goulder Ph., Fry E.E., Mongkolsapaya J., Ren J., Stuart D.I., Sreaton G.R. Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B. 1.617 by vaccine and convalescent serum. *Cell*, 2021, Vol. 184, no. 16, pp. 4220-4236.e13.
15. Malladi S.K., Singh R., Pandey S., Gayathri S., Kanjo K., Ahmed S., Khan M.S., Kalita P., Girish N., Upadhyaya A., Reddy P., Pramanick I., Bhasin M., Mani Sh., Bhattacharyya S., Joseph J., Thankamani K., Raj V.S., Dutta S., Singh R., Nadig G., Varadarajan R. Design of a highly thermotolerant, immunogenic SARS-CoV-2 spike fragment. *J. Biol. Chem.*, 2021, Vol. 296, 100025. doi: 10.1074/jbc.RA120.016284.
16. Merkuleva I.A., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Volkova N.V., Aripov V.S., Shanshin D.V., Karpenko L.I., Belenkaya S.V., Kazachinskaia E.I., Volosnikova E.A., Esina T.I., Sergeev A.A., Titova K.A., Konyakhina Y.V., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Kolosova E.A., Viktorina O.E., Shelemba A.A., Rudometov A.P., Ilyichev A.A. Are Hamsters a Suitable Model for Evaluating the Immunogenicity of RBD-Based Anti-COVID-19 Subunit Vaccines? *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 5, 1060. doi: 10.3390/v14051060.
17. Merkuleva I.A., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Shanshin D.V., Rudometov A.P., Karpenko L.I., Belenkaya S.V., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Kazachinskaia E.I., Volosnikova E.A., Esina T.I., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Borisevich S.S., Shelemba A.A., Chikhaev A.N., Ilyichev A.A. Comparative Immunogenicity of the Recombinant Receptor-Binding Domain of Protein S SARS-CoV-2 Obtained in Prokaryotic and Mammalian Expression Systems. *Vaccines*, 2022, Vol. 10, no. 1, 96. doi: 10.3390/vaccines10010096.
18. Pang Y., Lu H., Cao D., Zhu X., Long Q., Tian F., Long X., Li Y. Efficacy, immunogenicity and safety of respiratory syncytial virus prefusion F vaccine: systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 2024, Vol. 24, no. 1, 1244. doi: 10.1186/s12889-024-18748-8.
19. Premkumar L., Segovia-Chumbez B., Jadi R., Martinez D.R., Raut R., Markmann A.J., Cornaby C., Bartelt L., Weiss S., Park Y., Edwards C.E., Weimer E., Scherer E.M., Rouphael N., Edupugantih S., Weiskopf D., Tse L.V., Hou Y.J., Margolis D., Sette A., Collins M.H., Schmitz J., Baric R.S., de Silva A.M. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Science immunology*, 2020, Vol. 5, no. 48, eabc8413. doi: 10.1126/sciimmunol.abc8413.
20. Shimizu J., Sasaki T., Koketsu R., Morita R., Yoshimura Y., Murakami A., Saito Y., Kusunoki T., Samune Y., Nakayama E.E., Miyazaki K., Shioda T. Reevaluation of antibody-dependent enhancement of infection in anti-

SARS-CoV-2 therapeutic antibodies and mRNA-vaccine antisera using FcR- and ACE2-positive cells. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, no. 1, 15612. doi: 10.1038/s41598-022-19993-w.

21. Starr T.N., Czudnochowski N., Liu Z., Zatta F., Park Y.J., Addetia A., Pinto D., Beltramello M., Hernandez P., Greaney A.J., Marzi R., Glass W.G., Zhang I., Dingens A.S., Bowen J.E., Tortorici M.A., Walls A.C., Wojcechowskyj J.A., de Marco A., Rosen L.E., Zhou J., Montiel-Ruiz M., Kaiser H., Dillen J.R., Tucker H., Bassi J., Silacci-Fregni Ch., Housley M.P., Di Iulio J., Lombardo G., Agostini M., Sprugasci N., Culap K., Jaconi S., Meury M., Jr E.D., Abdelnabi R., Foo Sh.-Y.C., Camerani E., Stumpf S., Croll T.I., Nix J.C., Havenar-Daughton C., Piccoli L., Benigni F., Neyts J., Telenti A., Lempp F.A., Pizzuto M.S., Chodera J.D., Hebnar Ch.M., Virgin H.W., Whelan S.P.J., Veesler D., Corti D., Bloom J.D., Snell G. SARS-CoV-2 RBD antibodies that maximize breadth and resistance to escape. *Nature*, 2021, Vol. 597, no. 7874, pp. 97-102.

22. Wang J., Wen Y., Zhou S.H., Zhang H.W., Peng X.Q., Zhang R.Y., Yin X-G., Qiu H., Gong R., Yang G.F., Guo J. Self-Adjuvanting Lipoprotein Conjugate agalCer-RBD Induces Potent Immunity against SARS-CoV-2 and its Variants of Concern. *J. Med. Chem.*, 2022, Vol. 65 no. 3, pp. 2558-2570.

23. Yang D.K., Kweon C.H., Kim B.H., Lim S.I., Kwon J.H., Kim S.H., Jae-Young S., Han H.R. Immunogenicity of baculovirus expressed recombinant proteins of Japanese encephalitis virus in mice. *J. Vet. Sci.*, 2005, Vol. 6, no. 2, pp. 125-133.

24. Yang J., Wang W., Chen Z., Lu S., Yang F., Bi Z., Bao L., Mo F., Li X., Huang Y., Hong W., Yang Y., Zhao Y., Ye F., Lin Sh., Deng W., Chen H., Lei H., Zhang Z., Luo M., Gao H., Zheng Y., Gong Y., Jiang X., Xu Y., Lv Q., Li D., Wang M., Li F., Wang Sh., Wang G., Yu P., Qu Y., Yang L., Deng H., Tong A., Li J., Wang Zh., Yang J., Shen G., Zhao Zh., Li Y., Luo J., Liu H., Yu W., Yang M., Xu J., Wang J., Li H., Wang H., Kuang D., Lin P., Hu Zh., Guo W., Cheng W., He Y., Song X., Chen Ch., Xue Zh., Yao Sh., Chen L., Ma X., Chen S., Gou M., Huang W., Wang Y., Fan Ch., Tian Zh., Shi M., Wang F.-Sh., Dai L., Wu M., Li G., Wang G., Peng Y., Qian Zh., Huang C., Lau J. Y.-N., Yang Zh., Wei Y., Cen X., Peng X., Qin Ch., Zhang K., Lu G., Wei X. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. *Nature*, 2020, Vol. 586, no. 7830, pp. 572-577.

25. Ye J., Meng S., Zhu X. Recent advances in the development of bispecific antibodies. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2020, Vol. 36, no. 1, pp. 33-43.

26. Zang J., Gu C., Zhou B., Zhang C., Yang Y., Xu S., Bai L., Zhang R., Deng Q., Yuan Zh., Tang H., Qu D., Lavillette D., Xie Y., Huang Z. Immunization with the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 elicits antibodies cross-neutralizing SARS-CoV-2 and SARS-CoV without antibody-dependent enhancement. *Cell Discov.*, 2020, Vol. 6, 61. doi: 10.1038/s41421-020-00199-1.

27. Zhang J., Han Z.B., Liang Y., Zhang X.F., Jin Y.Q., Du L.F., Shao Sh., Wang H., Hou J.W., Xu K., Lei W., Lei Z.H., Liu Zh.M., Zhang J., Hou Y.N., Liu N., Shen F.J., Wu J.J., Zheng X., Li X.Y., Li X., Huang W.J., Wu G.Zh., Su J.G., Li Q.M. A mosaic-type trimeric RBD-based COVID-19 vaccine candidate induces potent neutralization against Omicron and other SARS-CoV-2 variants. *Elife*, 2022, Vol. 11, e78633. doi: 10.7554/eLife.78633.

28. Zhang J., Zeng H., Gu J., Li H., Zheng L., Zou Q. Progress and prospects on vaccine development against SARS-CoV-2. *Vaccines*, 2020, Vol. 8, no. 2, 153. doi: 10.3390/vaccines8020153.

Авторы:

Несмеянова В.С. – младший научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Меркульева Ю.А. – к.б.н., младший научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Исаева А.А. – к.х.н., младший научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Волкова Н.В. – к.б.н., научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Authors:

Nesmeyanova V.S., Junior Researcher, Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Merkulyeva Yu.A., PhD (Biology), Junior Researcher, Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Isaeva A.A., PhD (Chemistry), Junior Researcher, Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Volkova N.V., PhD (Biology), Researcher, Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Беленькая С.В. — к.б.н., научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Боргоякова М.Б. — младший научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Волосникова Е.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов, заведующая лабораторией получения и анализа биосубстанций ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Есина Т.И. — младший научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Даниленко Е.Д. — к.б.н., врио директора Института медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Зайковская А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Олкин С.Е. — ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Пьянков О.В. — к.б.н., заведующий отделом «Коллекция микроорганизмов» ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Ильичев А.А. — д.б.н., профессор, заведующий отделом биоинженерии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Щербаков Д.Н. — к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии, заведующий лабораторией иммунохимии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Belenkaya S.V., PhD (Biology), Researcher, Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Borgoyakova M.B., Junior Researcher, Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Volosnikova E.A., PhD (Biology), Leading Researcher of the Department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals, Head of the Laboratory of Obtaining and Analyzing Biosubstances, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Esina T.I., Junior Researcher, Department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Danilenko E.D., PhD (Biology), Acting Director, Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Zaikovskaya A.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Department “Collection of Microorganisms”, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Olkin S.E., Leading Researcher, Department of Biophysics and Ecological Research, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Pyanikov O.V., PhD (Biology), Head, Department “Collection of Microorganisms”, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Ilichev A.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Shcherbakov D.N., PhD (Biology), Leading Researcher of the Bioengineering Department, Head of the Laboratory of Immunochemistry, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Поступила 17.08.2023
Отправлена на доработку 13.09.2023
Принята к печати 13.05.2025

Received 17.08.2023
Revision received 13.09.2023
Accepted 13.05.2025

ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО КОМПАРТМЕНТА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ УЧАСТНИКОВ СОВРЕМЕННЫХ БОЕВЫХ КОНФЛИКТОВ

Пашнин С.Л.¹, Давыдова Е.В.^{1,2}, Альтман Д.Ш.¹, Зурочка В.А.^{3,4}, Журавлев И.Ю.¹, Жакупова Я.Т.^{2,5}

¹ ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

² ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

³ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», г. Челябинск, Россия

⁵ ГБУЗ «Челябинский клинический терапевтический госпиталь для ветеранов войн», г. Челябинск, Россия

Резюме. Пребывание в зоне боевых действий сопряжено с высоким риском развития психических нарушений. Накоплен значительный объем знаний о механизмах иммуноопосредованных реакций при развитии нейропсихической патологии, в частности посттравматического стрессового расстройства (ПТСР). Важная роль в развитии нейровоспаления при стрессе отводится активированным Т-регуляторным клеткам. Цель исследования — изучение показателей системы крови, цитометрических особенностей клеточного компартмента иммунной системы у участников современных военных конфликтов с наличием расстройств адаптации, ассоциированных со стрессом. Обследованы 97 ветеранов — участников современных военных конфликтов, мужского пола от 35 до 55 лет, из них 35 — ветераны специальной военной операции на Украине (СВО) — основная группа, 42 ветерана второй Чеченской военной кампании (группа сравнения), 20 человек — здоровые военнослужащие (контрольная группа). Всем проводилось патопсихологическое обследование в соответствии с клиническими рекомендациями. У 12% ветеранов СВО диагностирован ПТСР, 77% имели различные варианты невротических расстройств, связанных со стрессом и соматоформными расстройствами. В группе сравнения 2% комбатантов имели диагноз «хроническое изменение личности». Общий анализ крови проводили стандартизированным методом на гематологическом анализаторе. Иммунофенотипирование лимфоцитов с использованием проточного цитофлюориметра Navios (Beckman Coulter, США). В группе ветеранов СВО отмечены снижение степени разброса эритроцитов по объему, по-

Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна
ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница»
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 70.
Тел.: 8 (351) 749-37-75.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Address for correspondence:

Evgeniya V. Davydova
Chelyabinsk Regional Clinical Hospital
70 Vorovsky St
Chelyabinsk
454048 Russian Federation
Phone: +7 (351) 749-37-75.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Образец цитирования:

С.Л. Пашнин, Е.В. Давыдова, Д.Ш. Альтман, В.А. Зурочка, И.Ю. Журавлев, Я.Т. Жакупова «Цитометрические особенности клеточного компартмента иммунной системы участников современных боевых конфликтов» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 1087-1098. doi: 10.15789/1563-0625-CFO-2952

© Пашнин С.Л. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.L. Pashnin, E.V. Davydova, D.Sh. Altman, V.A. Zurochka, I.Yu. Zhuravlev, Ya.T. Zhakupova "Cytometric features of cellular immune compartment in participants of current military conflicts", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 5, pp. 1087-1098. doi: 10.15789/1563-0625-CFO-2952

© Pashnin S.L. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-CFO-2952

казателя гетерогенности и среднего объема тромбоцитов, лимфопения, моноцитоз, что отражает разнонаправленное действие регуляторов гемопоэтических клеток на отдельные линии дифференцировки мононуклеаров. Цитометрический анализ состава лимфоцитов показал снижение Т-хелперов и зрелых НК-клеток в группе ветеранов СВО, что объясняет наличие лимфопении и может свидетельствовать о дефиците адаптивного и врожденного компартов иммунной защиты в условиях пролонгированной реакции на стресс. Установлено повышение численности ТНК и Т-регуляторных лимфоцитов, препятствующих возможности перехода иммунного ответа в аутоиммунную реакцию. При стрессе транскрипционный фактор FoxP3 участвует в повышающей регуляции индуцируемого глюкокортикоидами рецептора TNF в линии Т-регуляторных клеток, потенцируя пролиферативную активность последних. Показано снижение числа Т-хелперов и Т-регуляторных клеток с маркерами ранней и поздней позитивной активации, ограничивая развитие как аутоиммунных реакций, так и развитие стресс-индуцированного нейровоспаления. Между контрольной группой и показателями группы сравнения практически отсутствовали различия, что свидетельствует о нивелировании с течением времени остроты стресс-индуцированных нейроиммунных реакций. Индуцированное стресс-медиаторами кроветворение и опосредованное нейроиммунными влияниями изменение количественного спектра субпопуляций лимфоцитов является следствием сложного многоуровневого нейробиодинамического процесса ЦНС, ассоциированного с клиническими формами расстройств адаптации.

Ключевые слова: военный стресс, гематологические индексы, субпопуляционный профиль лимфоцитов, нарушения адаптации

CYTOMETRIC FEATURES OF CELLULAR IMMUNE COMPARTMENT IN PARTICIPANTS OF CURRENT MILITARY CONFLICTS

Pashnin S.L.^a, Davydova E.V.^{a,b}, Altman D.Sh.^a, Zurochka V.A.^{c,d}, Zhuravlev I.Yu.^a, Zhakupova Ya.T.^{b,e}

^a Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

^b South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

^c Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^d South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

^e Chelyabinsk Clinical Therapeutic Hospital for War Veterans, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Staying in a combat area is associated with a high risk of developing mental disorders. A significant knowledge has been accumulated concerning the mechanisms of immune-mediated mechanisms of neuropsychiatric pathologies, in particular, post-traumatic stress disorder (PTSD). Activated T regulatory cells play an important role in the development of neuroinflammation under stress conditions. Our purpose was to study the indices of blood system and cytometric features of immune cellular populations in the participants of current military conflicts in presence of stress-associated adaptation disorders. We examined 97 male veterans involved in modern military conflicts, 35 to 55 years old. The main group 35 included veterans of a special military operation in Ukraine (SVO), along with 42 veterans of the second Chechen military campaign (comparison group). Control group consisted of 20 healthy persons from military staff. All patients underwent pathopsychological examination in accordance with clinical recommendations. PTSD was diagnosed in 12% of SVO veterans, whereas 77% had various types of neurotic, stress-related and somatoform disorders. In the comparison group, 2% of combatants were diagnosed with chronic personality changes. A complete blood count was performed using a standardized technique with a hematological analyzer. Immunophenotyping of lymphocytes was performed by a Navios flow cytometer (Beckman Coulter, USA). In the group of SVO veterans, we have noted a decrease in RBC volume dispersion, reduced heterogeneity index and the average volume of platelets, as well as lymphopenia and monocytosis, thus reflecting the multidirectional effect of

hematopoietic regulation factors on distinct differentiation lineages of mononuclear cells. Cytometric analysis of lymphocyte populations showed a decrease in T helper cells and mature NK cells in the group of SVO veterans which explains the presence of lymphopenia and may indicate a deficiency of adaptive and innate immune response upon prolonged response to stress. We have revealed an increased number of T NK and T regulatory lymphocytes which are suggested to prevent the development of autoimmune disorders. Under stress conditions, the FoxP3 transcription factor may upregulate the glucocorticoid-induced TNF receptor in the T regulatory cells thus potentiating their proliferative activity. We have also shown a decreased number of T helpers and T regulatory cells expressing markers of early and late positive activation, limiting the development of both autoimmune reactions and the development of stress-induced neuroinflammation. No significant differences were found between the indices control group and comparison group, thus indicating that the severity of stress-induced neuroimmune reactions leveled out over time. Hematopoiesis induction by stress mediators and indirect neuroimmune-mediated changes in the quantitative profile of lymphocyte subpopulations seem to be a consequence of a complex multi-level neuropsychodynamic process of the central nervous system associated with clinical forms of adaptation disorders.

Keywords: combat stress, hematological indices, lymphocyte subpopulation profile, adaptation disorders

Введение

Выполнение профессиональных задач в условиях боевой обстановки протекает в большинстве случаев в экстремальных условиях с высокими физическими и психо-эмоциональными перегрузками, что многократно увеличивает риск развития психических нарушений, включающих поведенческие и эмоциональные аспекты личностного, невротического и органического характера [8, 9]. Пребывание в зоне боевых действий в условиях предельного обострения человеческих чувств, необходимости принятия немедленных решений, высокой собранности и слаженности действий, от которых зависит не только выполнение боевой задачи, но и выживание формирует особый психологический тип личности – психотип комбатанта [1, 11]. Ряд наблюдаемых у комбатантов нейропсихиатрических симптомов, включающих тревогу, повторные переживания психотравмирующих событий, избегание, негативные эмоции, бессонницу, изменения личности, аддиктивное поведение и проблемы с памятью ассоциированы с формированием посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) [30, 33] и частично перекликаются с генерализованным тревожным расстройством (ГТР) [27, 36].

На сегодняшний день накоплен значительный объем знаний о механизмах нейроиммунного взаимодействия, лежащих в основе ПТСР [11, 26]. При ПТСР обнаруживают изменения функций трех субрегионов медиальной префронтальной коры, передней поясной извилины, прелимбической коры и инфраламбической коры [23]. При формировании синдрома ПТСР реализуется двунаправленная связь префронтальной коры с гиппокампом и миндалиной, что играет важную роль в эволюции эмоционального переживания травматического страха [24]. По мнению О.П. Ту-

чиной и соавт., развитие нейровоспаления на фоне ПТСР непосредственно связано с изменением морфологии нейронов и клеток глии, а также активацией микроглиальных клеток [14]. Иммуноопосредованные нейровоспалительные реакции при формировании нейропсихической патологии, в частности ПТСР, ГТР, развиваются благодаря наличию сложных многоуровневых полимодальных связей между центральной нервной системой (ЦНС) и иммунной системой [29]. Важная роль в развитии нейровоспаления при стрессе отводится активированным Т-регуляторным клеткам (Treg) [35, 37]. Также известно, что любой вид стресса снижает уровень экспрессии предшественника микроРНК (miR-124) в гиппокампе, обладающего нейропротективными свойствами, за счет повышения синтеза провоспалительных цитокинов микроглиальными клетками на территории ЦНС, повышая тем самым восприимчивость мужчин к состоянию тревоги и страха [19]. Также имеются данные о значительном снижении экспрессии miRNA-598-3p в прелимбической коре у пациентов с ПТСР [17]. Описано также значительное снижение уровня микроРНК Let-7a, ассоциированного с геном белка p53 у пациентов с ПТСР на фоне увеличения содержания провоспалительной субпопуляции Т-хелперов (Th17) [15]. Таким образом, вовлечение нейроиммунологических процессов в клиническую реализацию нейропсихиатрических синдромов являются весомым основанием для продолжения междисциплинарных биомедицинских исследований в данном направлении.

В связи с этим **целью настоящего исследования** явилось изучение показателей системы крови, цитометрических особенностей клеточного компартмента иммунной системы у участников современных локальных военных конфликтов с наличием расстройств адаптации, ассоциированных со стрессом.

Материалы и методы

В исследовании принимали участие 97 пациентов мужского пола, участников современных военных конфликтов, находящихся на реабилитационном лечении в ГБУЗ «Челябинский областной клинический терапевтический госпиталь для ветеранов войн» среднего возраста $46,2 \pm 5,6$ года, из них в 1-ю (основную) группу вошли 35 ветеранов – участников специальной военной операции на территории Украины (УСВО), время пребывания в зоне проведения военной операции составило от 3 мес. до 1,5 лет (в среднем $8,2 \pm 2,3$ мес.). 2-ю (группу сравнения) составили 42 ветерана второй Чеченской военной кампании (1999–2009) в возрастном диапазоне 35–55 лет. 3-я группа (группа контроля) состояла из 20 здоровых военнослужащих соответствующего возраста, не принимавших участия в военных кампаниях. Исследование одобрено решением Этического комитета ООО «ДокторЛаб» (Россия) (протокол № 3 от 17.10.2020). Всем участникам исследования с применением комплекта психометрических шкал и тестов проведено клиническое нейропсихологическое тестирование, включающее: Структурированное клиническое диагностическое интервью (СКИД), модуль I «ПТСР»; Шкалы для клинической диагностики ПТСР (Clinical-Administered PTSD Scale – CAPS); Миссисипскую шкалу для оценки посттравматических реакций; Шкалу оценки интенсивности боевого опыта (Combat Exposure Scale – CES), Шкалу оценки выраженности психофизиологической реакции на стресс; проведена патопсихологическая диагностика, выявляющая наличие в анамнезе пациента травматического события и определение уровня выраженности симптоматики ПТСР [2]. Собраны жалобы и анамнез комбатантов согласно рекомендациям ФГБУ «НМИЦ психиатрии и неврологии имени В.М. Бехтерева» МЗ РФ (Санкт-Петербург) [2]. При необходимости проводились функциональные исследования: ТКДГ, УЗДГ, ЭЭГ, ЭКГ, УЗИ щитовидной железы и др. Критериями исключения являлись тяжелые ЧМТ, психоорганические синдромы, соматическая патология в стадии декомпенсации, онкологические и лимфопролиферативные заболевания. По результатам исследования в 1-й группе у 89% ветеранов СВО диагностированы расстройства адаптации (МКБ-10 F43: Реакция на тяжелый стресс и нарушения адаптации): из них у 12% диагностирован ПТСР (МКБ-10: F43.1), у 77% варианты невротических расстройств, связанных со стрессом и соматоформными расстройствами (МКБ-10: рубрики F40–48). Диагностические критерии ПТСР в МКБ-10 соответствуют критериям по DSM-IV и рассматриваются в рубрике «Тревожные расстройства» (300.xx). В DSM-V с

учетом изменений в диагностических критериях ПТСР выделены 4 кластера: В – навязчивое воспроизведение травматического события (intrusion); С – избегание травматического события (avoidance); D – негативные последствия для когнитивной сферы и настроения; E – повышенное возбуждение и реактивность. Раздел МКБ-11 «Расстройства, непосредственно связанные со стрессом» включает в себя 6B43 «расстройство адаптации» (6B43), «ПТСР» (6B40) и «комплексное ПТСР» (6B41).

Среди комбатантов 2-й группы (группы сравнения), у которых давность психотравмирующего события составила не менее 15 лет, только 2% ветеранов имели диагноз по МКБ-11: хроническое изменение личности после катастрофы (F62.0), остальные участники не имели признаков психопатологии.

Гематологические исследования

Проводилась детекция количественных и качественных показателей общего анализа крови с оценкой лейкоцитарного, эритроцитарного и тромбоцитарного ростков кроветворения с расчетом гематологических индексов. Исследования выполнялись на гематологическом анализаторе Medonic M20 (Швеция).

Имунофенотипирование клеток крови

Для иммунологического исследования венозную кровь забирали из локтевой вены в утренние часы, натощак. Имунофенотип лимфоцитов периферической крови определяли с помощью стандартизированной технологии с использованием проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США) [5]. Для процедуры гейтирования использовали комбинацию моноклональных панлейкоцитарных антител CD45⁺ и CD46⁺, для оценки содержания основных и минорных популяций лимфоцитов крови использовали следующие комбинации моноклональных антител: CD45/CD46/CD3 (Т-лимфоциты), CD45/CD46/CD3/CD4⁺ (Т-хелперы), CD45/CD46/CD3/CD8 (цитотоксические Т-лимфоциты), CD45/CD46/CD3/CD56 (NK- и TNK-клетки), CD45/CD46/CD19/CD5 (В-лимфоциты), CD45/CD46/CD3/CD4/CD25 (активированные Т-хелперы, ранняя активация), CD45/CD46/CD3/HLA-DR (активированные Т-лимфоциты, поздняя активация).

Статистическая обработка материала

Статистическую обработку материала проводили с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows vers. 10.0. (StatSoft Inc., США). Данные представляли в виде медианы и квартильного размаха, представляющего интервал вокруг медианного значения, содержащий 50% наблюдений (Me (Q_{0,25}–Q_{0,75})). Различия между показателями оценивали при помощи модуля непараметрической статистики, используя

критерий Манна–Уитни для независимых выборок, с учетом уровня значимости $p < 0,05$.

Результаты

Оценка показателей периферического отдела эритрона и эритроцитарных индексов показала отсутствие изменений во всех группах, за исключением снижения в группе ветеранов СВО показателя RDW-CV, характеризующего степень разброса эритроцитов по объему и свидетельствующего о некотором уменьшении объема эритроцитов от средней величины (табл. 1).

Отмечены изменения со стороны показателя гетерогенности тромбоцитов, отражающего изменение баланса форм тромбоцитов в 1-й группе, т. е. неоднородности клеток одного типа, а также снижение показателя среднего объема тромбоцитов, вероятно, свидетельствующего об уменьшении интенсивности тромбоцитопоэза, однако общее количество тромбоцитов и тромбоцит имела лишь тенденцию к снижению, не достигающую уровня статистической значимости. Дифференцированный аппаратный подсчет популяций лейкоцитов крови показал снижение процентного и абсолютного содержания лимфоцитов и повышение абсолютного количества моноцитов, что может отражать разнонаправленное действие регуляторов гемопоэтических клеток на отдельные линии дифференцировки мононуклеаров. В условиях острого стресса и постстрессовой дезадаптации организма в доступной литературе описаны стадии акцидентальной инволюции как корковой, так и медуллярной зон тимуса и лимфоцитопения в крови [6].

Известно, что в условиях стресса обнаруживается способность гемопоэтических цитокинов, в частности макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), эритропоэтина, тромбопоэтина, фактора некроза опухоли альфа (TNF α), интерферонов альфа и гамма (IFN α и IFN γ), трансформирующего фактора роста β (TGF- β), IL-6, IL-13, агонистов Toll-подобных рецепторов (TLR) детерминировать выбор линии происхождения и дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток (HSPCs) и их предшественников, посредством стимуляции фактора транскрипции NF- κ B, сигнальных путей Stat3 и Notch, являющихся универсальными регуляторами клеточного гомеостаза [16, 38]. Кроме того, экспериментально доказано, что IL-6 может продуцироваться HSPCs во время стимуляции костного мозга агонистами TLR и/или мезенхимальными и негемопоэтическими стволовыми клетками (МСК) и транслировать сигнал на соседние HSPCs для стимуляции миелопоэза. Однако одним из наиболее часто задействованных путей в регуляции индуцированного стрес-

сом кроветворения является ось TLR-MyD88/TRIF-NF- κ B [39].

Цитометрический анализ популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов показал значимое снижение относительного и абсолютного количества Т-хелперов и зрелых NK-клеток (CD3-CD56⁺CD16⁺CD25^{dim}), фенотипически отличающихся от TNK-лимфоцитов отсутствием Т-клеточного рецептора (CD3) в группе ветеранов СВО (табл. 2).

Снижение численности данных популяций лимфоцитов вполне объясняет наличие лимфопении и может свидетельствовать о дефиците адаптивного и врожденного компартов иммунной защиты в условиях пролонгированной реакции на стресс. Численность натуральных киллеров, обеспечивающих реализацию немедленных неспецифических реакций иммунной системы в большей степени, чем макрофаги, подвержена действию острого и хронического стрессового воздействия. Так, показано, что острый психоэмоциональный стресс снижает число NK-клеток в кровотоке и негативно влияет на способность фагоцитов к антигенной презентации [12].

При этом в группе ветеранов СВО установлено значимое, вероятно компенсаторное, повышение численности TNK-лимфоцитов, реализующих механизмы взаимодействия неспецифической и адаптивной иммунной реактивности. Известно, что, NKT-клетки одними из первых участвуют в распознавании аутоантигенов и чужеродных агентов. Наиболее мощным активатором инвариантных NKT (iNKT) клеток и модельным антигеном CD1d в условиях стресса является α -галактозилцерамид (α -GalCer), способный связываться с инвариантным Т-клеточным рецептором iNKT и индуцировать секрецию цитокинов разнонаправленной функциональной активности, в частности IFN γ и TNF α , обеспечивающих Th1-девиацию иммунного ответа, напротив, при индукции секреции IL-4 и IL-13 в сторону Th2-типа, в зависимости от типа и интенсивности входящих активирующих сигналов [31]. В то же время нарушение динамического равновесия между минорными субпопуляциями NKT-клеток детерминирует исход иммунного ответа, включая изменение баланса между субпопуляциями Th1/Th2.

Экспериментальные данные, полученные при моделировании ограничивающего стресса у мышей линии C57Bl/6 в течение 24 ч, показывают наличие лимфоцитопении за счет снижения числа Т-лимфоцитов и NK-клеток, цитотоксичность последних в отношении клеток-мишеней YAC-1 снижалась через 24 ч после стресса, в отличие от субпопуляции TNK-лимфоцитов, коли-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ РАСШИРЕННОЙ ГЕМОГРАММЫ У ВЕТЕРАНОВ СОВРЕМЕННЫХ БОЕВЫХ ДЕЙСТВИЙ,
Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. INDICATORS OF EXPANDED HEMOGRAM IN VETERANS OF MODERN COMBAT OPERATIONS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

| Параметры Parameters | 1-я группа. Ветераны специальной военной операции Group 1. Veterans of the special military operation n = 35 | 2-я группа. Ветераны Чеченской кампании Group 2. Veterans of the Chechen campaign n = 42 | 3-я группа. Контрольная Group 3. Control n = 20 |
|---|--|---|--|
| Эритроциты, $10^{12}/л$ Red blood cells, $10^{12}/L$ | 4,8 (4,6-5,3) | 4,9 (4,72-5,10) | 4,8 (4,6-5,1) |
| Концентрация гемоглобина, г/л Hemoglobin concentration, g/L | 142,6 (135,2-151,1) | 148,5 (141,1-155,1) | 143,8 (138,1-145,2) |
| Гематокрит, % Hematocrit, % | 44,5 (42,5-46,5) | 45,1 (43,1-47,1) | 44,3 (43,5-45,3) |
| Средний корпускулярный объем эритроцита, $10^{-15}/л$ (фемтолитр) Mean cell volume, $10^{-15}/L$ (fL) | 86,3 (79,6-94,8) | 90,5 (89,4-92,8) | 87,9 (86,2-90,1) |
| Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг Mean cell hemoglobin concentration, pg | 28,6 (27,5-29,3) | 29,8 (27,9-31,2) | 29,6 (28,4-31,9) |
| Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л Mean corpuscular hemoglobin concentration, g/L | 332,1 (328,1-335,2) | 330,2 (325,2-338,1) | 320,0 (315,1-334,4) |
| Распределение эритроцитов по объему, % Red cell distribution of width, % | 11,6 (11,3-12,0) | 13,9 (13,4-13,9)* | 13,7 (13,2-14,2)* |
| Количество тромбоцитов, $10^9/л$ Number of platelets, 10^9 cells/L | 234,8 (205,1-240,1) | 259,7 (229,1-287,3) | 250,8 (236,2-269,4) |
| Тромбоцитрит, % Thrombocrit, % | 0,26 (0,24-0,28) | 0,27 (0,24-0,30) | 0,29 (0,25-0,34) |
| Средний объем тромбоцита, фЛ Mean platelet volume, fL | 7,12 (6,9-7,4) | 10,1 (9,9-10,7)* | 10,0 (9,8-10,5)* |
| Ширина распределения тромбоцитов по объему, % Distribution width of platelets by volume, % | 11,7 (11,2-12,1) | 14,3 (14,2-14,3)* | 13,7 (13,5-14,2)* |
| Лейкоциты, $10^9/л$ White blood cells, $10^9/L$ | 6,3 (4,3-7,2) | 7,3 (5,3-8,2) | 7,2 (6,5-8,8) |
| Палочкоядерные нейтрофилы, % Rod-shaped neutrophils, % | 2,3 (2,0-3,2) | 3,8 (3,0-4,0) | 3,4 (3,0-4,0) |
| Сегментоядерные нейтрофилы, % Segmented neutrophils, % | 48,1 (39,2-56,3) | 48,0 (41,2-55,6) | 53,2 (46,3-60,3) |
| Эозинофилы, % Eosinophils, % | 4,8 (3,0-6,0) | 3,7 (3,0-4,0) | 3,8 (3,0-4,0) |
| Лимфоциты, % Lymphocytes, % | 29,8 (22,1-30,6) | 34,9 (32,1-39,2)* | 32,4 (30,2-35,4)* |
| Базофилы, % Basophils, % | 0,1 (0,0-0,1) | 0,1 (0,0-0,1) | 0,1 (0,0-0,1) |
| Гранулоциты, $10^9/л$ Granulocytes, $10^9/L$ | 3,6 (3,3-4,7) | 3,2 (2,5-4,5) | 3,1 (2,6-4,3) |
| Моноциты, $10^9/л$ Monocytes, $10^9/L$ | 1,5 (0,9-1,9) | 0,7 (0,62-0,86)* | 0,8 (0,68-1,01)* |
| Лимфоциты, $10^9/л$ Lymphocytes, $10^9/L$ | 1,9 (1,7-2,1) | 2,5 (2,3-3,1)* | 2,4 (2,3-3,1)* |

Примечание. * – значимые различия с 1-й группой при $p \leq 0,05$.

Note. *, significant differences with group 1 at $p \leq 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЛИМФОЦИТОВ В РАЗНЫХ КОГОРТАХ ВЕТЕРАНОВ СОВРЕМЕННЫХ ЛОКАЛЬНЫХ ВОЕННЫХ КОНФЛИКТОВ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. INDICATORS OF POPULATION HETEROGENEITY OF LYMPHOCYTES IN DIFFERENT COHORTS OF VETERANS OF MODERN LOCAL MILITARY CONFLICTS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

| Параметры Parameters | 1-я группа. Ветераны специальной военной операции Group 1. Veterans of the special military operation n = 35 | 2-я группа. Ветераны Чеченской кампании Group 2. Veterans of the Chechen campaign n = 42 | 3-я группа. Контрольная Group 3. Control n = 20 |
|--|---|---|--|
| Общее количество Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁻), отн., % Total number of T lymphocytes (CD46 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻), relative, % | 75,2 (69,7-78,7) | 74,3 (72,1-76,7) | 74,6 (72,9-75,0) |
| Общее количество Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁻), абс., 10⁶ кл/л Total number of T lymphocytes (CD46 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻), abs., 10 ⁶ cells/L | 1863,4 (1299,1-2187,0) | 2058,8 (1768,3-2390,0) | 1661,1 (1508,4-1860,1) |
| Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), отн., % T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), relative, % | 32,3 (24,7-33,7) | 35,2 (33,2-37,0)* | 38,8 (36,4-41,1)* |
| Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), абс., 10⁶ккл/л T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), abs., 10 ⁶ cells/L | 748,4 (621,2-849,1) | 894,1 (886,2-917,4)* | 881,6 (861,1-1025,8)* |
| Т-цитотоксические (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), отн., % T cytotoxic (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), relative, % | 25,5 (18,9-29,1) | 26,5 (23,7-29,3) | 27,8 (25,4-29,1) |
| Т-цитотоксические (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), 10⁶ кл/л T cytotoxic (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), 10 ⁶ cells/L | 556,8 (380,2-649,1) | 550,2 (429,1-652,3) | 516,2 (472,3-572,3) |
| Соотношение CD4⁺/CD8⁺, 10⁹/л CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio, 10 ⁹ /L | 1,25 (1,10-1,45) | 1,57 (1,47-1,77)* | 1,64 (1,55-1,80)* |
| TNK-лимфоциты (CD46⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺), отн., % TNK lymphocytes (CD46 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺), relative, % | 3,3 (2,3-4,6) | 1,54 (1,83-2,16)* | 1,92 (1,67-2,19)* |
| TNK-лимфоциты (CD46⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺), абс., 10⁶ кл/л TNK lymphocytes (CD46 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺), abs., 10 ⁶ cells/L | 76,6 (66,5-126,3) | 53,5 (39,14-63,80)* | 57,1 (47,4-65,4)* |
| НК-клетки (CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺), отн., % NK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺), relative, % | 6,2 (5,8-7,4) | 7,7 (7,3-8,1)* | 6,6 (6,5-6,7)* |
| НК-клетки (CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56⁺), абс., 10⁶ кл/л NK cells (CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺), abs., 10 ⁶ cells/L | 192,3 (185,6-202,5) | 218,9 (210,1-256,4)* | 234,2 (219,9-267,7)* |
| Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺ (ранняя активация), отн., % T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ (early activation), relative, % | 4,6 (3,2-5,8) | 10,5 (9,5-10,7)* | 10,1 (8,5-11,2)* |
| Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺ (ранняя активация), 10⁹ кл/л T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ (early activation), 10 ⁹ cells/L | 44,6 (23,3-61,2) | 85,9 (65,4-97,8)* | 87,8 (68,8-102,6)* |
| Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ (поздняя активация), отн., % T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ (late activation), relative, % | 3,17 (2,3-3,3) | 5,04 (4,90-5,15)* | 5,1 (4,3-5,5)* |

| Параметры Parameters | 1-я группа. Ветераны специальной военной операции Group 1. Veterans of the special military operation n = 35 | 2-я группа. Ветераны Чеченской кампании Group 2. Veterans of the Chechen campaign n = 42 | 3-я группа. Контрольная Group 3. Control n = 20 |
|--|---|---|--|
| Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ (поздняя активация), 10⁶ кл/л T lymphocytes CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ (late activation), 10 ⁶ cells/L | 29,7 (17,0-33,2) | 41,1 (33,6-47,3)* | 44,4 (37,2-53,5)* |
| Т-регуляторные клетки (CD45R0⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻), отн., % T regulatory cells (CD45R0 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻), relative, % | 3,6 (2,6-4,8) | 2,5 (1,9-2,6)* | 2,3 (2,2-2,3)* |
| Т-регуляторные клетки (CD45R0⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻), 10⁶ кл/л T regulatory cells (CD45R0 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻), 10 ⁶ cells/L | 53,7 (52,0-58,5) | 49,9 (38,2-51,4)* | 47,6 (40,7-50,2)* |
| Т-регуляторные клетки поздняя активация (CD45R0⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻HLA-DR⁺), отн., % T regulatory cells late activation (CD45R0 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ HLA-DR ⁺), relative, % | 0,63 (0,43-0,79) | 1,22 (0,74-1,35)* | 1,34 (0,95-1,44)* |
| Т-регуляторные клетки поздняя активация (CD45R0⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻HLA-DR⁺), абс., 10⁶ кл/л T regulatory cells late activation (CD 45 R0 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ HLA-DR ⁺), abs., 10 ⁶ cells/L | 7,5 (5,6-8,4) | 9,13 (8,12-11,30)* | 10,2 (9,3-11,9)* |
| Общее количество В-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁺), отн., % Total number of B lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺), relative, % | 10,3 (7,1-13,1) | 12,4 (11,40-13,12) | 11,8 (10,9-13,1) |
| Общее количество В-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺CD19⁺), 10⁶ кл/л Total number of B lymphocytes (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺), 10 ⁶ cells/L | 281,5 (187,1-324,2) | 350,2 (299,3-343,2) | 316,5 (279,2-318,2) |

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

чество и функциональная активность которых не изменялась, напротив, цитотоксичность НКТ-лимфоцитов в отношении сингенных тимоцитов возрастала параллельно с увеличением их доли, преимущественно путем аутореактивности через Fas-лиганд [25].

Также в группе ветеранов СВО отмечено значимое повышение субпопуляции Т-регуляторных клеток (Treg), отличающихся высокой экспрессией на мембране рецептора к интерлейкину-2 (IL-2R), способных ингибировать активацию CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов и ограничивать развертывание аутоиммунных реакций, обеспечивая формирование «периферической толерантно-

сти [4]. При стрессе транскрипционный фактор FoxP3 участвует в повышающей регуляции экспрессии индуцируемого глюкокортикоидами рецептора TNF (GITR) в линии Т-регуляторных клеток, потенцируя пролиферативную активность последних, физиологический смысл которой заключается в отсечении возможности перерастания иммунного ответа в аутоиммунную реакцию [22]. Кроме того, глюкокортикоиды повышают активность трансформирующего фактора роста β (TGF-β), подавляющего избыточную активацию Т-клеток и макрофагов [10, 13].

Вероятно, зафиксированное нами значимое снижение числа Т-хелперов и Т-регуляторных

клеток, несущих маркеры ранней (фенотип $CD45^+CD3^+CD4^+CD25^+$) и поздней позитивной активации: фенотип $CD45^+CD3^+CD4^+HLA-DR^+$ и $CD45^+CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127-HLA-DR^+$ в 1-й группе ветеранов СВО, в сравнении с ветеранами 2-й группы, носит ограничительный характер, предупреждая развитие не только аутоиммунных реакций, но и развитие стресс-индуцированного нейровоспаления. Однако в литературных источниках имеются данные о понижающей регуляции в отношении количества $CD45RA^+CCR7^+$ «наивных» и $CD45RA^-CCR7^+$ «центральных Т-клеток памяти» в ответ на острый психологический стресс, в то время как субпопуляция $CD45RA^-CCR7^-$ «эффektorных» и $CD45RA^+CCR7^-$ «терминально дифференцированных» эффektorных Т-клеток оставались стабильными или увеличивались. Авторы обнаружили, что острый психологический стресс вызывает сопутствующее снижение $CD4^+FoxP3^+Tregs$ и $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих Treg-родственные эффektorные молекулы, цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4 (CTLA-4) и латентно-ассоциированный пептид (LAP) [20]. Следует отметить, что между показателями группы сравнения, в которой лишь у 2% ветеранов имело место хроническое изменение личности, и контрольной практически отсутствуют значимые различия, что, вероятно, свидетельствует о нивелировании с течением времени остроты стресс-индуцированных нейроиммунных реакций.

Обсуждение

Нейробиология стресса, индуцированного различными видами стрессорного воздействия, в том числе военного стресса, активно изучается с позиций общегеномных ассоциативных исследований, изучающих на уровне геномики, эпигеномики факторы риска формирования нейропсихиатрических синдромов [21, 32]. Авторами показано, что стресс-индуцированная глюкокортикостероидная стимуляция Т-лимфоцитов *in vitro* сопровождается измененным транскрипционным ответом ядерного транскрипционного фактора активированных Т-лимфоцитов (nuclear factor of activated T cells cytoplasmic, NFATC1), что может способствовать развитию психопатологии, связанной со стрессом, включая ПТСР [32].

Недавние исследования показали, что в условиях стресс-индуцированного нейровоспаления многократно возрастает способность активированных макрофагов и дендритных клеток к продукции кинуренина. Последний, путем ферментативной модификации, приобретает нейротоксические свойства за счет трансформации в 3-гидроксикинуренин и хинолиновую кислоту.

Напротив, в физиологических условиях метаболиты кинуренина, в частности кинурениновая кислота, обладают свойствами нейропротектора. При этом отмечено, что в ситуации пролонгированного стресса нейротоксический путь метаболизма доминирует [19]. Исследования показали, что индуцируемая провоспалительными цитокинами в условиях острого стресса активация индоламин-2,3-диоксигеназы, участвующей в метаболизме триптофана на территории ЦНС ферментативно опосредует переход к когнитивным/аффективным расстройствам [7].

В свою очередь, имеются сведения о физиологической роли индоламин-2,3-диоксигеназы и связанного с ней кинуренина, tandemно регулирующих продукцию регуляторных Т-клеток клетками микроглии на территории ЦНС. Однако избыточная активация этого пути метаболизма триптофана может приводить к выработке нейроактивных метаболитов, которые потенциально способны негативно влиять на механизмы межнейронной передачи и нарушать нормальное функционирование нейронов, приводя к манифестации нейропсихиатрических расстройств [28].

Более того, показано, что в условиях стресс-индуцированного нейровоспаления Treg могут легко размножаться в ЦНС в течение длительного времени и создавать резидентную популяцию Treg в мозге при стимуляции микросреды, что подчеркивает потенциальную взаимосвязь между эволюцией иммунологической и неврологической систем [34].

Изучение нами фракции В-лимфоцитов в сравнительном аспекте не обнаружило значимых различий в количестве данных клеток в кровотоке. Однако известно, что с лимфопеническими реакциями, наблюдаемыми в периферической крови имеет место усиление грануло- и В-лимфопоэза в костном мозге, коррелирующее с уровнем стероидных гормонов в плазме крови [3].

Заключение

Таким образом, индуцированное стресс-медиаторами кроветворение и изменение количественного спектра субпопуляций лимфоцитов в крови является сложным и динамичным процессом, включающим гормональные и нейроиммунные влияния на процессы лимфопоэза, дифференцировки клеток, экспрессию адгезивных молекул лимфоцитов, выбор линии перекрестной сигнализации между HSPCs, стромальными клетками костного мозга и негемопоэтическими тканями и в целом отражающим наличие стресс-индуцированного нейровоспаления, ассоциированного с клиническими формами нейропсихиатрических расстройств.

Список литературы / References

1. Васильева А.В., Караваева Т.А., Лукошкина Е.П. Диагностика и терапия посттравматического стрессового расстройства в клинике пограничных расстройств и соматической медицине. В: Семенова Н.В. (сост.). Диагностика и лечение психических и наркологических расстройств: современные подходы. Сборник методических рекомендаций. Выпуск 2. СПб.: Издательско-полиграфическая компания «КОСТА», 2019. С. 300-324. [Vasilyeva A.V., Karavaeva T. A., Lukoshkina E. P. Diagnosis and therapy of post-traumatic stress disorder in the clinic of borderline disorders and somatic medicine. In: Semenova N.V. (comp.). Diagnosis and treatment of mental and narcological disorders: modern approaches. Collection of methodological recommendations. Issue 2]. St. Petersburg: Publishing and printing company "COSTA", 2019, pp. 300-324.
2. Васильева А.В., Караваева Т.А., Незнанов Н.Г., Идрисов К.А., Ковлен Д.В., Пономаренко Н.Г., Радионов Д.С., Старунская Д.А., Шойгу Ю.С. Посттравматическое стрессовое расстройство в парадигме доказательной медицины: патогенез, клиника, диагностика и терапия. СПб.: НМИЦ ПН им. В.М. Бехтерева, 2022. 33 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://bekhterev.ru/wp-content/uploads/2023/02/metodicheskie-rekomendacii-ptsr_karavaeva-protokol-10-ot-22.12.2022g.pdf. [Vasilyeva A.V., Karavaeva T.A., Neznanov N.G., Idrisov K.A., Kovlen D.V., Ponomarenko N.G., Radionov D.S., Starunskaya D.A., Shoigu Yu.S. Post-traumatic stress disorder in the paradigm of evidence-based medicine: pathogenesis, clinic, diagnosis and therapy]. St. Petersburg: NMIC MON named after V.M. Bekhterev, 2022. 33 p. [Electronic resource]. Available at: https://bekhterev.ru/wp-content/uploads/2023/02/metodicheskie-rekomendacii-ptsr_karavaeva-protokol-10-ot-22.12.2022g.pdf.
3. Верзакова Ю.А., Гиршфельд В.А. Изменение иммунного статуса в условиях стресса // Международный студенческий научный вестник, 2019. № 3. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://eduherald.ru/article/view?id=19623>. [Verzakova Yu.A., Girshfeld V.A. Changes in the immune status under stress. *Mezhdunarodnyy studencheskiy nauchnyy vestnik = International Student Scientific Bulletin*, 2019, no. 3. [Electronic resource]. Available at: <https://eduherald.ru/article/view?id=19623>. (In Russ.)]
4. Зурочка А.В., Давыдова Е.В., Цитометрический анализ субпопуляционного спектра Т-лимфоцитов при ранних формах хронической ишемии мозга у ветеранов современных войн // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 33-38. [Zurochka A.V., Davydova E.V., Cytometric analysis of the spectrum subpopulation of T lymphocytes in the early forms of chronic brain ischemia veterans of modern wars. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 33-38. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-33-38.
5. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2018. 720 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. Flowcytometry in biomedical research]. Yekaterinburg: RIO, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2018. 720 p.
6. Киселева Н.М., Кузьменко Л.Г., Нкане Нзола М.М. Стресс и лимфоциты // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2012. Т. 91, № 1. С. 137-143. [Kiseleva N.M., Kuzmenko L.G., NkaneNzola M.M. Stress and lymphocytes. *Pediatriya. Zhurnal im. G. N. Speranskogo = Pediatrics. Journal named after G.N. Speransky*, 2012, no. 1, pp. 137-143. (In Russ.)]
7. Комарова О.Н., Хавкин А.И. Взаимосвязь стресса, иммунитета и кишечной микробиоты // Педиатрическая фармакология, 2020. Т. 17, № 1. С. 18-24. [Komarova O.N., Khavkin A.I. Correlation Between Stress, Immunity and Intestinal Microbiota. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2020. Vol. 17, no. 1, pp. 18-24. (In Russ.)]
8. Крюков Е.В., Шамрей В.К. Военная психиатрия в XXI веке: современные проблемы и перспективы развития. СПб.: СпецЛит, 2022. 367 с. [Kryukov E.V., Shamrey V.K. Military psychiatry in the XXI century: modern problems and prospects of development]. St. Petersburg: SpetsLit, 2022. 367 p.
9. Резник А.М. Психические расстройства у ветеранов локальных войн, перенесших черепно-мозговую травму // Health, Food and Biotechnology, 2020. Т. 2, № 1. С. 11-23. [Reznik A.M. Mental disorders in veterans of local wars who suffered a traumatic brain injury. *Health, Food and Biotechnology = Health, Food and Biotechnology*, 2020, Vol. 2, no. 1, pp. 11-23. (In Russ.)]
10. Смирнова А.В., Корягина О.А. Стресс и физиологический ответ организма. Экзаменационный стресс у студентов // Международный студенческий научный вестник, 2019. № 2. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://eduherald.ru/ru/article/view?id=19612>. [Smirnova A.V., Koryagina O.A. Stress and the physiological response of the body. Exam stress among students. *Mezhdunarodnyy studencheskiy nauchnyy vestnik = International Student Scientific Bulletin*, 2019, no. 2. [Electronic resource]. Available at: <https://eduherald.ru/ru/article/view?id=19612>. (In Russ.)]
11. Сенявская Е.С. Фронтальной быт Великой Отечественной войны: структура и особенности // Вестник антропологии, 2021. № 2. С. 7-25. [Senyavskaya E.S. Frontline life of the Great Patriotic War: structure and features. *Vestnik antropologii = Bulletin of Anthropology*, 2021, no. 2. pp. 7-25. (In Russ.)]
12. Токарев А.Р. Нейро-цитокиновые механизмы острого стресса (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание, 2019. № 3. С. 194-204. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://elibrary.ru/zrwozp>. [Tokarev A.R. Neuro-cytokine mechanisms of acute stress (literature review). *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. Elektronnoe izdanie = Journal of New Medical Technologies. eEdition*, 2019, no. 3, pp. 194-204. [Electronic resource]. Available at: <https://elibrary.ru/zrwozp>. (In Russ.)]

13. Троицкий М.С. Стресс и психопатологии // Вестник новых медицинских технологий, 2016. № 4. С. 343-352. [Troitskiy M.S. Stress and psychopathology. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2016, no. 4, pp. 343-352. (In Russ.)]
14. Тучина О.П., Сидорова М.В., Туркин А.В., Швайко Д.А., Шалагинова И.Г., Ваколюк И.А. Молекулярные механизмы инициации и развития нейровоспаления в модели посттравматического стрессового расстройства // Гены и клетки, 2018. Т. 13, № 2. С. 47-55. [Tuchina O.P., Sidorova M.V., Turkin A.V., Shvayko D.A., Shalaginova I.G., Vakolyuk I.A. Molecular mechanisms of initiation and development of neuroinflammation in the model of posttraumatic stress disorder. *Geny i kletki = Genes and Cells*. 2018, Vol. 13, no. 2, pp. 47-55. (In Russ.)]
15. Bam M., Yang X., Busbee B.P., Aiello A.E., Uddin M., Ginsberg J.P., Galea S., Nagarkatti P.S., Nagarkatti M. Increased H3K4me3 methylation and decreased miR-7113-5p expression lead to enhanced Wnt/ β -catenin signaling in immune cells from PTSD patients leading to inflammatory phenotype. *Mol. Med.*, 2020, Vol. 26, 110. doi: 10.1186/s10020-020-00238-3.
16. Bujko K., Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Hematopoietic Stem and Progenitor Cells (HSPCs). *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, Vol. 1201, pp. 49-77.
17. Busbee P.B., Bam M., Yang X., Abdulla O.A., Zhou J., Ginsberg J.P., Aiello A.E., Uddin M., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. Dysregulated TP53 among PTSD patients leads to downregulation of miRNA let-7a and promotes an inflammatory Th17 phenotype. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 12, 815840. doi: 10.3389/fimmu.2021.815840.
18. Chen Y., An Q., Yang S.T., Chen Y.L., Tong L., Ji L.L. MicroRNA-124 attenuates PTSD-like behaviors and reduces the level of inflammatory cytokines by downregulating the expression of TRAF6 in the hippocampus of rats following single-prolonged stress. *Exp. Neurol.*, 2022, Vol. 356, 114154. doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114154.
19. Dantzer R. Role of the kynurenine metabolism pathway in inflammation-induced depression: preclinical approaches. *Curr. Top. Behav. Neurosci.*, 2017, Vol. 31, pp. 117-138.
20. Freier E., Weber C.S., Nowottn U., Horn C., Bartels K., Meyer S., Hildebrandt Y., Luetkens T., Cao Y., Pabst C., Muzzulini J., Schnee B., Brunner-Weinzierl M.C., Marangolo M., Bokemeyer C., Deter H.C., Atanackovic D. Decrease of CD4(+)FOXP3(+) T regulatory cells in the peripheral blood of human subjects undergoing a mental stressor. *Psychoneuroendocrinology*, 2010, Vol. 35, no. 5, pp. 663-673.
21. Gelernter J., Sun N., Polimanti R., Pietrzak R., Levey D.F., Bryois J., Lu Q., Hu Y., Li B., Radhakrishnan K., Aslan M., Cheung K.H., Li Y., Rajeevan N., Sayward F., Harrington K., Chen Q., Cho K., Pyarajan S., Sullivan P.F., Quaden R., Shi Y., Hunter-Zinck H., Gaziano J.M., Concato J., Zhao H., Stein M.B.; Department of Veterans Affairs Cooperative Studies Program (#575B) and Million Veteran Program. Genome-wide association study of post-traumatic stress disorder reexperiencing symptoms in >165,000 US veterans. *Nat. Neurosci.*, 2019, Vol. 22, no. 9, pp. 1394-1401.
22. Gerondakis S., Fulford T.S., Messina N.L., Grumont R.J. Corrigendum: NF- κ B control of T cell development. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 10, 1173. doi: 10.1038/ni1017-1173a.
23. Giotakos O. Neurobiology of emotional trauma. *Psychiatriki*, 2020, Vol. 31, no. 2, pp. 162-171.
24. Iqbal J., Huang G.D., Xue Y.X., Yang M., Jia X.J. The neural circuits and molecular mechanisms underlying fear dysregulation in posttraumatic stress disorder. *Front. Neurosci.*, 2023, Vol. 17, 1281401. doi: 10.3389/fnins.2023.1281401.
25. Jenne C.N., Lee W-Y., Léger C., Kubes P. Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke. *Science*, 2011, Vol 334, no. 6052, pp. 101-105.
26. Krabbe S., Grundemann J., Luthi A. Amygdala inhibitory circuits regulate associative fear conditioning. *Biol. Psychiatry*, 2018, Vol. 83, no. 10, pp. 800-809.
27. Li Y., Duan W., Chen Z. Latent profiles of the comorbidity of the symptoms for posttraumatic stress disorder and generalized anxiety disorder among children and adolescents who are susceptible to COVID-19. *Child Youth Serv. Rev.*, 2020, Vol. 116, 105235. doi: 10.1016/j.childyouth.2020.105235.
28. O'Farrell K., Harkin A. Stress-related regulation of the kynurenine pathway: Relevance to neuropsychiatric and degenerative disorders. *Neuropharmacology*, 2017, Vol. 112, Pt B, pp. 307-323.
29. Pasciuto E., Burton O.T., Roca C.P., Lagou V., Rajan W.D., Theys T., Mancuso R., Tito R.Y., Kouser L., Callaerts-Vegh Z., De La Fuente A.G., Prezzemolo T., Mascali L.G., Brajic A., Whyte C.E., Yshii L., Martinez-Muriana A., Naughton M., Young A., Moudra A., Lemaitre P., Poovathingal S., Raes J., de Strooper B., Fitzgerald D.C., Dooley J., Liston A. Microglia require CD4 T cells to complete the fetal-to-adult transition. *Cell*, 2020, Vol. 182, pp. 625-640.e24.
30. Rosen V., Ayers G. An update on the complexity and importance of accurately diagnosing post-traumatic stress disorder and comorbid traumatic brain injury. *Neurosci. Insights*, 2020, Vol. 15, 2633105520907895. doi: 10.1177/2633105520907895.
31. Satoh M., Iwabuchi K. Immunomodulatory functions of α -GalCer and a Derivative, α -Carba-GalCer. *Methods Mol. Biol.*, 2023, Vol. 2613, pp. 1-11.
32. Stein M.B., Levey D.F., Cheng Z., Wendt F.R., Harrington K., Pathak G.A., Cho K., Quaden R., Radhakrishnan K., Girgenti M.J., Ho Y.A., Posner D., Aslan M., Duman R.S., Zhao H. Department of Veterans Affairs Cooperative Studies Program (no. 575B); VA Million Veteran Program; Polimanti R., Concato J., Gelernter J. Genome-wide association analyses of post-traumatic stress disorder and its symptom subdomains in the Million Veteran Program. *Nat. Genet.*, 2021, Vol. 53, no. 2, pp. 174-184.

33. Tang W., Wang Y., Lu L., Lu Y., Xu J. Post-traumatic growth among 5195 adolescents at 8.5 years after exposure to the Wenchuan earthquake: roles of post-traumatic stress disorder and self-esteem. *J. Health Psychol.*, 2021, Vol. 26, pp. 2450-2459.
34. Xu Z., Zhang X., Chang H., Kong Y., Ni Y., Liu R., Zhang X., Hu Y., Yang Z., Hou M., Mao R., Liu W.T., Du Y., Yu S., Wang Z., Ji M., Zhou Z. Rescue of maternal immune activation-induced behavioral abnormalities in adult mouse offspring by pathogen-activated maternal Treg cells *Nat. Neurosci.*, 2021, Vol. 24, pp. 818-830.
35. Yan Y., Ramanan D., Rozenberg M., McGovern K., Rastelli D., Vijaykumar B., Yaghi O., Voisin T., Mosaheb M., Chiu I., Itzkovitz S., Rao M., Mathis D., Benoist C. Interleukin-6 produced by enteric neurons regulates the number and phenotype of microbe-responsive regulatory T cells in the gut. *Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 3, pp. 499-513.e5.
36. Yuan M., Liu B., Yang B., Dang W., Xie H., Lui S., Qiu C., Zhu H., Zhang W. Dysfunction of default mode network characterizes generalized anxiety disorder relative to social anxiety disorder and post-traumatic stress disorder. *J. Affect. Disord.*, 2023, Vol. 334, pp. 35-42.
37. Yshii L., Pasciuto E., Bielefeld P., Mascali L., Lemaitre P., Marino M., Dooley J., Kouser L., Verschoren S., Lagou V., Kemps H., Gervois P., de Boer A., Burton O.T., Wahis J., Verhaert J., Tareen S.H.K., Roca C.P., Singh K., Whyte C.E., Kerstens A., CallaertsVegh Z., Poovathingal S., Prezzemolo T., Wierda K., Dashwood A., Xie J., vanWanterghem E., Creemers E., Aloulou M., Gsell W., Abiega O., Munck S., Vandenbroucke R.E., Bronckaers A., Lemmens R., De Strooper B., Van Den Bosch L., Himmelreich U., Fitzsimons C.P., Holt M.G., Liston A. Astrocyte-targeted gene delivery of interleukin 2 specifically increases brain-resident regulatory T cell numbers and protects against pathological neuroinflammation. *Nat. Immunol.*, 2022, Vol. 23, no. 6, pp. 878-891.
38. Zhao J.L., Baltimore D. Regulation of stress-induced hematopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2015, Vol. 22, no. 4, pp. 286-292.
39. Zhao J.L., Ma C., O'Connell R.M., Mehta A., diLoreto R., Heath J.R., Baltimore D. Conversion of danger signals into cytokine signals by hematopoietic stem and progenitor cells for regulation of stress-induced hematopoiesis. *Cell Stem Cell*, 2014, Vol. 14, no. 4, pp. 445-459.

Авторы:

Пашнин С.Л. — врач-нейрохирург, заслуженный врач РФ, заведующий отделением нейрохирургии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Давыдова Е.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры медицинской реабилитации и спортивной медицины ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующая отделением ранней медицинской реабилитации ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Альтман Д.Ш. — д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, главный врач ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Зурочка В.А. — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург; старший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии Российско-Китайского центра ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», г. Челябинск, Россия

Журавлев И.Ю. — врач-нейрохирург отделения нейрохирургии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», г. Челябинск, Россия

Жакупова Я.Т. — к.психол.н., доцент, доцент кафедры психологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; клинический психолог ГБУЗ «Челябинский клинический терапевтический госпиталь для ветеранов войн», г. Челябинск, Россия

Authors:

Pashnin S.L., Neurosurgeon, Honored Physician of the Russian Federation, Head of the Department of Neurosurgery, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Davydova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Medical Rehabilitation and Sports Medicine, South Ural State Medical University; Head, Department of Early Medical Rehabilitation, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Altman D.Sh., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Physician of the Russian Federation, Chief Physician, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Zurochka V.A., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg; Senior Researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, Russian-Chinese Center, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

Zhuravlev I.Yu., Neurosurgeon, Department of Neurosurgery, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russian Federation

Zhakupova Ya.T., PhD (Psychology), Associate Professor, Department of Psychology, South Ural State Medical University; Clinical Psychologist, Chelyabinsk Clinical Therapeutic Hospital for War Veterans, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 18.01.2024
Отправлена на доработку 25.02.2024
Принята к печати 16.05.2025

Received 18.01.2024
Revision received 25.02.2024
Accepted 16.05.2025

ДЕПРИВАЦИЯ VEGF ВЛИЯЕТ НА ЭКСПРЕССИЮ ЭНДОГЛИНА В КЛЕТКАХ ТРОФОБЛАСТА И ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРАХ

**Тыщук Е.В., Денисова Е.А., Марко О.Б., Коган И.Ю., Сельков С.А.,
Соколов Д.И.**

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

Резюме. Белки семейства VEGF участвуют в развитии многих клеточных популяций: эндотелиальных клеток, моноцитов и макрофагов, стволовых клеток, опухолевых клеток, мышечных клеток стенок сосудов, клеток трофобласта и в целом любых клеток, экспрессирующих рецепторы к VEGF. Нарушения, затрагивающие продукцию белков VEGF и проведение сигналов от них, приводят ко многим патологическим состояниям, в том числе к аномалиям развития плаценты. Клетки трофобласта являются основной популяцией клеток, формирующей плаценту. Они вовлечены в процессы секреции и рецепции VEGF, фактора, необходимого для обеспечения ангиогенеза. Несмотря на это, на данный момент в литературе недостаточно данных о влиянии проведения сигналов от VEGF в клетках трофобласта на их функциональные особенности. Среди клеток окружения трофобласта, которые могут воздействовать на их активность в ходе беременности, особой группой являются материнские иммунные клетки, в частности НК-клетки. Принимая во внимание высокую численность НК-клеток в децидуальной оболочке, необходимо учитывать их вклад в изменение фенотипа клеток трофобласта. В настоящем исследовании изучалась экспрессия НК-клетками и клетками трофобласта белков MICA и MICB, а также рецептора CD105. Молекулы MICA и MICB являются маркерами стресса и позволяют судить о жизнеспособности клеток. Рецептор CD105 экспрессирован на поверхности некоторых популяций клеток и участвует в передаче сигнала от белков семейства TGF- β . В частности, показано, что эндоглин регулирует сигналинг от TGF- β путем направления сигнала через пути SMAD2/3 или SMAD1/5/8. Эндоглин, согласно литературе, ингибирует сигналинг, задействующий белок SMAD3. Играет ли эндоглин ту же роль в случае НК-клеток и трофобласта, неизвестно. Изучение изменений в экспрессии эндоглина является актуальной проблемой, поскольку сигналы от TGF- β необходимы при дифференцировке популяций трофобласта, а нарушения в механизмах сигналинга могут приводить к невынашиванию. В результате исследования мы показали, что VEGF играет роль в регуляции активности трофобласта и естественных киллеров. В частности, депривация

Адрес для переписки:

*Тыщук Елизавета Владимировна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и репродуктологии
имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (931) 963-85-78.
E-mail: lisatyshchuk@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Elizaveta V. Tyshchuk
D. Ott Research Institute of Obstetrics,
Gynecology and Reproductology
3 Mendeleev Line
St. Petersburg
199034 Russian Federation
Phone: +7 (931) 963-85-78.
E-mail: lisatyshchuk@yandex.ru*

Образец цитирования:

*Е.В. Тыщук, Е.А. Денисова, О.Б. Марко, И.Ю. Коган,
С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Депривация VEGF влияет
на экспрессию эндоглина в клетках трофобласта
и естественных киллерах» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 1099-1110.
doi: 10.15789/1563-0625-VDA-2991*

*© Тыщук Е.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*E.V. Tyshchuk, E.A. Denisova, O.B. Marko, I.Yu. Kogan,
S.A. Selkov, D.I. Sokolov "VEGF deprivation affects endoglin
expression in trophoblast cells and natural killers", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025,
Vol. 27, no. 5, pp. 1099-1110.
doi: 10.15789/1563-0625-VDA-2991*

*© Tyshchuk E.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-VDA-2991*

VEGF-A моноклональными антителами против этого цитокина при сокультивировании трофобласта и NK-клеток приводит к угнетению экспрессии CD105 обеими популяциями клеток. При этом суточная инкубация трофобласта с антителами к VEGF не вызывала изменений в их устойчивости к цитотоксической активности естественных киллеров. Вместе полученные результаты говорят о том, что депривация VEGF приводит к значимым изменениям в рецепции белков семейства TGF- β клетками трофобласта и естественными киллерами.

Ключевые слова: antiVEGF, CD105, эндоглин, NK-клетки, трофобласт, TGF- β

VEGF DEPRIVATION AFFECTS ENDOGLIN EXPRESSION IN TROPHOBLAST CELLS AND NATURAL KILLERS

Tyshchuk E.V., Denisova E.A., Marko O.B., Kogan I.Yu., Selkov S.A., Sokolov D.I.

D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) are a group of proteins involved in differentiation of various cell types including endothelial cells, monocytes, macrophages, stem cells, tumor cells, vascular smooth muscle cells, trophoblast cells, and other cell populations that express VEGF receptors. Pathological conditions, such as abnormalities in placental development, can be caused by altered production and signaling of VEGFs. Trophoblast cells play a significant role in placental formation and are essential for angiogenesis due to their secretion and reception of VEGF. However, there is a lack of information in the literature regarding the influence of VEGF on functional characteristics of trophoblast cells. Maternal immune cells, particularly natural killer (NK) cells, have been shown to affect the activity of trophoblasts during pregnancy. Given the high abundance of NK cells in decidual tissue, it is important to evaluate their potential influence on phenotype of trophoblast cells. In this study, we investigated the expression of MICA, MICB, and CD105 proteins by NK cells and trophoblast cells. MICA and MICB are stress markers that allow us to assess cell viability. CD105 is a receptor expressed on the surface of various cell types. It plays a role in signal transmission from TGF- β family proteins. In particular, endoglin has been shown to regulate signaling from TGF- β by directing signals through the SMAD2/3 or SMAD1/5/8 pathways. According to the literature, endoglin inhibits the SMAD3-mediated signaling. However, similar effects of endoglin have not been confirmed for NK cells and trophoblasts. The studies of endoglin expression levels are of importance, since the signals from TGF- β are essential for differentiation of trophoblast cells. Disruption of TGF- β signaling can lead to pregnancy complications and miscarriage. We have demonstrated that VEGF plays a role in regulating the activity of trophoblasts and NK cells. In particular, treatment with neutralizing monoclonal antibodies to VEGF-A was associated with reduced expression of CD105, a VEGF coreceptor, on trophoblasts and NK cells under co-culture conditions. However, pretreatment of trophoblasts with anti-VEGF antibodies did not alter their resistance to the cytotoxic activity of NK cells. Taken together, these findings suggest that inhibition of VEGF signaling results in significant changes in reception of TGF- β family proteins by trophoblasts and natural killer cells.

Keywords: antiVEGF, CD105, endoglin, NK cells, trophoblasts, TGF- β

This research was supported by the Fundamental Scientific Research project No. 122041500062-5, "Optimization of methods for predicting, preventing, and treating 'large obstetric syndromes' and delivery strategies for pregnant women in high-risk groups to improve obstetrical and perinatal outcomes", conducted at the D. Ott Research Institute of Obstetrics,

Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Introduction

Members of the VEGF family of proteins regulate vascular growth [3]. Many pathological conditions, including abnormalities of placenta development, are

associated with complications in the production of VEGF proteins and the transmission of signals from them [22]. There are three types of VEGF receptors: VEGFR1, which binds VEGF-A, VEGF-B, PlGF, and VEGF-F; VEGFR2, which binds VEGF-A, VEGF-E, VEGF-C, and VEGF-D; and VEGFR3, which binds VEGF-C and VEGF-D [28]. These receptors cause the activation of different signaling pathways in cells. The activation of VEGFR1 and VEGFR2 receptors is involved in the process of angiogenesis, both physiological and pathological, while VEGFR3 regulates the process of lymphangiogenesis [39].

Speaking about the participation of VEGFR1 and VEGFR2 in the regulation of angiogenesis, it should be noted that VEGFR2 plays a primary role in the activation of many processes in cells related to proliferation, migration and blood vessel formation. However, the involvement of VEGFR1 in these processes cannot be denied either, since experiments with the deletion of the murine gene encoding VEGFR1 resulted in pathological vascular development and the embryonic death [5, 11]. It has been shown that VEGFR1 has a much higher affinity for VEGF-A compared to VEGFR2. However, the level of phosphorylation of VEGFR1 after activation is lower than that of VEGFR2, which could explain the more active participation of VEGFR2 in the regulation of angiogenesis [17, 44]. Another characteristic of VEGFR1 is the existence of a soluble form of the receptor, sFlt1, which has an affinity for A-VEGF that is comparable to that of the membrane form [20]. Since increased VEGFR1 expression leads to a decrease in the concentration of VEGF-A available to bind to VEGFR2, VEGFR1 is thought to act as a regulator of signal transduction through VEGFR2 [26].

VEGF is involved in the development of various cell types, including endothelial cells, monocytes, macrophages, stem cells, tumor cells, vascular smooth muscle cells, trophoblast cells, and any other cells that express VEGF receptors [10, 28, 36]. VEGFR1 is also expressed by NK cells [6]. Many studies have shown high levels of VEGF-A expression in the placenta, particularly in macrophages, endometrial glandular cells, leukocytes, endothelial cells, vascular smooth muscle cells, in villous and extravillous trophoblasts, and in NK cells [8, 18, 19, 36, 37]. Disruption of VEGF signaling has been shown to be associated with pregnancy complications. For example, an increase in the concentration of sFlt1 in serum is a sign of preeclampsia, as it competes for VEGF binding with membrane VEGF receptors [7, 26, 51]. In addition, the intensity of VEGFR1 expression by syncytiotrophoblasts was found to be increased

in cases of preeclampsia, compared to healthy pregnancies [51].

Maternal immune cells, particularly NK cells, are an important group of cells in the trophoblast microenvironment. During the first trimester, this cell population accounts for approximately 70% of all leukocytes within the decidua, highlighting the significance of their functions [1]. NK cells play a crucial role in the transformation of uterine spiral arteries and the regulation of trophoblastic invasion into the uterine mucosa [33, 48]. As already mentioned, both trophoblasts and NK cells have receptors for VEGF and are capable of secreting VEGF. Therefore, they are able to regulate each other's activity in an autocrine and paracrine way.

The interaction between NK cells and trophoblasts is one of the key factors supporting the pregnancy, as these cells are involved in the development of placental tissue. In this regard, the investigation of interactions mediated by both secretory products and receptors of trophoblasts and NK cells is of great importance. In particular, in the field of reproductive medicine, a lot of studies have been focused on the synthesis and reception of VEGF, a factor necessary for angiogenesis. However, despite this, there are currently insufficient data in the literature on the effect of VEGF on the functional characteristics of these cells [38]. Therefore, **the aim of this study** was to evaluate the role of VEGF in maintaining the viability of trophoblast and NK cells. To achieve this goal, bevacizumab was used. It is an antibody that binds to the VEGF-A and prevents it from binding to its receptors [32]. Bevacizumab is already widely used to treat choroidal neovascularization and diabetes complications [30], as well as various tumors and other abnormal angiogenesis-related conditions [12, 16, 34]. In this study, we investigated the surface markers of NK cells and trophoblasts, specifically the MICA and MICB proteins. These proteins function as stress markers and help determine cell viability. Additionally, we studied the CD105 receptor, which is expressed on endothelial cells, trophoblasts, and other cell types. This receptor plays a role in the transmission of signals from TGF- β family proteins [23].

It has been demonstrated that signals from TGF- β play a crucial role during placentation as they are essential for the differentiation of trophoblast populations [15, 49]. Disruptions in signaling pathways can lead to pregnancy loss [45]. Using an endothelial cell model, it has been shown that endoglin regulates TGF- β signaling by directing the signal via the SMAD2/3 or SMAD1/5/8 pathways. Signaling along the SMAD1/5/8 pathway promotes proliferation and migration of endothelial cells, thereby stimulating angiogenesis. In contrast, activation of the SMAD2/3

pathway has an anti-angiogenic effect [23]. Endoglin, according to the literature, inhibits the signaling pathway involving the SMAD3 protein [14]. Whether endoglin plays a similar role in NK cells and trophoblasts is currently unknown. However, it has been demonstrated that SMAD proteins, which are involved in these signaling pathways, are active in trophoblast cells [4, 47], and only SMAD2/3 have been identified in NK cells [50].

Materials and methods

Cell lines

The study was conducted using the JEG-3 and NK-92 cell lines (ATCC, USA), which reflect the main characteristics of extravillous trophoblasts and natural killer cells, respectively [13, 21]. The cells were cultured according to the manufacturer's instructions (ATCC, USA). Recombinant IL-2 ('Roncoleukin', BIOTECH, St. Petersburg, Russia) was used as a growth factor for the NK-92 cells. Cell viability in all experimental settings was assessed using trypan blue staining. The viability was at least 95% for each experiment.

Inductors

Antibodies to VEGF (5000 nM, Avastin, F. Hoffmann – La Roche Ltd., Switzerland, Germany) were used as inducers.

Assessment of the phenotype of JEG-3 and NK-92 cells after incubation in the presence of anti-VEGF antibodies

JEG-3 cells were cultured in 5 mL of medium in 25 cm flasks (BD Biosciences, USA) with a density of 1×10^6 cells, for 48 hours. After this period, 1.5×10^6 NK-92 cells were pre-treated with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), in accordance with the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, USA). The cells were then added to part of the flasks. NK-92 cells, stained with CFSE, and intact JEG-3 cells were used as controls. After that, the mono- and co-cultured cells were treated with antibodies to VEGF. After a 22-hour incubation period, the JEG-3 cells were removed from the flasks using a scraper without using a trypsin-versene solution. The cells were treated with Fc-block reagent (Miltenyi Biotec, Spain) and monoclonal antibodies against CD94, CD45, CD105, MICA, MICB, NKG2D, and NKG2A (R&D, BD Biosciences, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Appropriate isotypic antibodies (R&D, BD Biosciences, USA) were used as a control for non-specific binding. The expression of the markers and cell fluorescence intensity were evaluated using a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, USA). There were four biological replicates with one technical replicate for each experiment.

Assessment of the cytotoxic activity of NK-92 cells toward JEG-3 cells

The cytotoxic activity was assessed as described previously [29]. JEG-3 cells were cultured in a flask at a concentration of $2.5 \times 10^5/10$ mL of medium. After 2 hours, antibodies to VEGF were added to the flask. After culturing for 22 hours, the JEG-3 cells were washed and stained with a CASE solution following the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, USA). The stained JEG-3 cells were removed from the flasks using trypsin and versene solution and then transferred to the wells of a 96-well round-bottom plate (BD Biosciences, USA). Next, NK-92 cells were added to the wells containing JEG-3 cells at a 10:1 ratio (effector:target). The plate was then centrifuged for 5 minutes at 100 g. After 4 hours of incubation, the cells were stained with a propidium iodide solution according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, USA). The percentage of dead JEG-3 cells was assessed using a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, USA) following a previously described gating strategy [29]. There were three biological replicates and two technical replicates in each experiment.

Statistical analysis

GraphPad Prism 8 software was used for statistical analysis. Statistical comparisons between groups were conducted using a non-parametric Mann–Whitney U test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

The expression of MICA and CD105 proteins by JEG-3 cells was altered in the presence of antibodies to VEGF and NK-92 cells

Analysis of the phenotype of JEG-3 cells revealed that approximately 12% of the cells express the MICB molecule, approximately 16% express MICA, and 18.5% express the CD105 receptor (Figure 1A).

The co-culture of JEG-3 cells with NK-92 cells, compared to monoculture, resulted in a two-fold increase in the percentage of JEG-3 cells expressing the CD105 receptor. The percentage of JEG-3 cells expressing MICA and MICB molecules remained unchanged under these conditions. Analysis of the mean fluorescence intensity after co-culture with NK-92 cells compared to monoculture showed no change in the expression intensity of MICA, MICB, and CD105 proteins by JEG-3. Analysis of the JEG-3 cells phenotype after its co-culture with NK-92 cells in the presence of antibodies to VEGF showed a decrease in the percentage of JEG-3 cells expressing MICA and CD105 proteins compared to the baseline level during co-cultivation. The percentage of JEG-3 cells

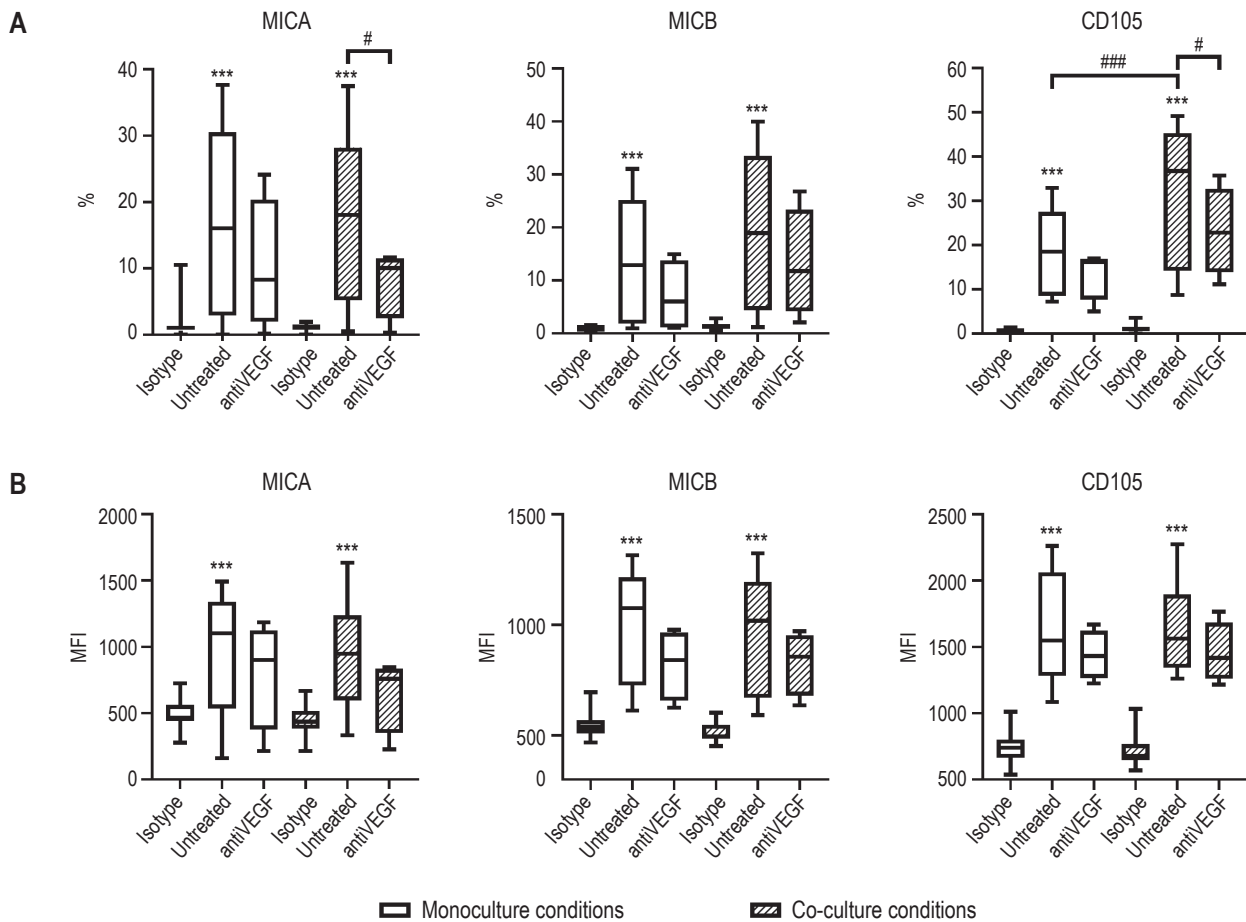


Figure 1. The percentage of trophoblast cells (JEG-3) expressing MICA, MICB, and CD105 proteins (A), and the intensity of expression of these markers (B) in the presence of antibodies against VEGF (antiVEGF) in mono- and co-culture with natural killer cells (NK-92)

Note. Differences from isotype control: ***, $p < 0.001$. Differences between groups: #, $p < 0.05$; ###, $p < 0.001$.

expressing the MICB receptor remained unchanged (Figure 1A).

Co-culture of JEG-3 cells with NK-92 cells, as well as treatment with antibodies to VEGF, did not affect the intensity of expression of MICA, MICB, and CD105 proteins by the cells (Figure 1B).

The phenotype of NK-92 cells was affected by the presence of antibodies to VEGF and JEG-3 cells

Analysis of the NK-92 cell phenotype has revealed that the entire population of studied cells expresses the NKG2D receptor on their surface and approximately 75% express the CD94 receptor. Additionally, the MICA protein has been found to be expressed on 1.5% of the cells, the MICB protein on 10.5%, and the CD105 protein on 26% (Figure 2).

When co-cultured with JEG-3 cells, NK cells reduced the expression level of CD94, compared to the level observed during monoculture, including in the presence of antibodies to VEGF. On the contrary, the percentage of NK-92 cells expressing the MICA

protein increased under conditions of co-culture compared with monoculture. The percentage of NK-92 cells expressing NKG2D, MICB, NKG2A, and CD105 molecules under co-culture conditions did not change compared to monoculture (Figure 2). The cultivation of NK-92 cells in the presence of antibodies to VEGF led to a decrease in the number of cells expressing the CD105 receptor (Figure 2).

Co-culture of NK-92 cells with JEG-3 cells showed an increase in the intensity of expression of NKG2D, CD94, and CD105 receptors by NK-92 cells compared to monoculture. The results indicate functional activation of NK cells in the presence of target cells. Additionally, the intensity of expression of MICA and MICB proteins by NK cells also increased under co-culture conditions (Figure 3). Treatment of NK cells with antibodies to VEGF, both in mono- and coculture, leads to a decrease in the intensity of expression of the CD105 receptor (Figure 3). This

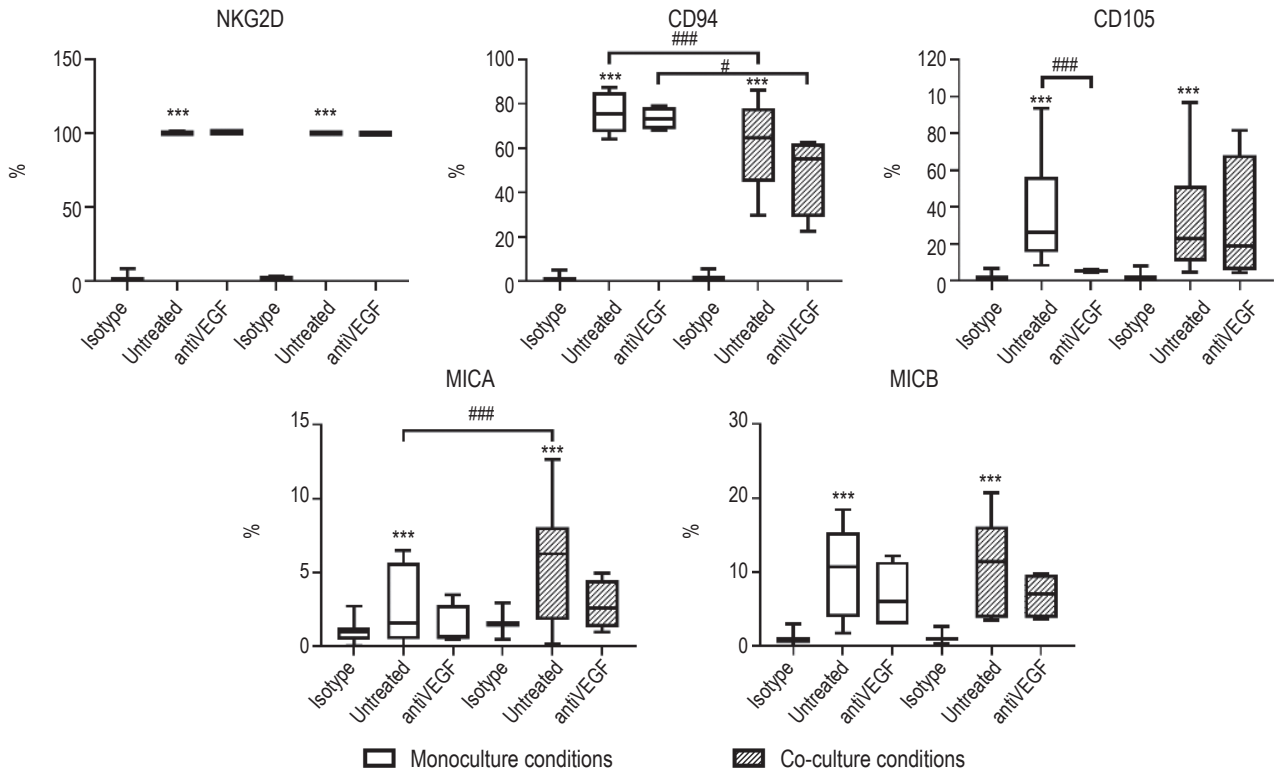


Figure 2. The percentage of natural killer cells (NK-92) expressing NKG2D, CD94, CD105, MICA, and MICB proteins in the presence of antibodies to VEGF (antiVEGF) in mono- and co-culture with trophoblast cells (JEG-3)

Note. Differences from isotype control: ***, $p < 0.001$. Differences between groups: #, $p < 0.05$; ###, $p < 0.001$.

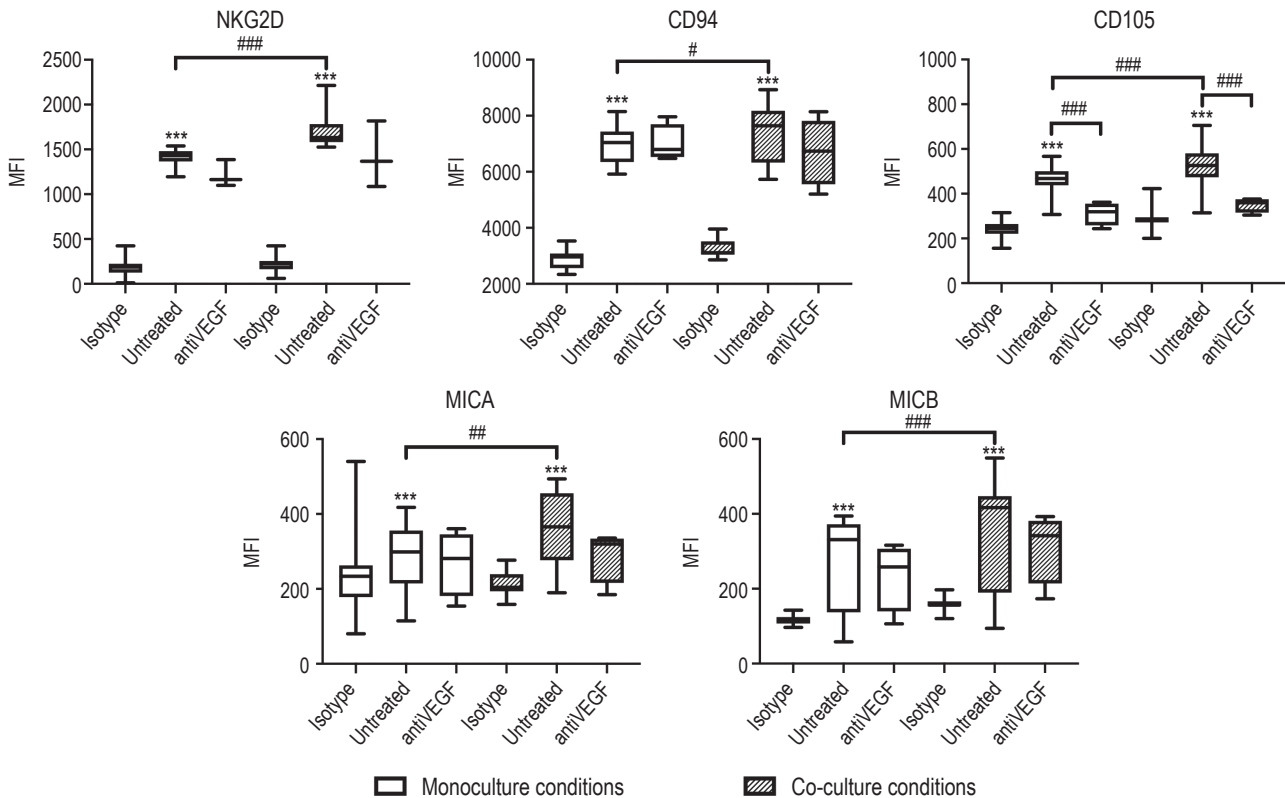


Figure 3. The intensity of expression of NKG2D, CD94, CD105, MICA, and MICB proteins by natural killer cells (NK-92) in the presence of antibodies against VEGF (antiVEGF) in mono- and co-culture with trophoblast cells (JEG-3)

Note. Differences from isotype control: ***, $p < 0.001$. Differences between groups: #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$.

result may suggest changes in TGF- β signaling in the absence of VEGF.

Pretreatment of JEG cells with antibodies to VEGF did not affect their survival in the presence of NK cells

Analysis of the cytotoxic activity of NK-92 cells toward JEG-3 cells showed that, in the presence of NK cells, the mortality rate of JEG-3 was higher than the baseline mortality rate. Pretreatment of JEG cells with antibodies to VEGF did not influence their viability in the presence of NK cells (Figure 4).

Discussion

Trophoblast cells and natural killer cells are important participants in the process of placentation. Both cell populations are capable of secretion and reception of VEGF. Previously, it has been found that VEGF affects the proliferation and survival of trophoblast cells [51]. VEGF also induces activation of NK cells adhesion [27]. Nevertheless, there is a lack of data in the literature on the role this factor plays in the cell activity. In this regard, we evaluated changes in the phenotype of JEG-3 trophoblast and NK-92 natural killer cells after their mono- or co-culture in the presence of antibodies to VEGF.

In this study, the expression of CD105, MICA, and MICB proteins was evaluated. Endoglin (CD105) is a coreceptor for TGF- β which regulates signal transmission from this factor via the SMAD2/3 or SMAD1/5/8 pathways [23, 24]. In particular, endoglin has been shown to activate signaling involving SMAD1/5/8 proteins and inhibit SMAD2/3 pathway [14, 35]. In endothelial cells, it has been demonstrated that signaling through the SMAD1/5/8 pathway promotes proliferation and migration of the cells, whereas activation of the SMAD2/3 pathway has an angiostatic effect [23]. Therefore, a high level of endoglin expression may indicate a more active transmission of signals through SMAD1/5/8 proteins compared to SMAD2/3. MICA and MICB are stress-induced molecules that are expressed by various cell populations, including immune cells [41]. An increase in the expression of these proteins was observed in tumor cells. MICA/B transcripts have been found in placental samples. The levels of mic mRNA are higher in samples taken from patients with preeclampsia compared to those from healthy patients [2, 42]. The analysis of the levels of expression of these markers allows us to assess the physiological state of trophoblast cells and monitor the conditions under which they experience stress.

In this work, we showed that JEG-3 trophoblast cells express all three markers. Under conditions of co-culture with NK cells, the number of trophoblast cells expressing endoglin increased. This result suggests a

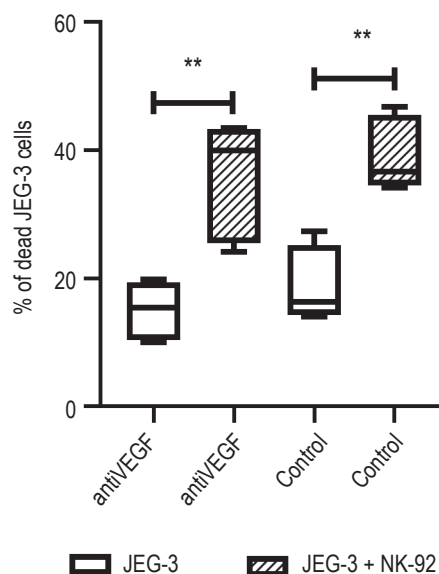


Figure 4. Cytotoxicity of NK-92 cells toward JEG-3 cells pretreated with antibodies to VEGF (antiVEGF)

Note. Significant differences: **, $p < 0,01$.

possible increased role for endoglin in mediating the transmission of TGF- β signals in trophoblast cells in the presence of natural killer cells. It also suggests a potential alteration in signaling pathways, from the SMAD2/3 pathway to the SMAD1/5/8, which may activate trophoblast proliferation. The treatment of the cell co-culture with antibodies to VEGF led to a decrease in the level of endoglin expression by trophoblasts to the initial level observed during monoculture. At the same time, under monoculture conditions, the endoglin level remained constant regardless of the presence of antibodies to VEGF. Apparently, TGF- β signaling is regulated by VEGF and its absence in the cell co-culture prevents the changes that occur in trophoblast cells when they are exposed to NK cells. It has also been shown that activation of SMAD2/3 in trophoblast cells leads to the secretion of VEGF-A [25]. Based on this, it can be assumed that trophoblast cells use the mechanism of suppression of CD105 expression in order to activate VEGF secretion.

Later, we evaluated how treatment of trophoblast cells with antibodies to VEGF affected their survival in the presence of natural killer cells. NK cells successfully killed trophoblast cells, however, treatment with the antibodies did not cause any changes in the resistance of trophoblast cells to the cytotoxic activity of NK cells. The results obtained suggest that VEGF deprivation leads to the previously described effects associated with changes in signal transduction from

TGF- β in trophoblast cells only when they are co-cultured with natural killer cells.

Not only NK cells are able to influence the activity of trophoblast, but trophoblast cells also play a role in placentation by activating various mechanisms that regulate NK cell function [40, 43, 46]. Taking this into account, we evaluated the effect of trophoblast cells and VEGF antibodies on the expression by NK cells of the activating NKG2D receptor (whose ligands are MICA/B molecules), CD94 receptor (whose ligand is the HLA-E molecule expressed by trophoblast), as well as MICA, MICB, and CD105 proteins. The analysis showed that treatment with the antibodies caused a decrease in the expression of CD105 by NK cells in both mono- and co-culture conditions. Since there is no data in the literature on the existence of the SMAD1/5/8 pathway in NK cells, it can be assumed that the treatment with antibodies to VEGF leads to a decrease in the role of endoglin in signaling from TGF- β . As a coreceptor, endoglin not only directs signals from TGF- β , but also regulates the strength of the binding between receptor and other proteins of TGF- β family, such as activin A, BMP-2, BMP-7, BMP-9, and BMP-10, which are also able to affect the cell functions [31].

Treatment with antibodies to VEGF did not affect the expression of the other studied markers by NK cells. Evaluation of the phenotype of NK cells showed that they expressed NKG2D at a high level, both when mono- and co-cultured with trophoblast. Evaluation of the phenotype of NK cells showed that they expressed NKG2D at a high level, both when mono- and co-cultured with trophoblast. In addition, the intensity of expression of this receptor increased upon co-culture conditions, suggesting that NK cells activate the NKG2D-MICA/B pathway when performing cytotoxic functions. As for the CD94 receptor, there was a decrease in the number of cells expressing this receptor following co-culture with trophoblast cells. However, the intensity of its expression increased, which may indicate the differentiation of NK cell populations under the influence of factors secreted by trophoblast cells. This results in the formation of cells that are more sensitive to the HLA-E ligand on the surface of trophoblast cells [9, 29]. With regard to MICA/B markers, it has been observed that their expression in NK cells was increased under co-culture

conditions. This is likely due to the cells undergoing a stress response.

Conclusion

Thus, VEGF plays an important role in regulating the activity of trophoblasts and natural killer cells. In particular, the lack of VEGF-A during trophoblast and NK cell co-culture leads to inhibition of CD105 expression by trophoblast cells, which can lead to activation of SMAD2/3 signaling pathways in cells that inhibit cell proliferation. At the same time, treatment of trophoblast cells with antibodies to VEGF for 22 hours did not cause changes in their resistance to the cytotoxic activity of natural killer cells. This suggests that antibodies to VEGF have an inhibitory effect on trophoblast cells only when they are co-cultured with NK cells. In addition, the isolation of VEGF using antibodies caused a decrease in the level of expression of CD105 by NK cells. This indicates that, in the absence of VEGF, the role of this coreceptor in TGF- β signaling decreases. Since the existence of the SMAD1/5/8 pathway in NK cells has not been established, it is possible that in the absence of endoglin, the sensitivity of these cells to other TGF family proteins, such as activin A and BMP-2, BMP-7, BMP-9, and BMP-10, may change. Together, the results indicate that VEGF deprivation causes significant changes in the reception of TGF- β family proteins by trophoblast cells and natural killer cells. In addition, the data obtained provide an experimental basis for the search for new diagnostic methods in certain forms of obstetric pathology, particularly preeclampsia. In this condition, the assessment of VEGF levels and its functional antagonists, sFlt and endoglin, is of great importance in understanding the pathogenesis of the disease.

Author contributions

Conceptualization, D.S.; methodology, E.T., E.D., O.M.; validation, E.T., D.S.; formal analysis, E.T., D.S.; investigation, E.T.; resources, D.S. and S.S.; data curation, D.S.; writing — original draft preparation, E.T., D.S.; writing — review and editing, S.S.; visualization, E.T., D.S.; supervision, D.S.; project administration, S.S., and D.S.; funding acquisition, I.K., D.S. and S.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

1. Ander S.E., Diamond M.S., Coyne C.B. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci. Immunol.*, 2019, Vol. 4, no. 31, eaat6114. doi: 10.1126/sciimmunol.aat6114.
2. Apps R., Gardner L., Traherne J., Male V., Moffett A. Natural-killer cell ligands at the maternal-fetal interface: UL-16 binding proteins, MHC class-I chain related molecules, HLA-F and CD48. *Hum. Reprod.*, 2008, Vol. 23, no. 11, pp. 2535-2548.

3. Apte R.S., Chen D.S., Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*, 2019, Vol. 176, no. 6, pp. 1248-1264.
4. Cabrera-Sharp V., Read J.E., Richardson S., Kowalski A.A., Antczak D.F., Cartwright J.E., Mukherjee A., de Mestre A.M. SMAD1/5 signaling in the early equine placenta regulates trophoblast differentiation and chorionic gonadotropin secretion. *Endocrinology*, 2014, Vol. 155, no. 8, pp. 3054-3064.
5. Chen D.B., Zheng J. Regulation of placental angiogenesis. *Microcirculation*, 2014, Vol. 21, no. 1, pp. 15-25.
6. Chen W.S., Kitson R.P., Goldfarb R.H. Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1). *In Vivo*, 2002, Vol. 16, no. 6, pp. 439-445.
7. Clark D.E., Smith S.K., He Y., Day K.A., Licence D.R., Corps A.N., Lammoglia R., Charnock-Jones D.S. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol. Reprod.*, 1998, Vol. 59, no. 6, pp. 1540-1548.
8. Clark D.E., Smith S.K., Licence D., Evans A.L., Charnock-Jones D.S. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J. Endocrinol.*, 1998, Vol. 159, no. 3, pp. 459-467.
9. Eidukaite A., Siaurys A., Tamosiunas V. Differential expression of KIR/NKAT2 and CD94 molecules on decidual and peripheral blood CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *Fertil. Steril.*, 2004, Vol. 81 Suppl. 1, pp. 863-868.
10. Fitzpatrick T.E., Lash G.E., Yanaihara A., Charnock-Jones D.S., Macdonald-Goodfellow S.K., Graham C.H. Inhibition of breast carcinoma and trophoblast cell invasiveness by vascular endothelial growth factor. *Exp. Cell Res.*, 2003, Vol. 283, no. 2, pp. 247-255.
11. Fong G.H., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 1995, Vol. 376, no. 6535, pp. 66-70.
12. Garcia J., Hurwitz H.I., Sandler A.B., Miles D., Coleman R.L., Deurloo R., Chinot O.L. Bevacizumab (Avastin) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat. Rev.*, 2020, Vol. 86, 102017. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102017.
13. Gong J.H., Maki G., Klingemann H.G. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 1994, Vol. 8, no. 4, pp. 652-658.
14. Guo B., Slevin M., Li C., Parameshwar S., Liu D., Kumar P., Bernabeu C., Kumar S. CD105 inhibits transforming growth factor-beta-Smad3 signalling. *Anticancer Res.*, 2004, Vol. 24, no. 3a, pp. 1337-1345.
15. Haider S., Lackner A.I., Dietrich B., Kunihs V., Haslinger P., Meinhardt G., Maxian T., Saleh L., Fiala C., Pollheimer J., Latos P.A., Knofler M. Transforming growth factor-beta signaling governs the differentiation program of extravillous trophoblasts in the developing human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2022, Vol. 119, no. 28, e2120667119. doi: 10.1073/pnas.2120667119.
16. Hurwitz H.I., Fehrenbacher L., Hainsworth J.D., Heim W., Berlin J., Holmgren E., Hambleton J., Novotny W.F., Kabbinavar F. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2005, Vol. 23, no. 15, pp. 3502-3508.
17. Ito N., Wernstedt C., Engstrom U., Claesson-Welsh L. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, no. 36, pp. 23410-23418.
18. Jackson M.R., Carney E.W., Lye S.J., Ritchie J.W. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta*, 1994, Vol. 15, no. 4, pp. 341-353.
19. Jin X., Mao L., Zhao W., Liu L., Li Y., Li D., Zhang Y., Du M. Decidualization-derived cAMP promotes decidual NK cells to be angiogenic phenotype. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2022, Vol. 88, no. 3, e13540. doi: 10.1111/aji.13540.
20. Kendall R.L., Wang G., Thomas K.A. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, Vol. 226, no. 2, pp. 324-328.
21. Kohler P.O., Bridson W.E. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1971, Vol. 32, no. 5, pp. 683-687.
22. Laakkonen J.P., Lahtenvuo J., Jauhiainen S., Heikura T., Yla-Herttuala S. Beyond endothelial cells: Vascular endothelial growth factors in heart, vascular anomalies and placenta. *Vascul. Pharmacol.*, 2019, Vol. 112, pp. 91-101.
23. Lebrin F., Goumans M.J., Jonker L., Carvalho R.L., Valdimarsdottir G., Thorikay M., Mummery C., Arthur H.M., ten Dijke P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.*, 2004, Vol. 23, no. 20, pp. 4018-4028.
24. Li D.Y., Sorensen L.K., Brooke B.S., Urness L.D., Davis E.C., Taylor D.G., Boak B.B., Wendel D.P. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*, 1999, Vol. 284, no. 5419, pp. 1534-1537.

25. Li Y., Zhu H., Klausen C., Peng B., Leung P.C. Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) Mediates Activin A-Induced Human Trophoblast Endothelial-Like Tube Formation. *Endocrinology*, 2015, Vol. 156, no. 11, pp. 4257-4268.
26. Maynard S.E., Min J.Y., Merchan J., Lim K.H., Li J., Mondal S., Libermann T.A., Morgan J.P., Sellke F.W., Stillman I.E., Epstein F.H., Sukhatme V.P., Karumanchi S.A. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 111, no. 5, pp. 649-658.
27. Melder R.J., Koenig G.C., Witwer B.P., Safabakhsh N., Munn L.L., Jain R.K. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat. Med.*, 1996, Vol. 2, no. 9, pp. 992-997.
28. Melincovici C.S., Bosca A.B., Susman S., Marginean M., Miha C., Istrate M., Moldovan I.M., Roman A.L., Miha C.M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 2018, Vol. 59, no. 2, pp. 455-467.
29. Mikhailova V., Khokhlova E., Grebenkina P., Salloum Z., Nikolaenkov I., Markova K., Davidova A., Selkov S., Sokolov D. NK-92 cells change their phenotype and function when cocultured with IL-15, IL-18 and trophoblast cells. *Immunobiology*, 2021, Vol. 226, no. 5, 152125. doi: 10.1016/j.imbio.2021.152125.
30. Naderan M., Sabzevary M., Rezaii K., Banafshehshah A., Hantoushzadeh S. Intravitreal anti-vascular endothelial growth factor medications during pregnancy: current perspective. *Int. Ophthalmol.*, 2021, Vol. 41, no. 2, pp. 743-751.
31. Nickel J., Ten Dijke P., Mueller T.D. TGF-beta family co-receptor function and signaling. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2018, Vol. 50, no. 1, pp. 12-36.
32. Papadopoulos N., Martin J., Ruan Q., Rafique A., Rosconi M.P., Shi E., Pyles E.A., Yancopoulos G.D., Stahl N., Wiegand S.J. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*, 2012, Vol. 15, no. 2, pp. 171-185.
33. Rajagopalan S., Long E.O. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 258. doi: 10.3389/fimmu.2012.00258.
34. Sandler A., Gray R., Perry M.C., Brahmer J., Schiller J.H., Dowlati A., Lilenbaum R., Johnson D.H. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2006, Vol. 355, no. 24, pp. 2542-2550.
35. Scherner O., Meurer S.K., Tihaa L., Gressner A.M., Weiskirchen R. Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *J. Biol. Chem.*, 2007, Vol. 282, no. 19, pp. 13934-13943.
36. Schiessl B., Innes B.A., Bulmer J.N., Otun H.A., Chadwick T.J., Robson S.C., Lash G.E. Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human placental bed throughout normal human pregnancy. *Placenta*, 2009, Vol. 30, no. 1, pp. 79-87.
37. Sharkey A.M., Charnock-Jones D.S., Boocock C.A., Brown K.D., Smith S.K. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J. Reprod. Fertil.*, 1993, Vol. 99, no. 2, pp. 609-615.
38. Sharma S., Godbole G., Modi D. Decidual Control of Trophoblast Invasion. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 75, no. 3, pp. 341-350.
39. Simons M., Gordon E., Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2016, Vol. 17, no. 10, pp. 611-625.
40. Tan H.X., Yang S.L., Li M.Q., Wang H.Y. Autophagy suppression of trophoblast cells induces pregnancy loss by activating decidual NK cytotoxicity and inhibiting trophoblast invasion. *Cell Commun. Signal.*, 2020, Vol. 18, no. 1, 73. doi: 10.1186/s12964-020-00579-w.
41. Trembath A.P., Markiewicz M.A. More than Decoration: roles for natural killer group 2 member d ligand expression by immune cells. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 231. doi: 10.3389/fimmu.2018.00231.
42. Vinnars M.T., Bjork E., Nagaev I., Ottander U., Bremme K., Holmlund U., Sverremark-Ekstrom E., Mincheva-Nilsson L. Enhanced Th1 and inflammatory mRNA responses upregulate NK cell cytotoxicity and NKG2D ligand expression in human pre-eclamptic placenta and target it for NK cell attack. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2018, Vol. 80, no. 1, e12969. doi: 10.1111/aji.12969.
43. Wallace A.E., Fraser R., Cartwright J.E. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum. Reprod. Update*, 2012, Vol. 18, no. 4, pp. 458-471.
44. Waltenerberger J., Claesson-Welsh L., Siegbahn A., Shibuya M., Heldin C.H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, 1994, Vol. 269, no. 43, pp. 26988-26995.

45. Wang J., Ding J., Zhang S., Chen X., Yan S., Zhang Y., Yin T. Decreased USP2a Expression Inhibits Trophoblast Invasion and Associates With Recurrent Miscarriage. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 17370. doi: 10.3389/fimmu.2021.717370.
46. Wang X.Q., Zhou W.J., Hou X.X., Fu Q., Li D.J. Trophoblast-derived CXCL16 induces M2 macrophage polarization that in turn inactivates NK cells at the maternal-fetal interface. *Cell. Mol. Immunol.*, 2018, Vol. 15, no. 12, pp. 1038-1046.
47. Wu D., Luo S., Wang Y., Zhuang L., Chen Y., Peng C. Smads in human trophoblast cells: expression, regulation and role in TGF-beta-induced transcriptional activity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2001, Vol. 175, no. 1-2, pp. 111-121.
48. Yang F., Zheng Q., Jin L. Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2317. doi: 10.3389/fimmu.2019.02317.
49. Yi Y., Cheng J.C., Klausen C., Leung P.C.K. TGF-beta1 inhibits human trophoblast cell invasion by upregulating cyclooxygenase-2. *Placenta*, 2018, Vol. 68, pp. 44-51.
50. Zhao J., Schlosser H.A., Wang Z., Qin J., Li J., Popp F., Popp M.C., Alakus H., Chon S.H., Hansen H.P., Neiss W.F., Jauch K.W., Bruns C.J., Zhao Y. Tumor-derived extracellular vesicles inhibit natural killer cell function in pancreatic cancer. *Cancers*, 2019, Vol. 11, no. 6, 874. doi: 10.3390/cancers11060874.
51. Zhou Y., McMaster M., Woo K., Janatpour M., Perry J., Karpanen T., Alitalo K., Damsky C., Fisher S.J. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am. J. Pathol.*, 2002, Vol. 160, no. 4, pp. 1405-1423.

Авторы:

Тыщук Е.В. — 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

Денисова Е.А. — сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий 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

Коган И.Ю. — д.м.н., директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Tyshchuk E.V., Junior Researcher, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Denisova E.A., Researcher, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of 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 of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Kogan I.Yu., PhD, MD (Medicine), Director, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

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

Соколов Д.И. — д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 23.04.2024
Принята к печати 14.09.2024

Received 23.04.2024
Accepted 14.09.2024

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ТРОМБОЦИТАРНО-МОНОЦИТАРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРИВЫЧНОГО НЕВЫНАШИВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Павлов О.В.¹, Чепанов С.В.¹, Корнюшина Е.А.¹, Шенгелия М.О.¹, Тхай Д.В.¹, Сельков С.А.^{1, 2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Привычное невынашивание беременности представляет собой существенную клиническую проблему, которая затрагивает 1-5% популяции, при этом в более чем половине случаев причина преждевременной потери беременности остается неизвестной. Одной из возможных причин является нарушение баланса в системе гемостаза матери, приводящее к тромбозу маточно-плацентарных сосудов, снижению перфузии плаценты и гипоксии. Изменения морфофункциональных свойств моноцитов и образующих ими и активированными тромбоцитами агрегатов могут являться факторами, приводящими к различным осложнениям беременности. Однако роль тромбоцитарно-моноцитарных комплексов (ТМК) в патогенезе привычного невынашивания беременности практически не изучена. Целью настоящего исследования было определение количественных изменений в содержании и фенотипических характеристиках ТМК периферической крови при привычном невынашивании беременности, а также оценка влияния тромбоцитов на экспрессию поверхностных белков-моноцитов при физиологическом и патологическом развитии беременности. Исследуемые группы составили женщины с диагнозом «привычный выкидыш», имеющие беременность 6-12 недель, и женщины с неосложненной беременностью (7-12 недель). В общей популяции и субпопуляциях моноцитов периферической крови пациенток методами проточной цитофлуориметрии определяли содержание ТМК и уровни экспрессии поверхностных антигенов: CD62P, CD11b, CD86, CD162, HLA-DR, TREM-1. Установлено, что при привычном невынашивании уровень ТМК повышен (26,5%) в сравнении с беременностью, протекающей без осложнений (15,3%), и это повышение происходит с участием всех трех субпопуляций моноцитов: классических, промежуточных и неклассических. На уровне общей популяции моноцитов в ТМК отмечалось снижение экспрессии HLA-DR и повышение уровня экспрессии CD11b, тогда как экспрессия CD62P, CD162, CD86 и TREM-1 существенно не изменялась. Субпопуляции моноцитов вносили различный вклад в изменение уровней экспрессии активацион-

Адрес для переписки:

Павлов Олег Владимирович
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.
Факс: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: ovpavlov@hotmail.com

Address for correspondence:

Oleg V. Pavlov
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
3 Mendeleev Line
St. Petersburg
199034 Russian Federation
Phone: +7 (812) 328-98-50.
Fax: +7 (812) 323-75-45.
E-mail: ovpavlov@hotmail.com

Образец цитирования:

О.В. Павлов, С.В. Чепанов, Е.А. Корнюшина, М.О. Шенгелия, Д.В. Тхай, С.А. Сельков «Возможная роль тромбоцитарно-моноцитарных комплексов в патогенезе привычного невынашивания беременности» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 1111-1126.
doi: 10.15789/1563-0625-PRO-2992

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

For citation:

O.V. Pavlov, S.V. Chepanov, E.A. Kornyuushina, M.O. Shengeliia, D.V. Tkhai, S.A. Selkov "Possible role of platelet-monocyte complexes in the pathogenesis of recurrent pregnancy loss", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 5, pp. 1111-1126.
doi: 10.15789/1563-0625-PRO-2992

© Pavlov O.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-PRO-2992

ных маркеров моноцитов, связанное с привычным невынашиванием, и эти изменения не всегда проявлялись на уровне всей популяции моноцитов. Сравнение ТМК и свободных моноцитов показало, что изменения поверхностного фенотипа моноцитов в составе ТМК обусловлены как влиянием тромбоцитов, так и другими факторами. При привычном невынашивании наблюдалось индуцированное тромбоцитами усиление адгезионных свойств моноцитов, что проявлялось в повышении уровня экспрессии CD11b. В то же время снижение уровня экспрессии HLA-DR в моноцитах не было вызвано взаимодействием с тромбоцитами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что привычное невынашивание беременности сопровождается повышением содержания ТМК в периферической крови и изменениями антигенного фенотипа моноцитов в составе ТМК, демонстрируют иммуномодуляторное влияние тромбоцитов, а также дают обоснования значимости определения паттернов экспрессии поверхностных антигенных маркеров ТМК в диагностических и терапевтических целях.

Ключевые слова: беременность, привычное невынашивание беременности, тромбоциты, моноциты, тромбоцитарно-моноцитарные комплексы, антигенный фенотип

POSSIBLE ROLE OF PLATELET-MONOCYTE COMPLEXES IN THE PATHOGENESIS OF RECURRENT PREGNANCY LOSS

Pavlov O.V.^a, Chepanov S.V.^a, Korniyushina E.A.^a, Shengeliia M.O.^a,
Tkhai D.V.^a, Selkov S.A.^{a, b}

^a D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Recurrent pregnancy loss (RPL) is a significant clinical problem that affects 1-5% of population. Moreover, the cause of RPL remains unknown in more than half of cases. Possible reasons include imbalanced maternal hemostasis, thrombosis of uteroplacental vessels, decreased placental perfusion and hypoxia. Changes in morphofunctional features of monocytes and platelet-monocyte aggregates may be the factors causing pregnancy complications. However, role of platelet-monocyte complexes (PMC) in pathogenesis of RPL is unknown. The purpose of our study was to determine quantitative changes in contents and antigenic phenotype of PMCs in peripheral blood of the patients with RPL, and to assess the effect of platelets on the expression of monocyte surface proteins in normal and pathological pregnancy. The study groups consisted of 6 to 12-week pregnant women diagnosed with RPL and females with uncomplicated pregnancy (7-12 weeks). PMC content and expression of CD62P, CD11b, CD86, CD162, HLA-DR, TREM-1 were determined in total cell population and subpopulations of peripheral blood monocytes using cytofluorimetry technique. It was found that PMC level was increased in patients with RPL (26.5%) compared to uncomplicated pregnancy (15.3%) with all monocyte subpopulations contributing to this increase. Decrease in HLA-DR expression and increase in CD11b expression was observed in total PMCs, while expression of CD62P, CD162, CD86 and TREM-1 did not change significantly. Monocyte subpopulations were differently involved into the RPL-associated expression of activation markers, while the changes detected in distinct subpopulations were not always evident in total monocyte populations in recurrent pregnancy loss. A comparison of PMC and free monocytes demonstrated that changes in surface phenotype of monocytes were caused by platelets and other exogenous factors. In patients with RPL, we observed platelet-induced increase in adhesive properties of monocytes which manifested as increased CD11b expression. In contrast, decrease in monocyte HLA-DR levels was not caused by platelets. The results obtained suggest that RPL is accompanied by increased level of peripheral blood PMC and changes in antigenic profile of platelet-associated and free monocytes, thus demonstrating the immunomodulatory effect of platelets, and also confirming the importance of determining expression patterns of surface antigenic markers of PMC for diagnostic and therapeutic purposes.

Keywords: pregnancy, recurrent pregnancy loss, platelets, monocytes, platelet-monocyte complexes, antigenic phenotype

Introduction

Recurrent pregnancy loss (recurrent miscarriage) is a significant clinical problem that affects 1-5% of the population, with approximately 80% of

pregnancy losses occurring before the 12th week of pregnancy [28]. Despite the progress made in studying this disease, more than half of cases are diagnosed as idiopathic miscarriage, the cause of which is

unknown [8]. In most cases of recurrent miscarriage, including those of unknown etiology, pathological changes in the uteroplacental complex are detected as thrombotic events and signs of inflammation [12]. One of the proposed pathophysiological mechanisms of pregnancy loss is an imbalance in the maternal hemostatic system, leading to thrombosis of the uteroplacental vessels, decreased placental perfusion and hypoxia. Maternal thrombophilia is considered as the cause of these changes, leading to obstetric disorders such as miscarriage, intrauterine growth retardation, intrauterine fetal death, preeclampsia [6, 31, 35]. Although doubts have been expressed about the existence of a cause-and-effect relationship between the thrombophilic condition and recurrent miscarriage [1], thrombophilia continues to be considered a risk factor for this disease [22].

Platelet-leukocyte complexes (PLC) are heterotypic cellular aggregates circulating in the peripheral blood. PLCs are a link between the hemostasis system and the immune system. Activation of platelets causes their degranulation, as a result of which P-selectin molecules (CD62P) are released from alpha granules onto the surface of the plasma membrane, forming a bond with the PSGL-1 ligand (CD162), which is constitutively expressed on the surface of leukocytes [34, 39, 43]. This connection is stabilized and strengthened by the interaction of other molecules on the surface of platelets and leukocytes, including MAC-1 (CD11b/CD18) [10, 36]. The crosstalk between platelets and leukocytes within PLC has a modulating effect on the functions of these cells, affecting their prothrombotic and proinflammatory properties respectively. Circulating PLC produce procoagulant, oxidative and mitogenic factors and can cause both capillary microembolism and arterial thrombosis [19].

The experimental data obtained indicate that PLC play a role in the pathogenesis of diseases characterized by thrombotic and inflammatory phenomena: cardiovascular diseases [3, 23, 44], ischemic stroke [18, 26, 37], diabetes mellitus [9, 13, 42], chronic obstructive pulmonary disease [2, 25], liver [32] and kidney [5, 11, 41] diseases, bacterial [20, 30, 40] and viral [16, 17, 21, 30] infections, pneumonia and thrombosis caused by the new coronavirus infection COVID-19 [7, 15, 38].

Until now, only one study was known in which changes in PLC content were determined in patients with recurrent pregnancy loss. The authors of this study found an increase in PLC levels in the peripheral blood of non-pregnant women with thrombophilia and previous history of recurrent miscarriage in the first trimester of pregnancy [24].

Platelet-monocyte complexes (PMC) are the most numerous and stable among the aggregates formed by platelets and leukocytes [33], and characterization of these complexes helps to identify their possible role in the development of various diseases, including reproductive pathologies. From this point of view,

PMC are of interest both as a diagnostic marker and as a therapeutic target.

Peripheral blood monocytes are divided into three subpopulations: the most numerous subpopulation of classical monocytes (CD14⁺⁺CD16⁻) and two minor fractions of intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺) and non-classical monocytes (CD14⁺CD16⁺⁺) [45]. Subpopulations of monocytes differ functionally, exhibit different patterns of expression of surface antigenic markers, cytokines and chemokines, and each subpopulation may have a distinct role under physiological and pathological conditions [27]. It can be assumed that subpopulations of monocytes interact with platelets in various ways, and PMCs formed by different fractions of monocytes play different roles in the pathogenesis of recurrent pregnancy loss.

The interaction of activated platelet with monocytes can result not only in an increase in the number of circulating TMCs, but also in morphofunctional changes affecting all monocytes or individual subpopulations and leading to disturbance of physiological processes. However, these changes may be due to the influence of other physiological (pathophysiological) factors, and it is necessary to distinguish between these ways of modulating monocyte properties and functions.

The purpose of this study was to determine quantitative changes in the content and phenotypic characteristics of PMC in the total population and individual subpopulations of peripheral blood monocytes in patients with recurrent pregnancy loss, as well as a comparative assessment of the effect of platelets on the expression of surface marker proteins of monocytes during the physiological and pathological development of pregnancy.

Materials and methods

Participant groups comprise pregnant women (6-12 weeks of gestation) with a history of recurrent pregnancy loss (RPL group) and women with uncomplicated (normal) 7-12-week pregnancy (NP group). The age of the patients ranged from 24 to 42 years. According to clinical guidelines, a recurrent pregnancy loss was considered to be a history of two or more clinical pregnancy losses within 22 weeks of gestation [29].

Peripheral blood samples were obtained from the antecubital vein by puncture with a 21G needle. To exclude post-traumatic platelet aggregation, the first 3 ml of blood was discarded. Blood was collected into a vacutainer containing 3.8% sodium citrate).

Within 20 minutes of collection, 100 µL of whole blood was incubated with the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: anti-CD45-PerCP, anti-CD14-AlexaFluor[®] 700, anti-CD41a-APC, anti-CD16-PE-Cy7[™], anti-CD62P-FITC, anti-CD86-FITC, anti-HLA-DR-FITC, anti-CD162-PE, anti-CD11b-PE, anti-TREM-1-PE

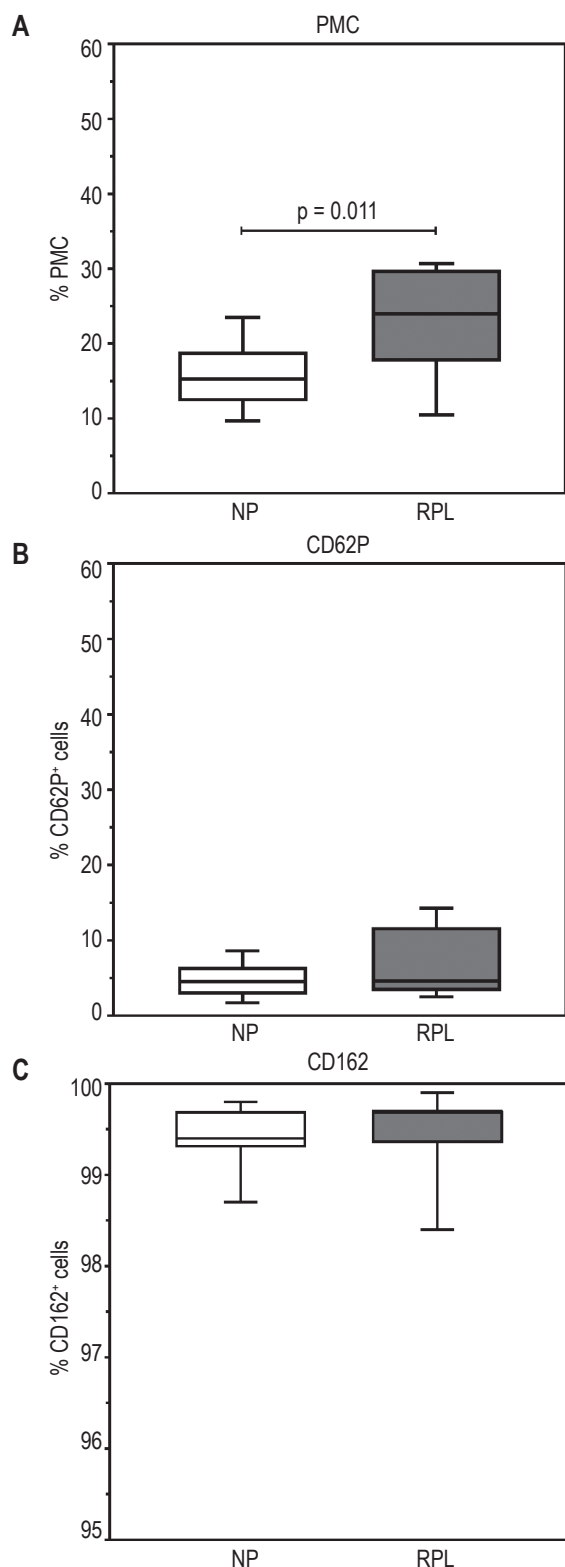


Figure 1. Characteristics of platelet-monocyte complexes in the total monocyte population

Note. Graphs demonstrate the proportion of platelet-monocyte complexes relative to the total monocytes in the peripheral blood (A) and the percentage of platelet-monocyte complexes expressing CD62P (B) and CD162 (C) in patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. Plots show the range, median, 25th and 75th percentile. NP, normal pregnancy; RPL, recurrent pregnancy loss.

(all – BD Biosciences, USA). Nonspecific antibodies labeled with appropriate fluorochromes were used as isotype control. The samples were incubated without stirring in the dark at room temperature for 20 minutes. Incubated for 20 min in the dark at room temperature. After incubation, erythrocytes were lysed by adding a tenfold volume of BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences, USA). The samples were centrifuged (300 g, 5 min), the supernatant was collected, and the cell pellet was resuspended in 200 μ L of BD FACS™ Lysing Solution.

The samples were analyzed using a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA). The obtained data were processed using FACSDiva software (BD Biosciences, USA). On a two-dimensional histogram with SSC/CD45 coordinates, a region corresponding to monocytes was identified, in which 20,000 events were analyzed. To identify free monocytes and PMC, the selected region was analyzed on a two-dimensional histogram with CD14/CD41a coordinates. Events with the CD14⁺CD41a⁻ phenotype were classified as free monocytes; PMC were defined as events with double positive CD14⁺CD41a⁺ staining. The expression of surface antigens was determined in each population using specific monoclonal antibodies.

To identify monocyte subpopulations, the corresponding region on the two-dimensional histogram SSC/CD45 was projected onto a two-dimensional CD14/CD16 histogram, where three monocyte fractions were identified: classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺) and non-classical (CD14⁺CD16⁺⁺). Free monocytes and PMC were determined in each subpopulation by the absence or presence of CD41a, respectively, as well as the expression of surface antigen markers.

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 8.0.1 statistical software package (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Variables were assessed for normality using the Shapiro–Wilk test. Parametric and nonparametric (Mann–Whitney) tests were used to assess differences between groups. Paired t-test and non-parametric Wilcoxon test were used to compare the phenotypic characteristics of PMC-associated and free monocytes. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$.

Results

In the peripheral blood obtained from RPL group the proportion of PMC reached 26.5%, while in NP group PMC accounted for 15.3% (Figure 1A). PMC are formed primarily through the interaction of P-selectin (CD62), expressed by activated platelets, with the PSGL-1 ligand (CD162) on the surface of the monocyte. We did not find statistically significant changes in the number of PMC expressing CD62P and CD162 in patients with recurrent miscarriage.

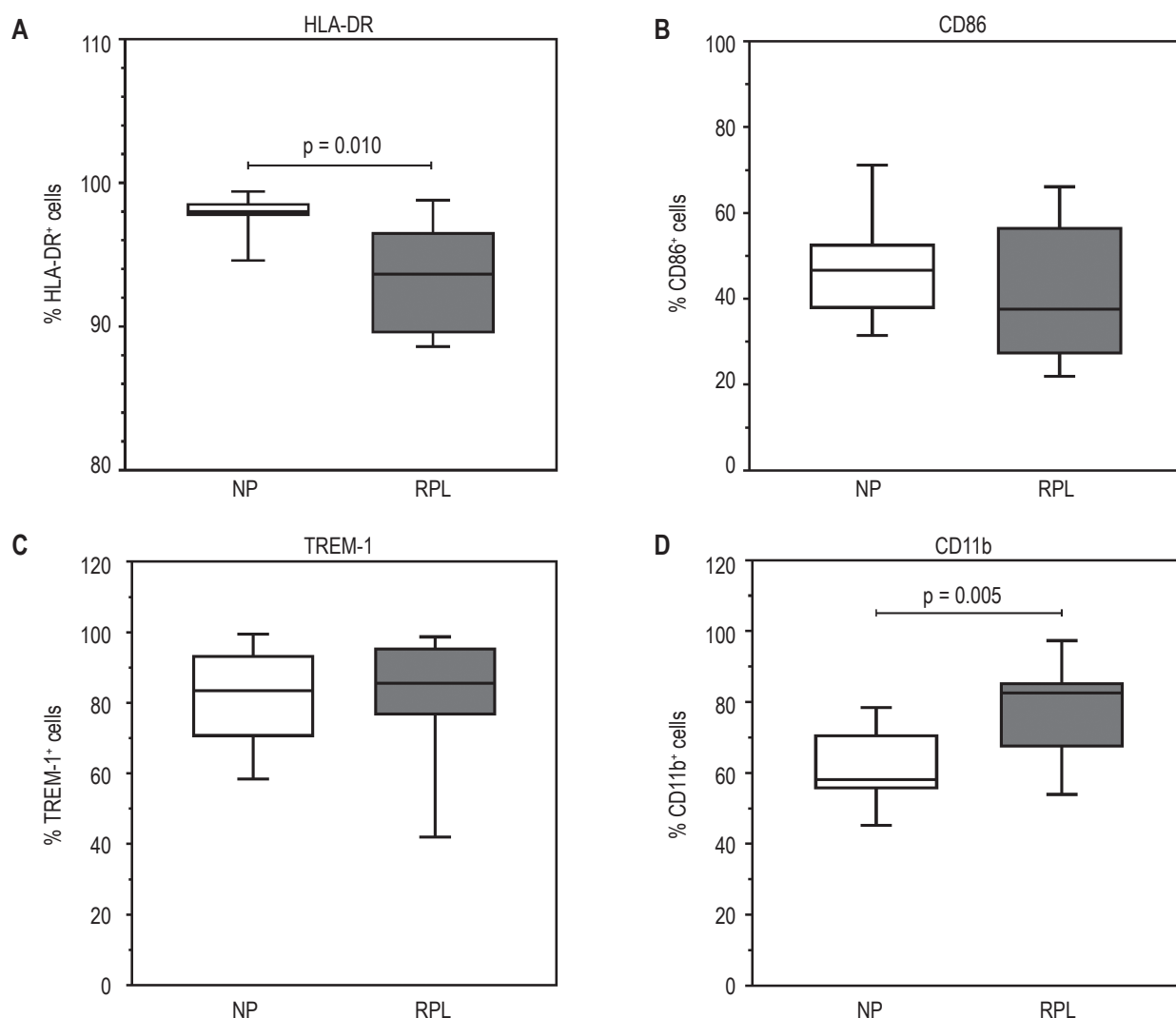


Figure 2. Expression of activation markers of platelet-monocyte complexes in the total monocyte population

Note. Diagrams demonstrate the percentage of platelet-monocyte complexes expressing HLA-DR (A), CD86 (B), TREM-1 (C) and CD11b (D) in the peripheral blood of patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. Plots show range, median, 25th and 75th percentile. NP, normal pregnancy; RPL, recurrent pregnancy loss.

The percentage of CD62P⁺ and CD162⁺ PMC in both studied groups was about 5% and 99%, respectively (Figure 1B, C).

Increased expression of major histocompatibility complex molecule HLA-DR and costimulatory molecule CD86 are signs of monocyte activation associated with an inflammatory response. In both RPL and NP groups, the vast majority of PMC were positive for HLA-DR, however, in RPL patients there was a small but statistically significant decrease in the amount of HLA-DR⁺ PMC (93.7%) compared to NP group (98.0%) (Figure 2A). Staining with anti-CD86 antibodies revealed no differences in the expression of this marker: the proportion of CD86⁺ TMCs in NP and RPL patients was 44.7% and 37.6%, respectively (Figure 2B).

TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1) is present on the surface of monocytes. Activation of this receptor stimulates the production of cytokines and chemokines and contributes to the development of the inflammatory response [4]. The interaction of TREM-1 with its ligand ensures the link between leukocytes and platelets [14]. Our study showed that recurrent miscarriage did not accompanied with significant changes in TREM-1 expression: ~85% TREM-1⁺ PMC was determined in both groups of patients (Figure 2C).

While in NP group the proportion of CD11b-expressing PMC was 58.1%, patients with recurrent pregnancy loss demonstrated significant increase up to 82.5% (Figure 2D). CD11b is part of the multifunctional integrin α M β 2 (Mac-1), which, in particular, mediates monocyte functions such as adhesion and phagocytosis. An increase in the

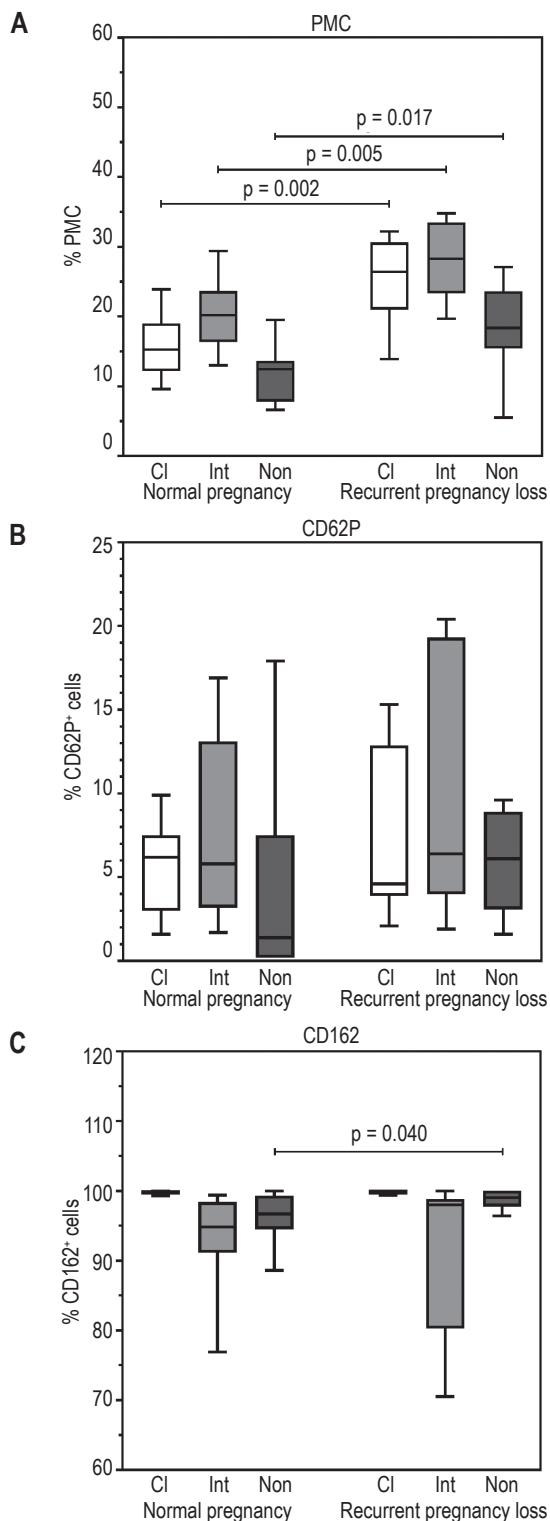


Figure 3. Characteristics of platelet-monocyte complexes in monocyte subsets

Note. Graphs demonstrate the proportion of platelet-monocyte complexes (A) and the percentage of platelet-monocyte complexes expressing CD62P (B) and CD162 (C) in the classical (CD14⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺CD16⁺), and non-classical (CD14⁻CD16⁺) monocyte subsets in the patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. Plots show range, median, 25th and 75th percentile. CI, classical monocytes; Int, intermediate monocytes; Non, non-classical monocytes.

expression of CD11b by monocytes in recurrent miscarriage may indicate an increase in their adhesion potential, resulting in an increased risk of thrombosis and damaging effects on the vascular endothelium.

Analyses of monocyte subpopulations showed that in RPL group all three monocyte fractions contribute to the increase in the number of platelet-monocyte aggregates (Figure 3A). Classical, intermediate and non-classical monocytes accounted for 15.3%, 20.2%, 12.5% PMC, respectively, in NP group and 26.4%, 28.3%, 18.4% PMC, respectively, in RPL group. In both groups, the largest and the lowest proportions of PMC were formed by intermediate and non-classical monocytes, respectively, and this difference was more prominent in RPL group ($p < 0.001$) than in NP group ($p < 0.05$). Similar to the total monocyte population, all three monocyte subsets demonstrated no differences in CD62P expression between the studied groups (Figure 3B). Moreover, in RPL patients, an increase in the expression of CD162 by a minor subpopulation of non-classical monocytes was observed (Figure 3C). Meanwhile, in the classical monocytes decreased HLA-DR⁺ expression (95.4%) was detected in RPL group when compared to NP group (99.4%) (Figure 4A). In the same fraction, a decrease in CD86⁺ PMC from 52.2% to 38.8%, was observed however, it did not reach statistical significance (Figure 4B). In RPL group no significant changes were found in the expression of HLA-DR and CD86 in PMC formed by intermediate and non-classical monocytes (Figure 4A, B), while expression of TREM-1 was significantly increased in the PMC formed by non-classical monocytes (Figure 4C).

CD11b was the only marker whose expression increased in all three monocyte subsets. In classical, intermediate and non-classical monocyte fractions, the proportions of CD11b⁺ PMC was 86.8%, 29.0% and 30.7%, respectively, in RPL group and 66.4%, 16.3% and 16.0%, respectively, in NP group (Figure 4D).

In order to find out whether the observed phenotypic (and putative functional) changes in PMC-associated monocytes were induced by their direct interaction with platelets or whether these changes were caused by other factors and did not depend on the formation of platelet-monocyte aggregates, we made a comparison of expression patterns of surface antigens between PMC and free monocytes in blood samples obtained from RPL and NP patients.

In NP group, formation of PMC led to a small but statistically significant decrease in the level of CD162 expression in the total monocyte population, while in RPL group this did not occur (Figure 5A). However, analysis of monocyte subpopulations showed that in both studied groups monocyte-platelet interactions attenuated CD162 expression in classical and intermediate monocytes (Figure 5B). In patients with normal pregnancy, the interaction of monocytes with platelets (PMC formation) led to a decrease in

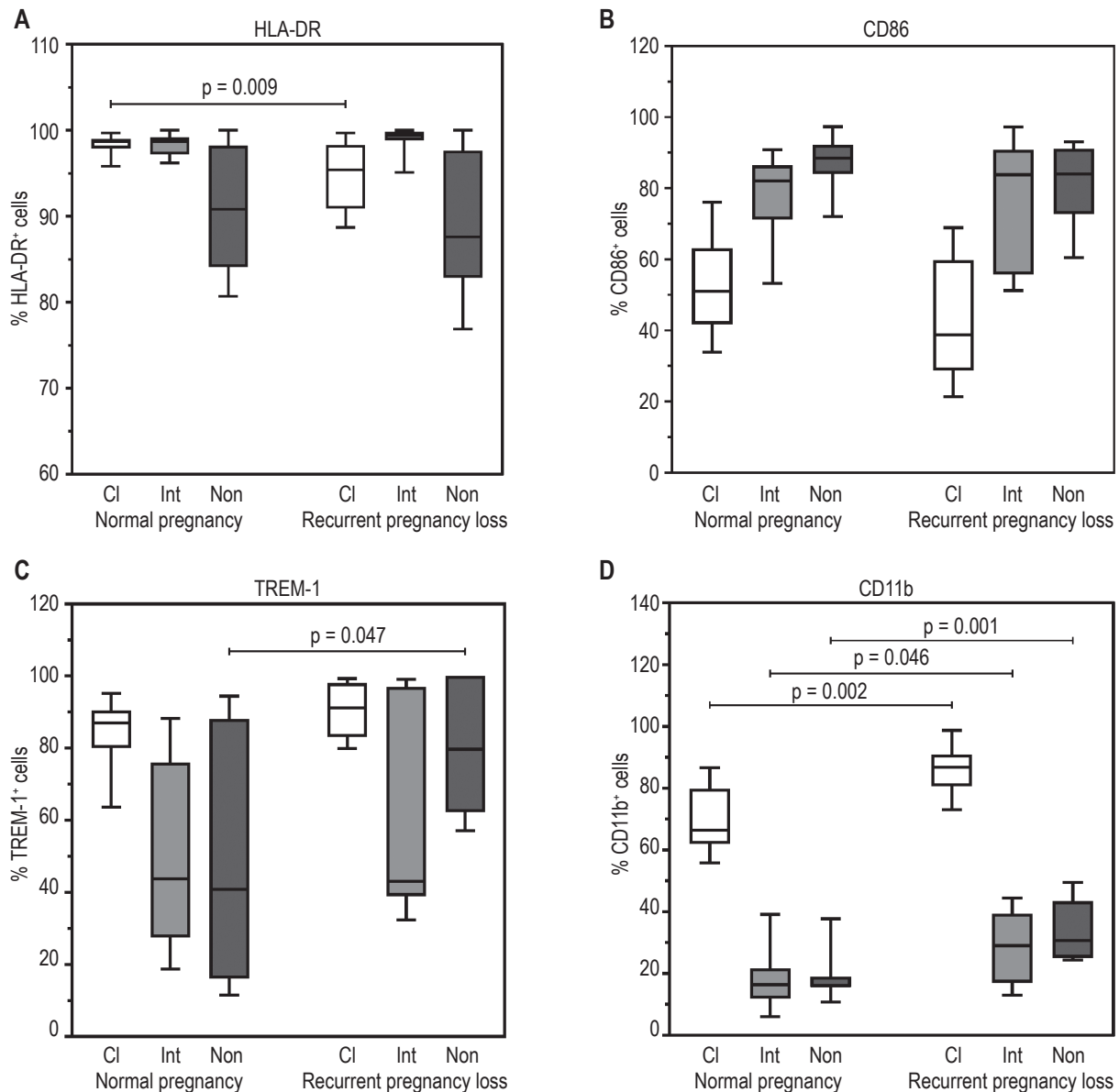


Figure 4. Expression of activation markers of platelet-monocyte complexes in monocyte subsets

Note. Diagrams demonstrate the percentage of platelet-monocyte complexes expressing HLA-DR (A), CD86 (B), TREM-1 (C) and CD11b (D) in the classical (CD14⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺CD16⁺), and non-classical (CD14⁺CD16⁺) monocyte subsets in the patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. Plots show range, median, 25th and 75th percentile. CI, classical monocytes; Int, intermediate monocytes; Non, non-classical monocytes.

the number of cells expressing activation markers HLA-DR and CD86, while in patients with recurrent miscarriage this change affected only CD86, but not HLA-DR (Figure 6A, 7A). A decrease in HLA-DR expression was observed in all three subpopulations of monocytes in NP group, while in RPL group HLA-DR expression decreased in non-classical monocytes only, and this change did not manifest itself at the level of total monocyte population (Figure 6B). In NP group, the number of CD86⁺ cells decreased in all subpopulations, and in RPL group the changes occurred in the fractions of classical and non-classical monocytes (Figure 7B). Platelets had a

stimulating effect on the expression of TREM-1 by monocytes: in both groups of patients, the proportion of TREM-1 positive PMC increased (Figure 8A). This increase was ensured by classical monocytes, while multidirectional changes in TREM-1 expression was observed in subpopulations of intermediate and non-classical monocytes (Figure 8B). In the total monocyte population, formation of PMC did not significantly affected CD11b expression (Figure 9A). The absence of changes was observed in all monocyte subpopulations, with one exception: in RPL group, the proportion of CD11b⁺ non-classical monocytes significantly increased from 20% to 28% (Figure 9B).

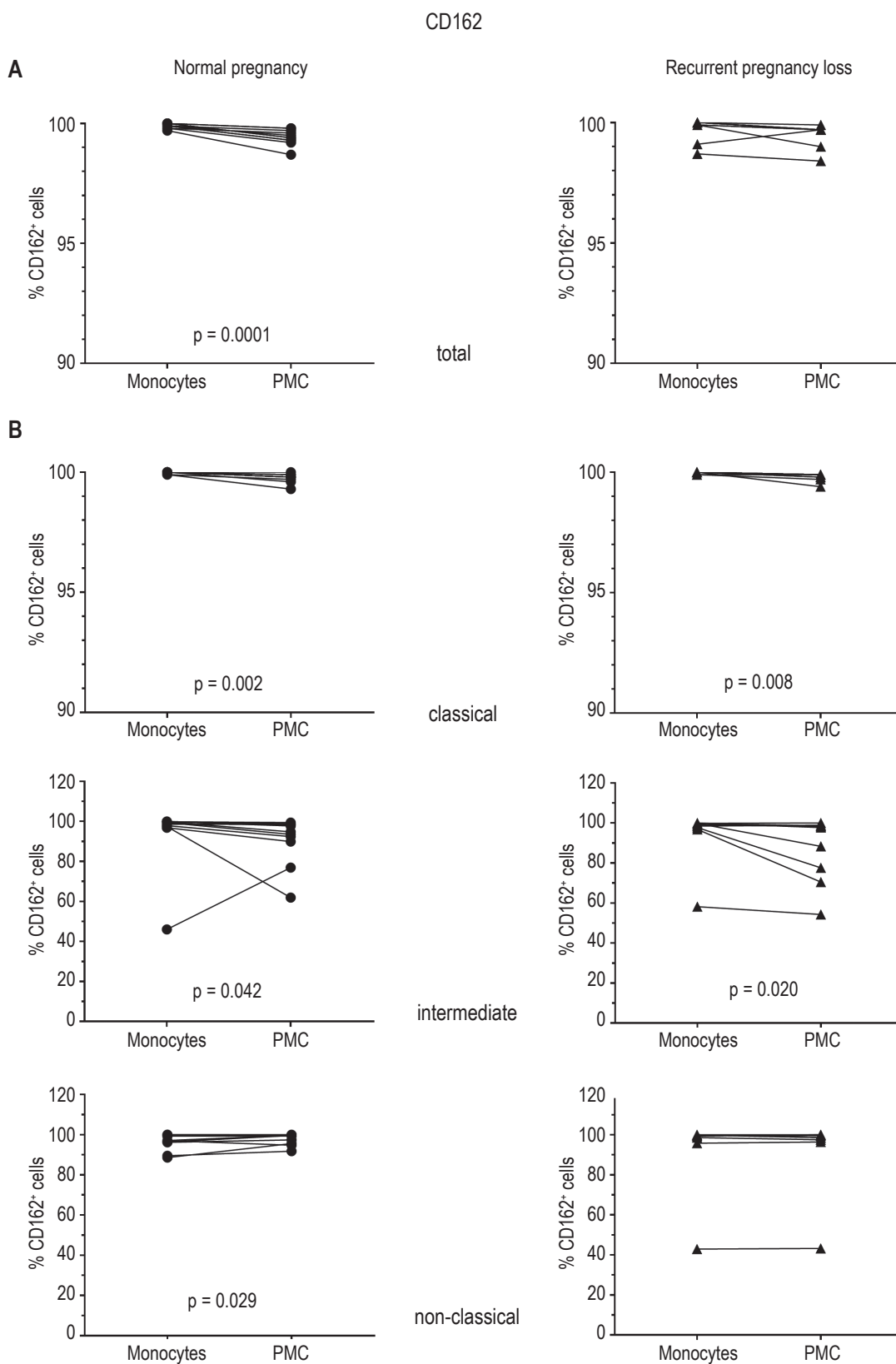


Figure 5. CD162 expression in monocytes and platelet-monocyte complexes

Note. Graphs demonstrate pairwise comparison of CD162 expression levels (percentage of CD162⁺ cells) on the surface of free and platelet-associated monocytes in the patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. A, total monocytes; B, monocyte subsets.

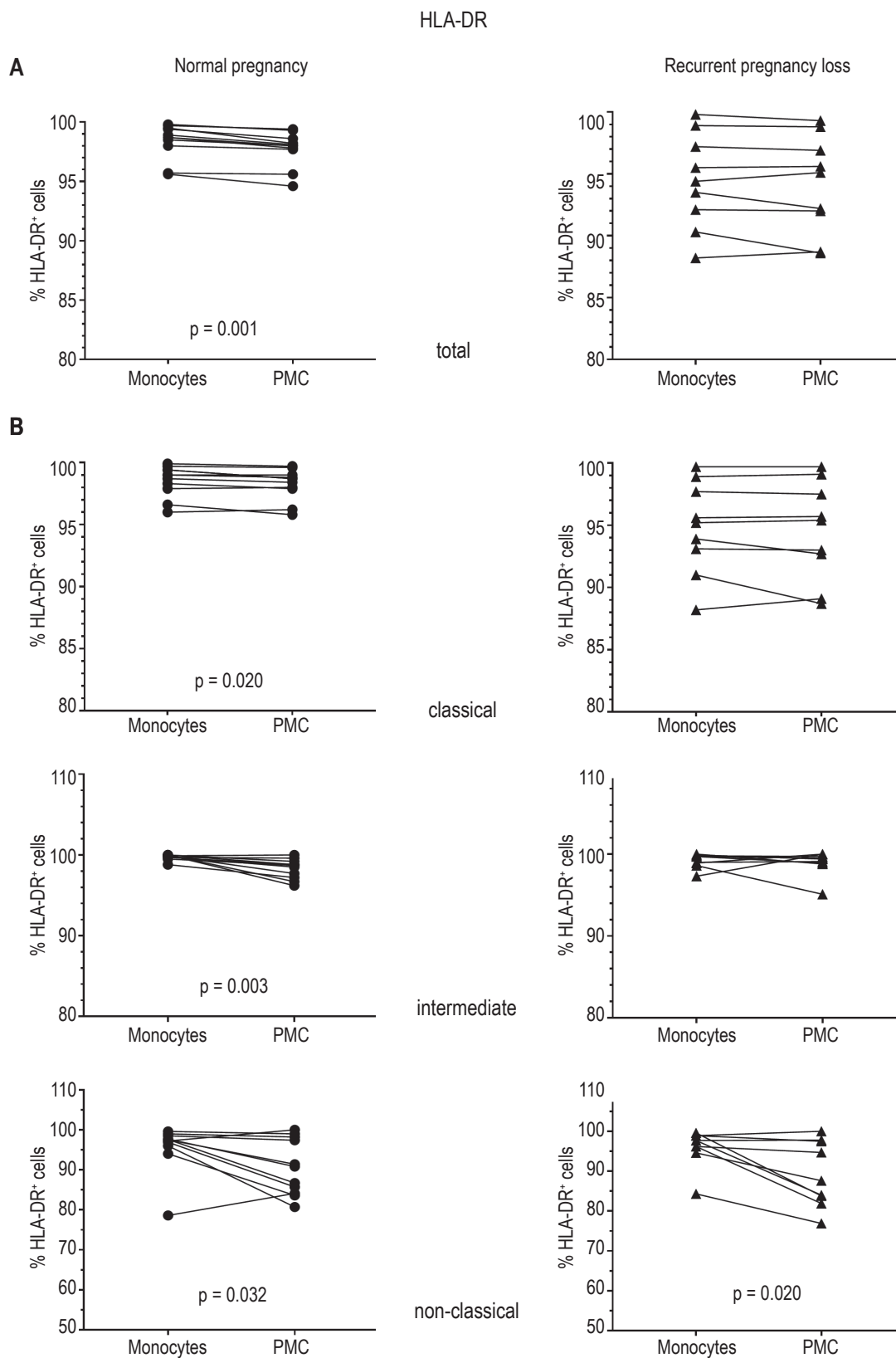


Figure 6. HLA-DR expression in monocytes and platelet-monocyte complexes

Note. Graphs demonstrate pairwise comparison of HLA-DR expression levels (percentage of HLA-DR⁺ cells) on the surface of free and platelet-associated monocytes in the patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. A, total monocytes; B, monocyte subsets.

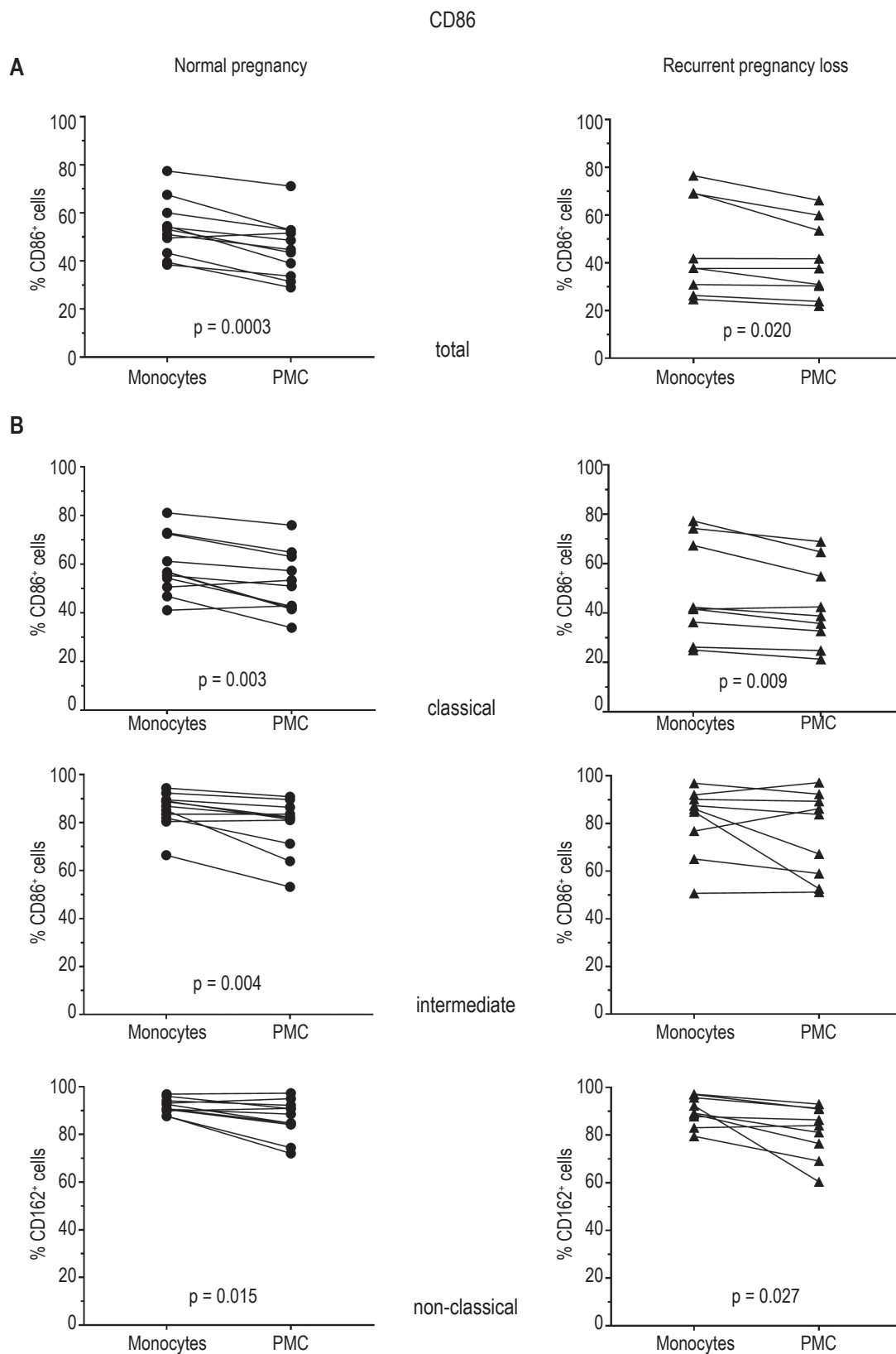


Figure 7. CD86 expression in monocytes and platelet-monocyte complexes

Note. Graphs demonstrate pairwise comparison of CD86 expression levels (percentage of CD86⁺ cells) on the surface of free and platelet-associated monocytes in the patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. A, total monocytes; B, monocyte subsets.

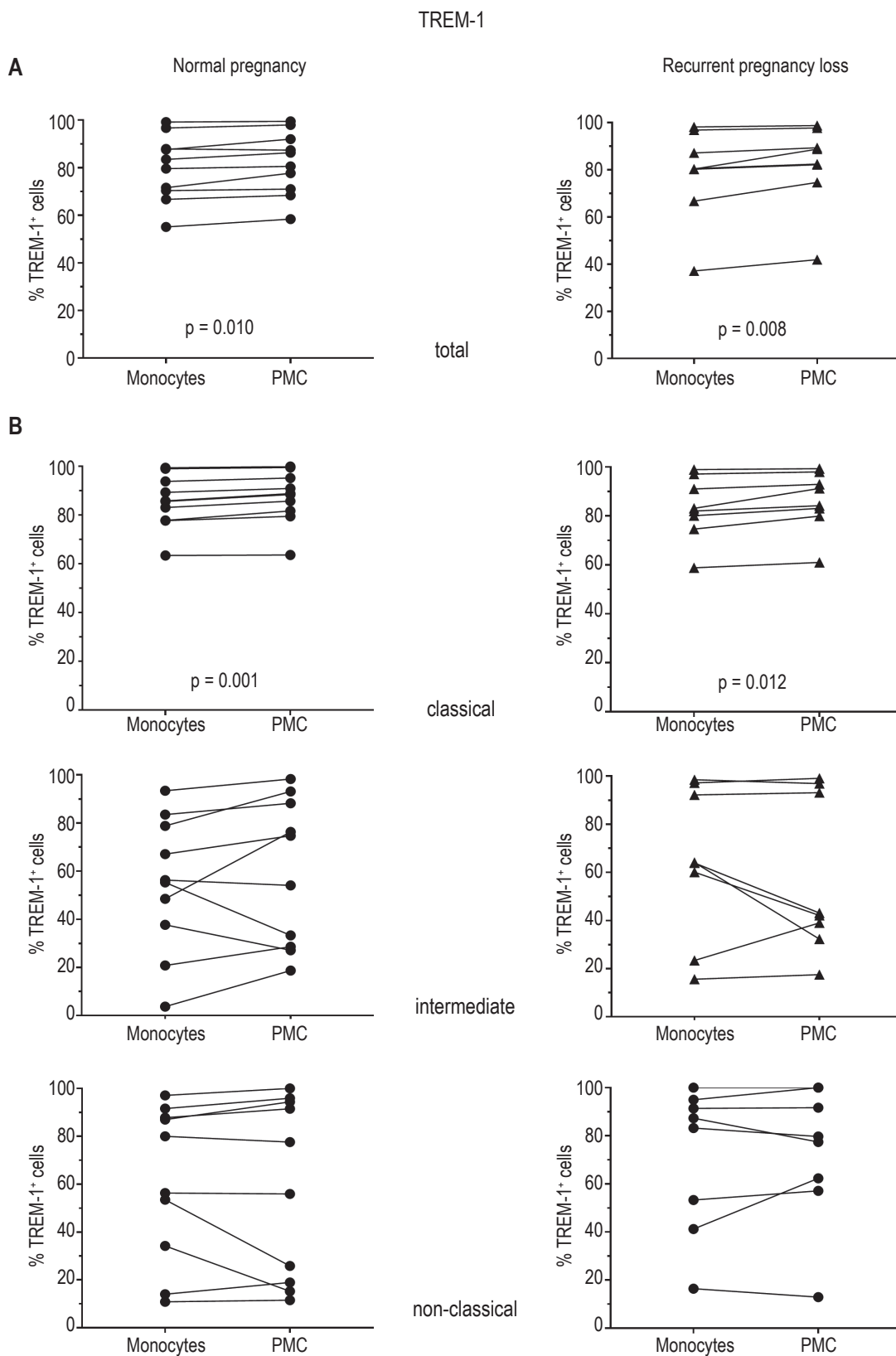


Figure 8. TREM-1 expression in monocytes and platelet-monocyte complexes

Note. Graphs demonstrate pairwise comparison of TREM-1 expression levels (percentage of TREM-1⁺ cells) on the surface of free and platelet-associated monocytes in the patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. A, total monocytes; B, monocyte subsets.

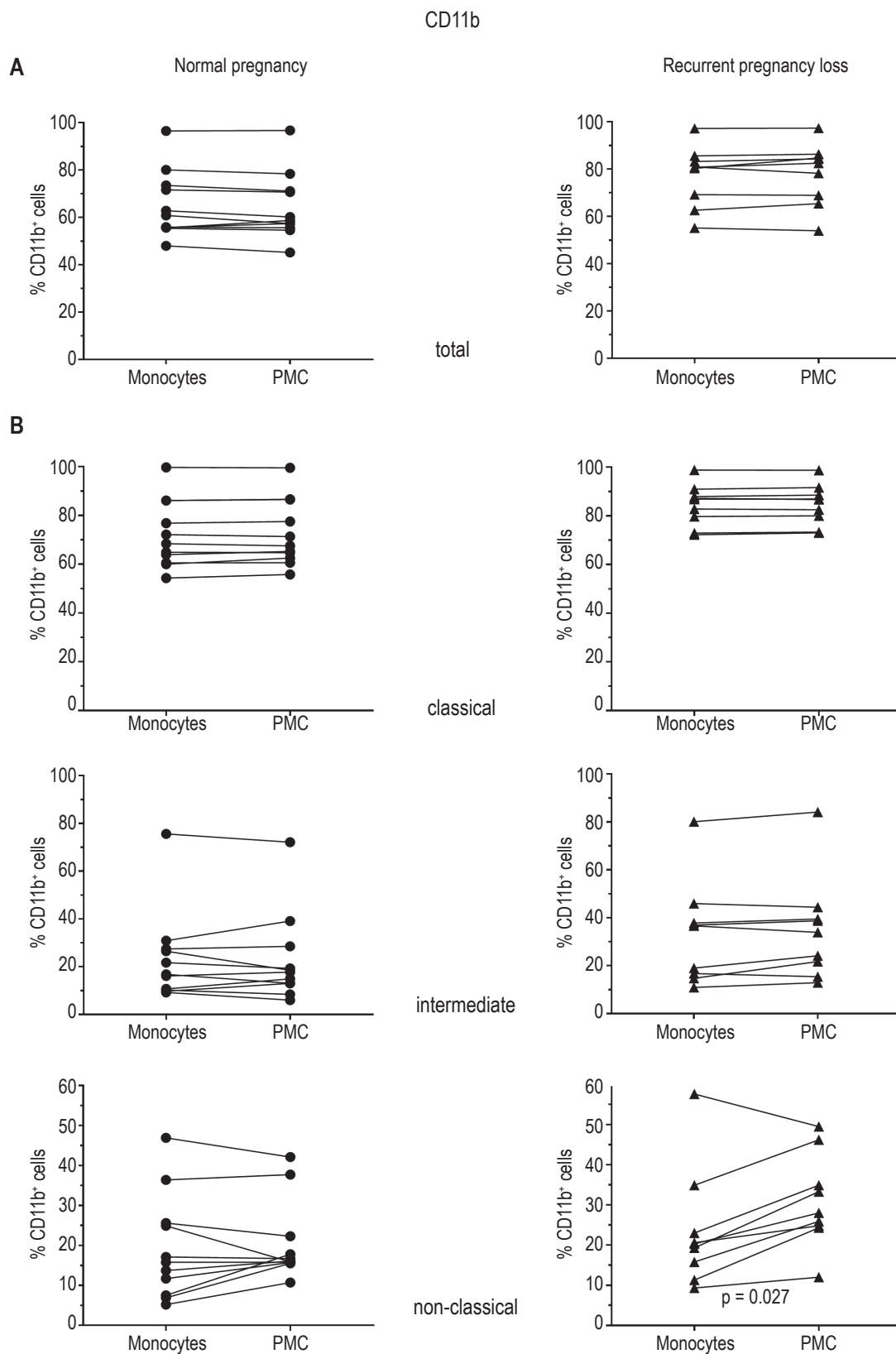


Figure 9. CD11b expression in monocytes and platelet-monocyte complexes

Note. Graphs demonstrate pairwise comparison of CD11b expression levels (percentage of CD11b⁺ cells) on the surface of free and platelet-associated monocytes in the patients with normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. A, total monocytes; B, monocyte subsets.

Discussion

Our results show that in first trimester pregnant women diagnosed with recurrent pregnancy loss, the content of platelet-monocyte complexes in the peripheral blood was increased in comparison with women of the same gestational age who had an uncomplicated pregnancy. It is known that normal pregnancy is characterized by increased coagulation capacity and activation of components of the immune system. Increased complex formation reflects platelet activation, which, along with a change in the activation status of monocytes as a result of their interaction with activated platelets, may represent an additional pathogenetic factor causing disturbances in the physiological course of pregnancy.

To our knowledge, this is the first study of platelet-monocyte complexes in recurrent pregnancy loss. In the literature, there is only one publication on a similar topic, but its authors evaluated complexes formed by all leukocyte cells, without differentiation between types of leukocytes, and the studied groups consisted of non-pregnant women [24]. This work demonstrated an increase in the level of platelet-leukocyte aggregates in patients with recurrent miscarriage. Our study not only quantified PMC, but also determined their surface antigenic markers, both in the total population and in individual subpopulations of monocytes. Based on the results of a subpopulation analysis, we concluded that the fraction of non-classical monocytes has a lower ability to form complexes with platelets than the fractions of classical and intermediate monocytes.

According to the results obtained, in patients with recurrent pregnancy loss the number of PMC increased in all subpopulations of monocytes. At the same time, in the fractions of classical and intermediate monocytes, the expression of CD162 decreased due to the formation of PMC, thus suggested the participation of this molecule in the connections between monocytes and platelets. In contrast, the expression of CD162 by PMC-associated non-classical monocytes increased in patients with physiological pregnancy and did not change in patients with recurrent miscarriage. Moreover, it was the fraction of non-classical monocytes that formed the smallest number of PMC compared to the other monocyte subpopulations and only this subpopulation demonstrated increased CD162 level in RPL group when compared to NP group.

The patterns of expression of surface markers of monocytes suggested that recurrent miscarriage was not accompanied by inflammatory activation of monocytes. Along with unchanged expression of the costimulatory molecule CD86 both in total population and in individual subpopulations of monocytes, in patients with recurrent pregnancy loss there was a decrease in the expression level of the activation marker HLA-DR ensured by classical monocytes. In total monocytes, the expression of another activation

marker, TREM-1, also did not undergo significant changes due to recurrent miscarriage, although the number of TREM-1⁺ PMC increased in non-classical monocytes. In contrast to these antigens, which are characteristic of the “inflammatory” phenotype of monocytes, increased level of CD11b expression in RPL patients suggested enhancement of adhesive properties of PMC-associated monocytes that may represent one of the possible pathophysiological mechanisms of spontaneous miscarriage.

Our study shows the reasonability of identifying monocyte subpopulations when quantifying and phenotyping PMC, since the results obtained from studying total population of monocytes do not necessarily reflect changes occurring in individual subpopulations.

Another aspect of our study was to reveal whether phenotypic characteristics of monocytes were affected by their interaction with platelets in consequence of formation of heterotypic aggregates (PMC) in normal pregnancy and in recurrent pregnancy loss, since changes in the morphofunctional properties of monocytes may be a pathogenetic factor for the disease.

To this end, we compared the expression levels of surface antigen markers between PMC-bound and free monocytes. Analysis revealed some patterns of changes in the antigenic phenotype of monocytes in patients with normal pregnancy and recurrent miscarriage. Unexpectedly, it turned out that formation of platelet-monocyte aggregates resulted in decreased expression of HLA-DR and CD86. Nevertheless, in patients with normal pregnancy these changes occurred in all subpopulations of monocytes, whereas in women with recurrent pregnancy loss only one or two subpopulations, respectively, were involved. It would follow that the weakening of HLA-DR expression by monocytes in RPL group was not a result of platelet-monocyte interaction, but was caused by other factors. Moreover, platelets induced comparable changes in the expression of CD86 in both studied groups, which did not lead to significant differences between them. Similarly, increased expression of TREM-1 by classical monocytes upon interaction with platelets was observed in both groups, but no difference was found in the expression of TREM-1 between NP and RPL patients. In our study, CD11b was the only marker whose expression increased as a result of platelet interactions with nonclassical monocytes, and this appeared to contribute to the increase in the number of CD11b⁺ PMC in women with recurrent pregnancy loss.

We hypothesize that development of inflammation and damaging effects on the vascular endothelium would underline the pathophysiological effects of PMC. However, our study did not reveal the signs of inflammatory changes in the antigenic phenotype of PMC in patients with recurrent pregnancy loss. It is possible that observed attenuation of the pro-inflammatory properties of PMC, which is expressed

as reduced expression of HLA-DR, in some way contributes to the development of this reproductive pathology; however, no theoretical explanation has yet been found. Nevertheless, the increased expression of CD11b in RPL group that we discovered may lead to increased adhesion of monocytes to the surface of endothelial cells and damage to the vascular endothelium. Obviously, we should continue to search for antigenic markers, the changes in expression of which may serve as a clue to understanding the mechanisms of PMC participation in the pathogenesis of recurrent miscarriage.

Unfortunately, it is not possible to compare our data with the results of other studies due to the lack of relevant information in the available literature. We can only refer to the results of our previous work which determined and characterized PMC in patients with another reproductive pathology – preeclampsia. As in the present study, in preeclampsia we observed an increased content of TMC in the blood; however, in addition to an increase in the expression level of CD11b, there was an increase in the expression of pro-inflammatory markers: HLA-DR, CD86 and TREM-1 (unpublished data). Moreover, we found that in patients with preeclampsia, increased expression of TREM-1 and CD11b in PMC-associated monocytes was induced by platelets, while changes in the expression of HLA-DR and CD86 were caused by other factors.

This comparison led us to the following conclusion. Obviously, an increased level of PMC in the circulation is a general phenomenon, as it is observed in various diseases that are thromboinflammatory in nature, and from this point of view, determining the surface

antigenic phenotype of PMC-associated monocytes seems to be more specific and more informative, since we assume that each disease is characterized by a particular pattern of expression of antigenic markers, which is formed under the influence of a unique combination of various factors, including platelets. Determining these patterns can help improve methods for diagnosing reproductive disorders, including recurrent miscarriage, reveal underlying mechanisms and develop new treatment approach.

Conclusion

In patients with recurrent pregnancy loss, the level of platelet-monocyte complexes in the peripheral blood increases compared to patients with uncomplicated pregnancy. All three monocyte subpopulations participate in this increase. Changes in the surface antigenic phenotype of PMC-associated monocytes reflect weakening of the inflammatory features and strengthening of adhesive properties of these cells. Monocyte subpopulations differently contribute to the changes in the expression of activation markers associated with recurrent miscarriage.

The immunomodulatory effect of platelets is manifested in stimulation of the expression of the CD11b molecule, which characterizes the adhesion phenotype of monocytes, while decrease in the expression of another activation marker HLA-DR is apparently caused by other factors.

Determining specific expression patterns of surface antigenic markers of platelet-monocyte complexes may have diagnostic value and also help improve approaches to the treatment of recurrent pregnancy loss.

References

1. Alecsandru D., Klimczak A.M., Garcia Velasco J.A., Pirtea P., Franasiak J.M. Immunologic causes and thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.*, 2021, Vol. 115, no. 3, pp. 561-566.
2. Aleva F.E., Temba G., de Mast Q., Simons S.O., de Groot P.G., Heijdra Y.F., van der Ven A. Increased platelet-monocyte interaction in stable COPD in the absence of platelet hyper-reactivity. *Respiration*, 2018, Vol. 95, no. 1, pp. 35-43.
3. Allen N., Barrett T.J., Guo Y., Nardi M., Ramkhalawon B., Rockman C.B., Hochman J.S., Berger J.S. Circulating monocyte-platelet aggregates are a robust marker of platelet activity in cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 2019, Vol. 282, pp. 11-18.
4. Arts R.J., Joosten L.A., van der Meer J.W., Netea M.G. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. *J. Leukoc. Biol.*, 2013, Vol. 93, no. 1, pp. 209-215
5. Ashman N., Macey M.G., Fan S.L., Azam U., Yaqoob M.M. Increased platelet-monocyte aggregates and cardiovascular disease in end-stage renal failure patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2003, Vol. 18, no. 10, pp. 2088-2096.
6. Blumenfeld Z., Brenner B. Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil. Steril.*, 1999, Vol. 72, no. 5, pp. 765-774.
7. Brambilla M., Canzano P., Becchetti A., Tremoli E., Camera M. Alterations in platelets during SARS-CoV-2 infection. *Platelets*, 2022, Vol. 33, no. 2, pp. 192-199.
8. Dimitriadis E., Menkhorst E., Saito S., Kutteh W.H., Brosens J.J. Recurrent pregnancy loss. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2020, Vol. 6, no. 1, 98. doi: 10.1038/s41572-020-00228-z.
9. Elalamy I., Chakroun T., Gerotziafas G.T., Petropoulou A., Robert F., Karroum A., Elgrably F., Samama M.M., Hatmi M. Circulating platelet-leukocyte aggregates: a marker of microvascular injury in diabetic patients. *Thromb. Res.*, 2008, Vol. 121, no. 6, pp. 843-848.
10. Gawaz M.P., Loftus J.C., Bajt M.L., Frojmovic M.M., Plow E.F., Ginsberg M.H. Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J. Clin. Invest.*, 1991, Vol. 88, no. 4, pp. 1128-1134.

11. Graff J., Harder S., Wahl O., Scheuermann E.H., Gossmann J. Anti-inflammatory effects of clopidogrel intake in renal transplant patients: effects on platelet-leukocyte interactions, platelet CD40 ligand expression, and proinflammatory biomarkers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2005, Vol. 78, no. 5, pp. 468-476.
12. Grandone E., Piazza G. Thrombophilia, inflammation, and recurrent pregnancy loss: a case-based review. *Semin. Reprod. Med.*, 2021, Vol. 39, no. 1-02, pp. 62-68.
13. Harding S.A., Sommerfield A.J., Sarma J., Twomey P.J., Newby D.E., Frier B.M., Fox K.A. Increased CD40 ligand and platelet-monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 2004, Vol. 176, no. 2, pp. 321-325.
14. Haselmayer P., Grosse-Hovest L., von Landenberg P., Schild H., Radsak M.P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 3, pp. 1029-1035.
15. Hottz E.D., Azevedo-Quintanilha I.G., Palhinha L., Teixeira L., Barreto E.A., Pao C.R.R., Righy C., Franco S., Souza T.M.L., Kurtz P., Bozza F.A., Bozza P.T. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood*, 2020, Vol. 136, no. 11, pp. 1330-1341.
16. Hottz E.D., Medeiros-de-Moraes I.M., Vieira-de-Abreu A., de Assis E.F., Vals-de-Souza R., Castro-Faria-Neto H.C., Weyrich A.S., Zimmerman G.A., Bozza F.A., Bozza P.T. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 4, pp. 1864-1872.
17. Hottz E.D., Quirino-Teixeira A.C., Merij L.B., Pinheiro M.B.M., Rozini S.V., Bozza F.A., Bozza P.T. Platelet-leukocyte interactions in the pathogenesis of viral infections. *Platelets*, 2022, Vol. 33, no. 2, pp. 200-207.
18. Ishikawa T., Shimizu M., Kohara S., Takizawa S., Kitagawa Y., Takagi S. Appearance of WBC-platelet complex in acute ischemic stroke, predominantly in atherothrombotic infarction. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2012, Vol. 19, no. 5, pp. 494-501.
19. Kaplar M., Kappelmayer J., Veszpremi A., Szabo K., Udvardy M. The possible association of in vivo leukocyte-platelet heterophilic aggregate formation and the development of diabetic angiopathy. *Platelets*, 2001, Vol. 12, no. 7, pp. 419-422.
20. Kullaya V., van der Ven A., Mpagama S., Mmbaga B.T., de Groot P., Kibiki G., de Mast Q. Platelet-monocyte interaction in Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis*, 2018, Vol. 111, pp. 86-93.
21. Liang H., Duan Z., Li D., Li D., Wang Z., Ren L., Shen T., Shao Y. Higher levels of circulating monocyte-platelet aggregates are correlated with viremia and increased sCD163 levels in HIV-1 infection. *Cell. Mol. Immunol.*, 2015, Vol. 12, no. 4, pp. 435-443.
22. Liu X., Chen Y., Ye C., Xing D., Wu R., Li F., Chen L., Wang T. Hereditary thrombophilia and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.*, 2021, Vol. 36, no. 5, pp. 1213-1229.
23. Loguinova M., Pinegina N., Kogan V., Vagida M., Arakelyan A., Shpektor A., Margolis L., Vasileva E. Monocytes of different subsets in complexes with platelets in patients with myocardial infarction. *Thromb. Haemost.*, 2018, Vol. 118, no. 11, pp. 1969-1981.
24. Lukanov T.H., Veleva G.L., Konova E.I., Ivanov P.D., Kovacheva K.S., Stoykov D.J. Levels of platelet-leukocyte aggregates in women with both thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2011, Vol. 17, no. 2, pp. 181-187.
25. Maclay J.D., McAllister D.A., Johnston S., Raftis J., McGuinness C., Deans A., Newby D.E., Mills N.L., MacNee W. Increased platelet activation in patients with stable and acute exacerbation of COPD. *Thorax*, 2011, Vol. 66, no. 9, pp. 769-774.
26. Marquardt L., Anders C., Buggle F., Palm F., Hellstern P., Grau A.J. Leukocyte-platelet aggregates in acute and subacute ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.*, 2009, Vol. 28, no. 3, pp. 276-282.
27. Ozanska A., Szymczak D., Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand. J. Immunol.*, 2020, V28 ol. 92, no. 1, e12883. doi: 10.1111/sji.12883.
28. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil. Steril.*, 2012, Vol. 98, no. 5, pp. 1103-1111.
29. Recurrent miscarriage: Clinical guidelines. Moscow, 2022. 52 p. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/721_1.
30. Rondina M.T., Brewster B., Grissom C.K., Zimmerman G.A., Kastendieck D.H., Harris E.S., Weyrich A.S. In vivo platelet activation in critically ill patients with primary 2009 influenza A(H1N1). *Chest*, 2012, Vol. 141, no. 6, pp. 1490-1495.
31. Samfireag M., Potre C., Potre O., Tudor R., Hoinoiu T., Anghel A. Approach to thrombophilia in pregnancy—a narrative review. *Medicina*, 2022, Vol. 58, no. 5, 692. doi: 10.3390/medicina58050692.
32. Sayed D., Amin N.F., Galal G.M. Monocyte-platelet aggregates and platelet micro-particles in patients with post-hepatic liver cirrhosis. *Thromb. Res.*, 2010, Vol. 125, no. 5, pp. e228-e233.
33. Schrottmaier W.C., Kral J.B., Badrnya S., Assinger A. Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 114, no. 3, pp. 478-489.
34. Serebryanaya N.B., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Yakutseni P.P. Blood platelets as activators and regulators of inflammatory and immune reactions. Part 2. Thrombocytes as participants of immune reactions. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 9-20. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-9-20.
35. Simcox L. E., Ormsher L., Tower C., Greer I.A. Thrombophilia and pregnancy complications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, Vol. 16, no. 12, pp. 28418-28428.
36. Simon D.I., Chen Z., Xu H., Li C.Q., Dong J., McIntire L.V., Ballantyne C.M., Zhang L., Furman M.I., Berndt M.C., Lopez J. A. Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 2, pp. 193-204.

37. Tao L., Changfu W., Linyun L., Bing M., Xiaohui H. Correlations of platelet-leukocyte aggregates with P-selectin S290N and P-selectin glycoprotein ligand-1 M62I genetic polymorphisms in patients with acute ischemic stroke. *J. Neurol. Sci.*, 2016, Vol. 367, pp. 95-100.
38. Taus F., Salvagno G., Cane S., Fava C., Mazzaferri F., Carrara E., Petrova V., Barouni R.M., Dima F., Dalbeni A., Romano S., Poli G., Benati M., De Nitto S., Mansueto G., Iezzi M., Tacconelli E., Lippi G., Bronte V., Minuz P. Platelets promote thromboinflammation in SARS-CoV-2 pneumonia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2020, Vol. 40, no. 12, pp. 2975-2989.
39. Thomas M.R., Storey R.F. The role of platelets in inflammation. *Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 114, no. 3, pp. 449-458.
40. Wu Q., Ren J., Hu D., Wu X., Li G., Wang G., Gu G., Chen J., Li R., Li Y., Hong Z., Ren H., Zhao Y., Li J. Monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates: implications in predicting septic mortality among surgical critical illness patients. *Biomarkers*, 2016, Vol. 21, no. 6, pp. 509-516.
41. Yang S., Huang X., Liao J., Li Q., Chen S., Liu C., Ling L., Zhou J. Platelet-leukocyte aggregates – a predictor for acute kidney injury after cardiac surgery. *Ren. Fail.*, 2021, Vol. 43, no. 1, pp. 1155-1162.
42. Zahran A.M., El-Badawy O., Mohamad I.L., Tamer D.M., Abdel-Aziz S.M., Elsayh K.I. Platelet activation and platelet-leukocyte aggregates in type I diabetes mellitus. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2018, Vol. 24, no. 9 Suppl, pp. 230S-239S.
43. Zarbock A., Muller H., Kuwano Y., Ley K. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J. Leukoc. Biol.* 2009, Vol. 86, no. 5, pp. 1119-1124.
44. Zhou X., Liu X.L., Ji W.J., Liu J.X., Guo Z.Z., Ren D., Ma Y.Q., Zeng S., Xu Z.W., Li H.X., Wang P.P., Zhang Z., Li Y.M., Benefield B.C., Zawada A.M., Thorp E.B., Lee D.C., Heine G.H. The kinetics of circulating monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates in the acute phase of ST-elevation myocardial infarction: associations with 2-year cardiovascular events. *Medicine*, 2016, Vol. 95, no. 18, e3466. doi: 10.1097/MD.0000000000003466.
45. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 16, pp. e74-e80.

Авторы:

Павлов О.В. — д.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Чепанов С.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Корнюшина Е.А. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела акушерства и перинатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Шенгелия М.О. — к.м.н., научный сотрудник отдела акушерства и перинатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Тхай Д.В. — лаборант-исследователь отдела 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, заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Pavlov O.V., PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Department of Immunology and Cell Interaction, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Chepanov S.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Immunology and Cell Interaction, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Kornyushina E.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Obstetrics and Perinatology, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Shengeliia M.O., PhD (Medicine), Researcher, Department of Obstetrics and Perinatology, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Tkhai D.V., Laboratory Research Assistant, Department of Immunology and Cell Interactions, 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; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

АНАЛИЗ РОСТА ДОЛИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗНАЧЕНИЙ УРОВНЕЙ TREC/KREC СРЕДИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В ПОСТПАНДЕМИЧЕСКИЙ ПЕРИОД

**Ольховская А.Ю.¹, Останкова Ю.В.¹, Сайтгалина М.А.¹,
Егорова С.А.¹, Щемелев А.Н.¹, Дрозд И.В.¹, Жимбаева О.Б.¹,
Данилова Е.М.¹, Миличкина А.М.¹, Башкетова Н.С.², Буц Л.В.¹,
Тотолян Арег А.¹**

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по городу Санкт-Петербургу и Ленинградской области, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Пандемия COVID-19 стала глобальным вызовом для общественного здравоохранения. Неблагоприятный прогноз при COVID-19 ассоциирован с триадой взаимосвязанных патогенетических механизмов: дисрегуляцией иммунного ответа, коагулопатией и вторичным иммунодефицитом, формирующими самоподдерживающийся цикл прогрессирующей полиорганной дисфункции. Причиной ослабления защитных функций иммунитета становится, в том числе, дефицит Т- и В-лимфоцитов, возникающий в результате истощения ресурсов иммунной системы во время острой стадии инфекции. Оценить глубину поражения иммунной системы возможно посредством определения концентрации маркеров, отражающих функциональную активность Т- и В-лимфоцитов: Т-клеточные рецепторные эксцизионные кольца (T cell receptor excision circles, TREC) и Каппа рекомбинационные эксцизионные кольца (κ-deleting recombination excision circles, KREC) соответственно. Целью настоящего исследования стала оценка представленности доли патологических значений TREC/KREC в периферической крови условно здоровых лиц в постпандемический период. Материалом служили образцы цельной периферической крови условно здоровых лиц от 18 лет и старше, проживающих на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области, полученные в рамках популяционных ис-

Адрес для переписки:

Останкова Юлия Владимировна
ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
Тел.: 8 (812) 233-20-92.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Address for correspondence:

Yulia V. Ostankova
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Образец цитирования:

А.Ю. Ольховская, Ю.В. Останкова, М.А. Сайтгалина, С.А. Егорова, А.Н. Щемелев, И.В. Дрозд, О.Б. Жимбаева, Е.М. Данилова, А.М. Миличкина, Н.С. Башкетова, Л.В. Буц, Арег А. Тотолян «Анализ роста доли патологических значений уровней TREC/KREC среди практически здоровых лиц в постпандемический период» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 5. С. 1127-1144.
doi: 10.15789/1563-0625-ИО-3280

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

For citation:

A. Yu. Olkhovskaya, Yu. V. Ostankova, M. A. Saitgalina, S. A. Egorova, A. N. Shchemelev, I. V. Drozd, O. B. Zhimbaeva, E. M. Danilova, A. M. Milichkina, N. S. Bashketova, L. V. Buts, Areg A. Totolian "Increased incidence of abnormal TREC/KREC levels is revealed in virtually healthy individuals over the post-pandemic period", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 5, pp. 1127-1144.
doi: 10.15789/1563-0625-ИО-3280

© Olkhovskaya A. Yu. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ИО-3280

следований в период с 15 по 21 июня 2020 г. (717 человек), а также с 04 по 29 сентября 2023 г. (3716 человек). Для определения концентрации TREC и KREC проводили количественную Real-time ПЦР с использованием коммерческого набора TREC/KREC-AmpPS (НИИ им. Пастера, Санкт-Петербург) в соответствии с инструкцией производителя. Частота встречаемости сниженных уровней TREC и KREC в допандемический период составила 14,2 и 5,7% соответственно. А в постпандемический период – 50,1 и 21,2% соответственно, что в 3,6 раза чаще. Достоверные различия в доле лиц с патологическими значениями анализов обнаружены во всех возрастных группах. Выявлены характерные иммунологические нарушения, проявляющиеся изолированными изменениями Т-клеточного звена или сочетанными дисфункциями Т- и В-лимфоцитов. Примечательно, что изолированные дефекты В-клеточного иммунитета обнаружены не были, что указывает на ключевую роль Т-клеточного компонента в развитии изучаемых иммунопатологических изменений. В постпандемический период обнаружено снижение минимальных популяционных значений TREC в старших возрастных группах относительно допандемических показателей и парадоксальное увеличение нижнего популяционного уровня KREC на 50,5%. Проведенное исследование свидетельствует о значительном увеличении частоты патологических значений TREC и KREC в популяции, что, вероятно, отражает долгосрочные изменения иммунного статуса после перенесенного COVID-19. Выявленные изменения подчеркивают значимость постоянного мониторинга иммунологического статуса населения в постпандемический период. Перспективным направлением дальнейших исследований представляется изучение временной динамики обнаруженных нарушений и разработка превентивных стратегий для минимизации отдаленных последствий COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, TREC, KREC, постпандемический период, вторичный иммунодефицит, long-COVID, лабораторная диагностика

INCREASED INCIDENCE OF ABNORMAL TREC/KREC LEVELS IS REVEALED IN VIRTUALLY HEALTHY INDIVIDUALS OVER THE POST-PANDEMIC PERIOD

Olkhovskaya A.Yu.^a, Ostankova Yu.V.^a, Saitgalina M.A.^a, Egorova S.A.^a, Shchemelev A.N.^a, Drozd I.V.^a, Zhimbaeva O.B.^a, Danilova E.M.^a, Milichkina A.M.^a, Bashketova N.S.^b, Buts L.V.^a, Totolian Areg A.^a

^a Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for St. Petersburg and Leningrad Region, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The COVID-19 pandemic has posed an unprecedented challenge to global public health. Poor clinical outcomes in COVID-19 were associated with a pathogenic triad of interrelated mechanisms: immune dysregulation, coagulopathy, and secondary immunodeficiency, which collectively establish a self-perpetuating cycle of progressive multiorgan dysfunction. The failure of immune defense stems, in part, from T and B cell depletion due to immune resource exhaustion during acute infection. The extent of immune system impairment may be assessed by quantifying biomarkers of lymphocyte function: T cell receptor excision circles (TREC) and δ -deleting recombination excision circles (KREC) for T and B cells, respectively. The aim of our study was to evaluate the prevalence of abnormal TREC/KREC levels in peripheral blood among apparently healthy individuals during the post-pandemic period. We analyzed whole peripheral blood samples from 4,433 apparently healthy adults (≥ 18 years), residents of St. Petersburg and Leningrad Region. The samples were collected during two population studies: June 15-21, 2020 ($n = 717$) and September 4-29, 2023 ($n = 3,716$). TREC/KREC quantification was performed by means of real-time PCR with “TREC/KREC-AmpPS” commercial kit (St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia) following manufacturer’s protocol. The prevalence of reduced TREC/KREC levels increased significantly from pre-pandemic (14.2% and 5.7%, respectively) to post-pandemic periods (50.1% and 21.2%, respectively), thus representing a 3.6-fold increase. The mentioned differences in pathological biomarker levels were observed across all age groups. Characteristic

immunological disturbances manifested as either isolated T cell deficiencies or combined T/B cell dysfunction, with no isolated B cell defects detected, thus suggesting the pivotal role of T cell impairment in observed immunopathological changes. Post-pandemic findings included decreased minimal population TREC values in older age groups and a paradoxical 50.5% increase in lower threshold KREC levels. Our findings demonstrate a substantially increased prevalence of abnormal TREC/KREC values, which seems to reflect long-term immune alterations following COVID-19. These changes underscore the critical need for the ongoing immunological surveillance in the post-pandemic era. Future research should focus on temporal dynamics of these disturbances and develop preventive strategies to mitigate long-term COVID-19 sequelae.

Keywords: COVID-19, TREC, KREC, post-pandemic period, secondary immunodeficiency, long-COVID, laboratory diagnostics

Введение

С момента первых официальных сообщений о случаях пневмонии неизвестного происхождения в Ухане (провинция Хубэй, Китай) в декабре 2019 года прошло более пяти лет. Возбудителем заболевания был новый коронавирус – SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2), а вызываемая им болезнь получила название COVID-19 (Coronavirus Disease 2019). Первый случай заболевания COVID-19 в Санкт-Петербурге был зафиксирован 2 марта 2020 г. [10]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) официально признала вспышку COVID-19 пандемией 11 марта 2020 года, а 5 мая 2023 года объявила о завершении пандемического периода [49]. Этот временной отрезок стал беспрецедентным вызовом для глобального здравоохранения, потребовав мобилизации всех ресурсов международного медицинского сообщества для противодействия стремительному распространению инфекции. Коронавирусная инфекция явилась серьезным испытанием для человечества, оказав огромное влияние на здоровье миллионов людей. Окончание пандемического статуса ознаменовало переход к долгосрочной стратегии контроля за циркуляцией вируса в популяции [10, 38].

Иммунная система играет ключевую роль в защите организма от инфекционных агентов, поддержании гомеостаза и восстановлении повреждений после болезни. Исследования патогенеза COVID-19 показали, что вирус проникает в клетки через рецептор ACE2, что объясняет поражение не только дыхательной системы, но и других органов (почек, сердца, нервной системы) [51]. При этом тяжелые формы заболевания связаны с чрезмерной активацией иммунного ответа, приводящей к цитокиновому шторму – неконтролируемому выбросу провоспалительных молекул (IL-6, TNF α , IFN γ). Этот каскад реакций провоцирует системное воспаление, сопровождающееся массовым образованием микротромбов из-за гиперкоагуляции, инфильтрацией органов мононуклеарными клетками и выраженной лимфопенией – критическим сни-

жением Т- и В-лимфоцитов, что резко ослабляет противовирусную защиту. Таким образом, ключевыми факторами неблагоприятного прогноза при COVID-19 являются иммунопатологические реакции, коагулопатия и вторичный иммунодефицит, формирующие порочный круг прогрессирующего повреждения органов [1, 6, 27, 31, 36]. Реверсия лимфопении посредством восстановления лимфоцитарного пула способствует клиническому улучшению при COVID-19 за счет нормализации функций Т- и В-клеток, необходимых для формирования специфического противовирусного иммунитета [29]. Отсутствие такого восстановления способствует развитию хронических воспалительных состояний и ослаблению защитных функций иммунитета.

В связи с вышесказанным очевидно, что причиной этого ослабления становится, в том числе, дефицит Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, возникший в результате истощения ресурсов иммунной системы во время острой стадии инфекции. Особенно страдает численность Т-клеточных клонов, важных для распознавания и уничтожения вирусов и опухолевых клеток. Исследования показывают, что недостаток Т-лимфоцитов сохраняется у некоторых пациентов месяцами после завершения острой фазы заболевания [21]. Еще одной причиной является дисфункция регенеративных способностей костного мозга. Хроническое воспаление нарушает нормальное функционирование гемопоэтических стволовых клеток, замедляет образование новых кровяных клеток и снижает синтез зрелых иммунокомпетентных клеток. Подобное состояние известно как «костномозговая недостаточность». Она выражается нехваткой белых кровяных телец и эритроцитов, повышая риск вторичных бактериальных инфекций и анемий [22, 28].

Оценить глубину поражения иммунной системы возможно посредством определения концентрации маркеров, отражающих функциональную активность Т- и В-лимфоцитов.

В процессе созревания Т-лимфоцитов при перестройке гена рецептора Т-клеток в тиму-

се образуются кольцевые фрагменты ДНК – Т-клеточные рецепторные эксцизионные кольца (T cell receptor excision circles, TREC) [37], которые служат индикатором продуктивности тиреоидного выхода зрелых Т-лимфоцитов. Низкий уровень TREC свидетельствует о недостаточной выработке молодых Т-клеток, уменьшении популяции Т-лимфоцитов и снижении общей способности противостоять инфекционным агентам. Аналогично образуются в ходе формирования антигенраспознающих структур В-лимфоцитов Каппа рекомбинационные эксцизионные кольца (κ-deleting recombination excision circles, KREC), отражающие эффективность дифференцировки и продукцию плазматических клеток, вырабатывающих защитные антитела. Уровень KREC демонстрирует активность гуморального звена иммунитета, позволяя оценить степень защищенности организма от повторных атак возбудителей болезней. Концентрации TREC и KREC в крови являются чувствительными индикаторами стадии антиген-независимой дифференцировки клеток адаптивного иммунитета [46]. Исходя из вышесказанного, количественная оценка уровней TREC и KREC – важнейшая методика для определения функциональной эффективности иммунитета.

Ранее нами была показана информативность уровней TREC/KREC при ВИЧ-инфекции и COVID-19 [7, 12, 13]. Определение уровней TREC и KREC делает возможной не только раннюю диагностику первичных иммунодефицитов [20], но и оценку готовности пациента к вакцинации, выбор оптимальной лечебной тактики, оптимизацию профилактических мероприятий и контроль качества восстановления иммунной системы после тяжелых заболеваний [33]. Таким образом, современная лабораторная диагностика располагает удобным и весьма доступным методом оценки состояния иммунитета использование которого позволяет существенно расширить диагностические возможности, способствуя оптимизации профилактических мероприятий, повышению точности диагностики, эффективности лечения и реабилитации пациентов, что, в целом, приводит к совершенствованию качества медицинской помощи [14, 44]. Важнейшим аспектом применения данного метода выступает его предиктивный потенциал для раннего выявления групп риска. Снижение показателей TREC и/или KREC в этих группах служит прогностическим маркером повышенного риска развития инфекционной патологии и ассоциировано с высокой вероятностью тяжелого течения заболеваний.

В связи с вышесказанным **целью настоящего исследования** стала оценка представленности доли патологических значений TREC/KREC в периферической крови условно здоровых лиц в постпандемический период.

Материалы и методы

Материалом служили образцы цельной периферической крови условно здоровых лиц от 18 лет и старше, проживающих на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области, полученные в рамках популяционного исследования в период с 15 по 21 июня 2020 г. (717 человек), а также с 04 по 29 сентября 2023 г. (3716 человек) [8, 9, 10]. Критерием исключения добровольца из исследования в обеих группах являлось наличие диагноза иммунодефицит любого генеза, вирусный гепатит В, С, D, ВИЧ-инфекция, дополнительным критерием исключения для волонтеров 2020 г. было наличие острого заболевания COVID-19. На проведение данного исследования было получено согласие локального Этического комитета ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протоколы № 64 от 25.05.2020 г. и № 86 от 17.08.2023 г.).

Взятие крови осуществляли в медицинском центре ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» из локтевой вены в пробирку с консервантом ЭДТА с фиолетовой крышкой. Экстракцию суммарной фракции ДНК осуществляли из аликвот цельной крови с использованием коммерческого набора «НК-Магно-UltraPure-A» (НПФ «ЭПИТОП», Санкт-Петербург) и автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот Auto-Pure 96 (Allsheng, Китай), согласно инструкциям производителей. Для определения концентрации TREC и KREC проводили количественную Real-time ПЦР с использованием коммерческого набора TREC/KREC-AmpPS (НИИ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия) в соответствии с инструкцией производителя [11, 14].

Статистическую обработку данных проводили с применением пакетов программного обеспечения GraphPad Prizm 5 и Microsoft Excel 2010. Сравнительный анализ независимых выборок пациентов проводили с использованием критериев Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса и теста Данна. Редактирование выбросов и экстремальных значений выполняли с использованием программного обеспечения Deductor Academic 5.3 (BaseGroup Labs) с применением метода определения выбросов и экстремальных значений по интерквартильной ширине (для выбросов – 1,5, для экстремальных значений 3).

ТАБЛИЦА 1. ДОЛЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗНАЧЕНИЙ TREC И KREC В ПОПУЛЯЦИИ В ДОПАНДЕМИЧЕСКИЙ И ПОСТПАНДЕМИЧЕСКИЙ ПЕРИОД

TABLE 1. PROPORTION OF PATHOLOGICAL TREC AND KREC VALUES IN THE POPULATION IN THE PRE-PANDEMIC AND POST-PANDEMIC PERIODS

| Возрастные группы Age groups | Статистические показатели Statistical indicators | Патологические уровни TREC Pathological TREC levels | | Патологические уровни KREC Pathological KREC levels | |
|---------------------------------|---|--|--|--|--|
| | | Допандемический период Pre-pandemic period | Постпандемический период Post-pandemic period | Допандемический период Pre-pandemic period | Постпандемический период Post-pandemic period |
| 18-29 лет 18-29 years | Абс., (n) Abs, (n) | 7 из 120 7 out of 120 | 195 из 619 195 out of 619 | 5 из 120 5 out of 120 | 105 из 619 105 out of 619 |
| | %, 95% ДИ: %, 95% CI: | 5,8% (2,4-11,7%) | 31,5% (27,9-35,3%) | 4,2% (1,4-9,5%) | 17,0% (14,1-20,2%) |
| | p-value: | $\chi^2 = 32,064$, $p < 0,0001$, $df = 1$, ОР = 7,424 (95% ДИ: 3,4-16,2) $\chi^2 = 32,064$, $p < 0,0001$, $df = 1$, OR = 7,424 (95% CI: 3.4-16.2) | | $\chi^2 = 12,000$, $p = 0,0005$, $df = 1$, ОР = 4,698 (95% ДИ: 1,9-11,8) $\chi^2 = 12,000$, $p = 0,0005$, $df = 1$, OR = 4,698 (95% CI: 1.9-11.8) | |
| 30-39 лет 30-39 years | Абс., (n) Abs, (n) | 12 из 118 12 out of 118 | 258 из 649 258 out of 649 | 6 из 118 6 out of 118 | 132 из 649 132 out of 649 |
| | %, 95% ДИ: %, 95% CI: | 10,2% (5,4-17,1%) | 39,8% (36,0-43,6%) | 5,1% (1,9-10,7%) | 20,3% (17,3-23,6%) |
| | p-value: | $\chi^2 = 37,024$, $p < 0,0001$, $df = 1$, ОР = 5,829 (95% ДИ: 3,1-10,8) $\chi^2 = 37,024$, $p < 0,0001$, $df = 1$, OR = 5,829 (95% CI: 3.1-10.8) | | $\chi^2 = 14,729$, $p < 0,0001$, $df = 1$, ОР = 4,766 (95% ДИ: 2,1-11,1) $\chi^2 = 14,729$, $p < 0,0001$, $df = 1$, OR = 4,766 (95% CI: 2.1-11.1) | |
| 40-49 лет 40-49 years | Абс., (n) Abs, (n) | 16 из 132 16 out of 132 | 306 из 655 306 out of 655 | 8 из 132 8 out of 132 | 154 из 655 154 out of 655 |
| | %, 95% ДИ: %, 95% CI: | 12,1% (7,1-18,9%) | 46,7% (42,8-50,6%) | 6,1% (2,7-11,6%) | 23,5% (20,3-27,0%) |
| | p-value: | $\chi^2 = 52,971$, $p < 0,0001$, $df = 1$, ОР = 6,357 (95% ДИ: 3,7-11,0) $\chi^2 = 52,971$, $p < 0,0001$, $df = 1$, OR = 6,357 (95% CI: 3.7-11.0) | | $\chi^2 = 19,412$, $p < 0,0001$, $df = 1$, ОР = 4,764 (95% ДИ: 2,3-10,0) $\chi^2 = 19,412$, $p < 0,0001$, $df = 1$, OR = 4,764 (95% CI: 2.3-10.0) | |
| 50-59 лет 50-59 years | Абс., (n) Abs, (n) | 28 из 135 28 out of 135 | 322 из 619 322 out of 619 | 5 из 135 5 out of 135 | 135 из 619 135 out of 619 |
| | %, 95% ДИ: %, 95% CI: | 20,7% (14,3-28,6%) | 52,0% (48,0-56,0%) | 3,7% (1,2-8,4%) | 24,2% (20,9-27,8%) |
| | p-value: | $\chi^2 = 42,347$, $p < 0,0001$, $df = 1$, ОР = 4,143 (95% ДИ: 2,7-6,5) $\chi^2 = 42,347$, $p < 0,0001$, $df = 1$, OR = 4,143 (95% CI: 2.7-6.5) | | $\chi^2 = 22,846$, $p < 0,0001$, $df = 1$, ОР = 7,252 (95% ДИ: 2,9-18,1) $\chi^2 = 22,846$, $p < 0,0001$, $df = 1$, OR = 7,252 (95% CI: 2.9-18.1) | |
| 60-69 лет 60-69 years | Абс., (n) Abs, (n) | 21 из 111 21 out of 111 | 411 из 618 411 out of 618 | 10 из 111 10 out of 111 | 150 из 618 150 out of 618 |
| | %, 95% ДИ: %, 95% CI: | 18,9% (12,1-27,5%) | 66,5% (62,6-70,2%) | 9,0% (4,41-15,90%) | 24,3% (20,9-27,9%) |

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

| Возрастные группы Age groups | Статистические показатели Statistical indicators | Патологические уровни TREC Pathological TREC levels | | Патологические уровни KREC Pathological KREC levels | |
|---------------------------------|---|---|--|---|--|
| | | Допандемический период Pre-pandemic period | Постпандемический период Post-pandemic period | Допандемический период Pre-pandemic period | Постпандемический период Post-pandemic period |
| 60-69 лет 60-69 years | p-value: | $\chi^2 = 86,298, p < 0,0001, df = 1,$ ОР = 8,509 (95% ДИ: 5,1-14,1) $\chi^2 = 86.298, p < 0.0001, df = 1,$ OR = 8.509 (95% CI: 5.1-14.1) | | $\chi^2 = 11,921, p = 0,0006, df = 1,$ ОР = 3,237 (95% ДИ: 1,6-6,4) $\chi^2 = 11.921, p = 0.0006, df = 1,$ OR = 3.237 (95% CI: 1.6-6.4) | |
| от 70 лет 70+ years | Абс., (n) Abs, (n) | 18 из 101 18 out of 101 | 369 из 556 369 out of 556 | 7 из 101 7 out of 101 | 111 из 556 111 out of 556 |
| | %, 95% ДИ: %, 95% CI: | 17,8% (10,9-26,7%) | 66,4% (62,3-70,3%) | 6,9% (2,8-13,8%) | 20,0% (16,7-23,5%) |
| | p-value: | $\chi^2 = 81,217, p < 0,0001, df = 1,$ ОР = 9,099 (95% ДИ: 5,3-15,6) $\chi^2 = 81.217, p < 0.0001, df = 1,$ OR = 9.099 (95% CI: 5.3-15.6) | | $\chi^2 = 8,989, p = 0,0027, df = 1,$ ОР = 3,350 (95% ДИ: 1,5-7,4) $\chi^2 = 8.989, p = 0.0027, df = 1,$ OR = 3.350 (95% CI: 1.5-7.4) | |
| Всего Total | Абс., (n) Abs, (n) | 102 из 717 102 out of 717 | 1861 из 3716 1861 out of 3716 | 41 из 717 41 out of 717 | 787 из 3716 787 out of 3716 |
| | %, 95% ДИ: %, 95% CI: | 14,2% (11,8-17,0%) | 50,1% (48,5-51,7%) | 5,7% (4,1-7,7%) | 21,2% (19,9-22,5%) |
| | p-value: | $\chi^2 = 311,71, p < 0,0001, df = 1,$ ОР = 6,049 (95% ДИ: 4,9-7,5) $\chi^2 = 311.71, p < 0.0001, df = 1,$ OR = 6.049 (95% CI: 4.9-7.5) | | $\chi^2 = 93,565, p < 0,0001, df = 1,$ ОР = 4,430 (95% ДИ: 3,2-6,1) $\chi^2 = 93.565, p < 0.0001, df = 1,$ OR = 4.430 (95% CI: 3.2-6.1) | |

Для оценки распределения уровней TREC и KREC в постпандемический период определяли нижнюю и верхнюю границы, а также медиану целевых аналитов в популяции по аналогии с определением референсных интервалов прямым методом, согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии (International Federation of Clinical Chemistry, IFCC) и Государственного стандарта (ГОСТ) Р 53022.3-2008 [2, 19, 39], в соответствии с которым статистически достаточной является выборка, включающая 120 практически здоровых человек, по результатам исследования которых рассчитывают 95% доверительный интервал [3].

Результаты

Определено количественное содержание молекул TREC и KREC в каждом образце крови. Частота встречаемости сниженных уровней TREC и KREC в допандемический период составила 14,2% (n = 102 из 717, 95% ДИ: 11,8-17,0%) и 5,7% (n = 41 из 717, 95% ДИ: 4,1-7,7%), соответственно. Частота встречаемости сниженных

уровней TREC и KREC в постпандемический период составила 50,1% (n = 1861 из 3716, 95% ДИ: 48,5-51,7%) и 21,2% (n = 787 из 3716, 95% ДИ: 19,9-22,5%) соответственно, что приблизительно в 3,6 (в 3,5 раза для TREC; в 3,7 раза для KREC) чаще, чем в допандемический период. В таблице 1 приведены данные о частоте встречаемости сниженных уровней TREC и KREC в популяции в допандемический и постпандемический периоды соответственно.

На рисунке 1 представлены данные о частоте встречаемости сочетаний нормальных и патологических уровней молекул TREC и KREC в популяции в допандемический и постпандемический периоды.

Очевидно увеличение доли патологических значений уровней TREC и/или KREC в постпандемический период в сравнении с допандемическим. Анализ данных выявил несоответствие между частотой патологических значений KREC в постпандемическом периоде, зарегистрированной в таблице 1, и их представленностью на рисунке 1Б. Это расхождение объясняется тем,

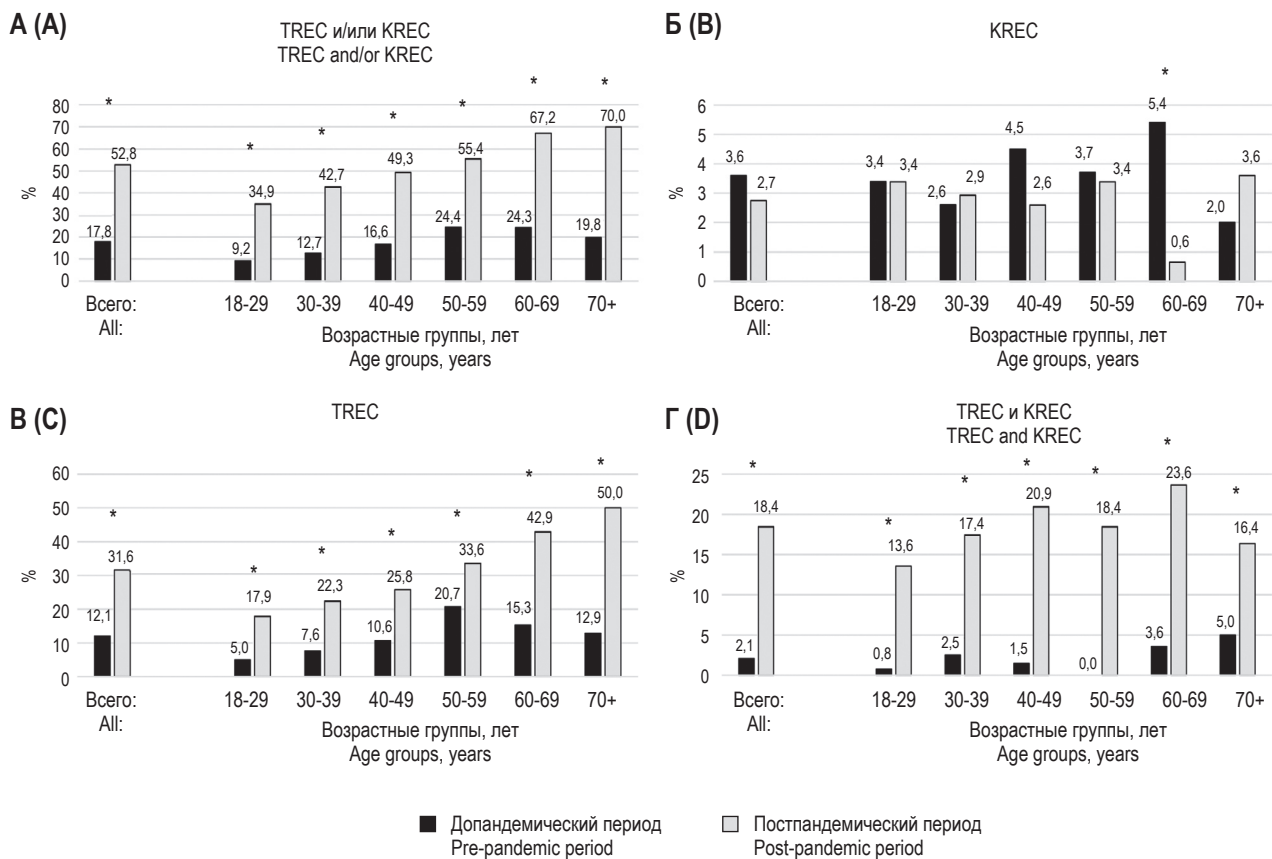


Рисунок 1. Доля патологических значений TREC и KREC в допандемический и постпандемический период
Примечание. А – TREC и/или KREC. Б – KREC. В – TREC. Г – TREC и KREC.

Figure 1. Proportion of pathological TREC and KREC values in the pre-pandemic and post-pandemic periods
Note. A, TREC and/or KREC. B, KREC. C, TREC. D, both TREC and KREC.

что в большинстве случаев в постпандемический период сниженные показатели KREC сочетались с низкими уровнями TREC, что привело к уменьшению доли изолированных нарушений KREC в отдельных исследуемых группах при визуализации данных. Проведенное исследование выявило характерные иммунологические нарушения, проявляющиеся либо изолированными изменениями Т-клеточного звена, либо сочетанными дисфункциями Т- и В-лимфоцитов. Примечательно, что изолированные дефекты В-клеточного иммунитета обнаружены не были, что указывает на ключевую роль Т-клеточного компонента в развитии изучаемых иммунопатологических изменений.

На рисунках 2 и 3 представлено распределение значений TREC и KREC в популяции в постпандемический период, в зависимости от возраста волонтеров, цифрами отмечены медианы для каждой возрастной группы.

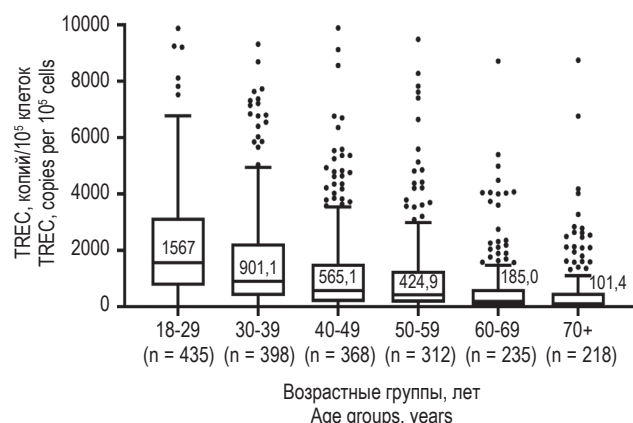


Рисунок 2. Уровни TREC в зависимости от возраста обследуемых в постпандемический период

Figure 2. TREC levels depending on age in the post-pandemic period

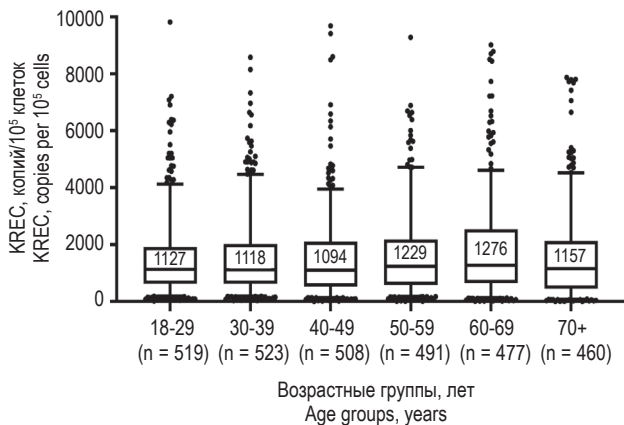


Рисунок 3. Уровни KREC в зависимости от возраста обследуемых в постпандемический период

Figure 3. KREC levels depending on age in the post-pandemic period

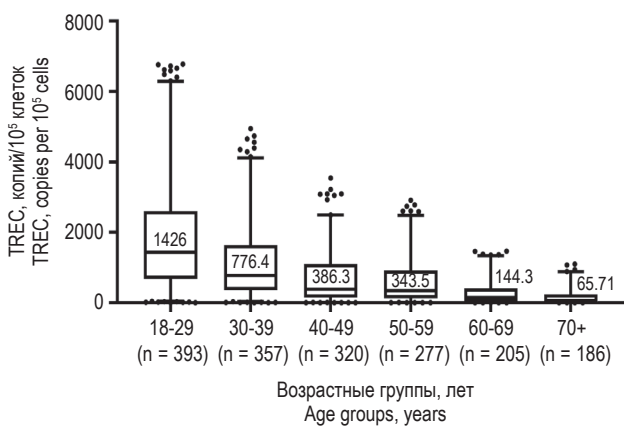


Рисунок 4. Размах значений уровней TREC по возрастным группам («ящики с усами», обозначены перцентили 2,5-97,5, указаны медианы)

Figure 4. Range of TREC levels by age group (“box-and-whisker plot,” showing percentiles 2.5-97.5, medians indicated)

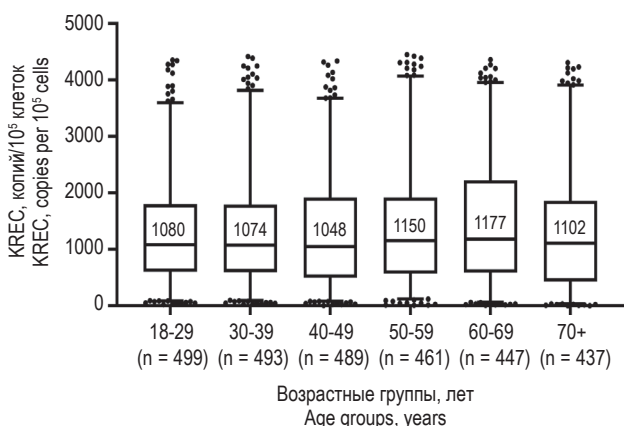


Рисунок 5. Размах значений уровней KREC по возрастным группам («ящики с усами», обозначены перцентили 2,5-97,5, указаны медианы)

Figure 5. Range of KREC levels by age group (“box-and-whisker plot,” showing percentiles 2.5-97.5, medians indicated)

Нормальность распределения полученных числовых значений в каждой возрастной группе проверяли с помощью двух критериев: Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Согласно проведенному анализу, ни в одной из выборок распределение числовых данных не подчинялось закону нормального распределения. Все последующие статистические расчеты были выполнены с применением инструментов непараметрической статистики.

За основу были взяты данные, полученные от 3716 условно здоровых волонтеров, перед проведением статистического анализа было выполнено удаление выбросов (превышение в 1,5 раза интервала межквартильного размаха) и экстремальных значений (превышение в 3 раза интервала межквартильного размаха) отдельно для каждой возрастной группы. Полученные в результате диаграммы размаха значений TREC и KREC в перечисленных группах изображены на рисунках 4 и 5.

При анализе полученных уровней TREC, для сравнения медиан использовали Критерий Краскела–Уоллиса. Данный тест, позволяющий проверить гипотезу о равенстве медиан всех выборок, показал наличие статистически значимых различий между исследуемыми группами (степень различия между выборками: $H(2) = 537,2$, $p < 0,0001$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что медианы по крайней мере двух групп из анализируемых различаются. В связи с вышесказанным, для уточнения, какие именно группы отличаются друг от друга, использовали тест Данна. Различие между группами 40-49 лет и 50-59 лет и между 60-69 лет и 70+ лет оказалось не значимым ($p > 0,05$), однако при сравнении всех остальных групп были выявлены значительные различия ($p < 0,001$ для всех попарных групповых сравнений).

При апостериорном сравнении с применением критерия Манна–Уитни достоверные различия были выявлены для всех пар групп при последовательном сравнении ($p < 0,05$) за исключением сравнения возрастных групп 40-49 лет и 50-59 лет, $p = 0,0910$.

Учитывая наблюдаемое увеличение частоты патологических значений TREC в популяции в постпандемический период и отсутствие однозначных данных о возможности восстановления исходных показателей TREC у пациентов после COVID-19, представляется обоснованной необходимость дальнейшей определения динамики состояния.

За нижнюю и верхнюю границы в выделенных группах были приняты 2,5 и 97,5 перцентиль, со-

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОПУЛЯЦИОННЫХ УРОВНЕЙ TREC (КОПИЙ/10⁵ КЛЕТОК) У ЛЮДЕЙ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП, ОПРЕДЕЛЕННЫЕ В ДОПАНДЕМИЧЕСКИЙ И ПОСТПАНДЕМИЧЕСКИЙ ПЕРИОДЫ

TABLE 2. DISTRIBUTION OF POPULATION-LEVEL TREC CONCENTRATIONS (COPIES PER 10⁵ CELLS) IN DIFFERENT AGE GROUPS DETERMINED IN THE PRE-PANDEMIC AND POST-PANDEMIC PERIODS

| Возрастные группы Age groups | Допандемический период Pre-pandemic period | | | | Постпандемический период Post-pandemic period | | | |
|---------------------------------|---|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | n | Медиана Median | Нижняя граница Lower boundary | Верхняя граница Upper boundary | n | Медиана Median | Нижняя граница Lower boundary | Верхняя граница Upper boundary |
| 18-29 лет 18-29 years | 108 | 553,3 | 44,91 | 2135 | 393 | 1426 | 41,31 | 6282 |
| 30-39 лет 30-39 years | 101 | 252,7 | 23,6 | 1597 | 357 | 776,4 | 33,43 | 4113 |
| 40-49 лет 40-49 years | 111 | 191,3 | 18,27 | 1098 | 320 | 386,3 | 6,17 | 2492 |
| 50-59 лет 50-59 years | 103 | 131,1 | 13,98 | 1543 | 277 | 343,5 | 5,495 | 2475 |
| 60-69 лет 60-69 years | 88 | 74,87 | 12,54 | 1715 | 205 | 144,3 | 0,985 | 1331 |
| от 70 лет 70+ years | 79 | 44,71 | 11,43 | 683,1 | 186 | 65,71 | 0,8403 | 883,8 |

ТАБЛИЦА 3. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ УРОВЕНЬ KREC (КОПИЙ/10⁵ КЛЕТОК) У ЛЮДЕЙ СТАРШЕ 18 ЛЕТ

TABLE 3. POPULATION LEVEL OF KREC (COPIES PER 10⁵ CELLS) IN INDIVIDUALS AGED 18 YEARS AND OLDER

| Допандемический период Pre-pandemic period | | | | Постпандемический период Post-pandemic period | | | |
|--|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Число волонтеров, n Number of volunteers, n | Медиана Median | Нижняя граница Lower boundary | Верхняя граница Upper boundary | Число волонтеров, n Number of volunteers, n | Медиана Median | Нижняя граница Lower boundary | Верхняя граница Upper boundary |
| 676 | 385,7 | 49,9 | 1478 | 2826 | 1102 | 75,1 | 3848 |

ответственно, согласно международным стандартам [2, 19, 39]. В таблице 2 приведены возрастные группы и распределение популяционных уровней TREC в допандемический и постпандемический периоды.

На фоне регистрируемого роста отклонений показателей KREC от нормы в постпандемическую эпоху и, как и в случае TREC, неопределенности относительно долгосрочной динамики анализа у перенесших COVID-19, представляется обоснованным проведение ревизии распределения его уровней в условно-здоровой популяции.

Достоверных различий при проведении сравнительного анализа уровней KREC между возрастными группами с применением критерия

Краскела–Уоллиса и теста Данна выявлено не было.

Исходя из вышесказанного, уровни KREC постпандемического периода рассчитывали для всей выборки без деления на возрастные группы. В таблице 3 представлены полученное медианное значение, а также границы нормы у людей старше 18 лет.

Обсуждение

Помимо непосредственно острого инфекционного процесса, значительная часть переболевших COVID-19 сталкивается с долгосрочными последствиями, известными как постковидный

синдром (long-COVID), состоянием, характеризующимся длительным течением симптомов COVID-19, продолжающихся более 12 недель после первичного заболевания. При этом недостаточность Т- и В-клеточных звеньев иммунитета может сохраняться в течение длительного времени [30]. Симптомы long-COVID могут включать усталость, одышку, боли в мышцах и суставах, проблемы с концентрацией внимания (так называемый «мозговой туман»), нарушение сна, головную боль, потерю вкуса и запаха, тревогу и депрессию, а также нарушения сердечно-сосудистой системы и органов дыхания [15, 21, 18].

По данным ВОЗ, около трети переболевших COVID-19 лиц сообщают о длительном сохранении симптомов после выписки из больницы. Причины развития long-COVID пока недостаточно изучены, однако предполагается, что это связано с иммунологическими реакциями организма, повреждением тканей вирусом, хроническими воспалительными процессами и нарушением регуляции иммунной системы [41]. В ходе исследования когорты медицинских работников в Израиле было установлено, что даже у полностью вакцинированных против SARS-CoV-2 людей сохраняется риск развития long-COVID после прорывной инфекции, что подчеркивает необходимость дальнейшего изучения поствакцинальных осложнений и долгосрочных последствий COVID-19 [17].

Патогенетическую основу длительных поствирусных нарушений функциональной активности иммунной системы при long-COVID составляет комбинация ключевых факторов: глубокого истощения лимфоидного пула и дисрегуляции гемопоэза. Первая причина связана с длительным сохранением повышенной продукции провоспалительных цитокинов. Остаточные следы хронического воспаления способствуют угнетению иммунного ответа и препятствуют быстрому восстановлению пораженных тканей и органов. Постоянная секреция воспалительных молекул, таких как IL-6, TNF α и IFN γ , отрицательно сказывается на функциональности лейкоцитов и провоцирует развитие хронической усталости [50]. Массивная антигенная нагрузка в острой фазе COVID-19 приводит к клональному истощению Т-лимфоцитов, особенно цитотоксических CD8⁺ клеток и Т-хелперов, что подтверждается длительным сохранением лимфопении у реконвалесцентов. Одновременно хроническое воспаление, опосредованное персистирующей вирусной РНК и цитокиновым дисбалансом, индуцирует функциональные измене-

ния в нише гемопоэтических стволовых клеток. Это выражается в подавлении сигнальных путей (включая JAK-STAT и NF- κ B), регулирующих пролиферацию и дифференцировку, что ведет к развитию миелоидного смещения и недостаточному восполнению лимфоидных клеточных популяций. Возникающая в результате панцитопения создает условия для развития вторичных иммунодефицитных состояний с повышенной восприимчивостью к инфекциям и неопластическим процессам.

В ходе исследования была определена доля сниженных значений TREC и/или KREC. Доля лиц с нормальными уровнями TREC и KREC среди условно здоровых добровольцев в сентябре 2023 г. составила 47,2%, что практически вдвое ниже в сравнении с допандемическим показателем (82,2%). Полученные данные согласуются с тем фактом, что SARS-CoV-2 непосредственно воздействует на тимус и костный мозг, нарушая процесс образования новых Т- и В-клеток [25]. Даже после достижения клинической ремиссии у пациентов сохраняются признаки персистирующего воспалительного процесса и нарушения иммунорегуляторных механизмов. Ранее нами было показано нарушение функционирования Т-клеточного звена приобретенного иммунитета у пациентов после перенесенной коронавирусной инфекции, что может быть тесно связано с процессами созревания и дифференцировки Т-клеток в тимусе [4]. Было отмечено, что группы лиц, перенесших коронавирусную инфекцию, в сравнении с контрольной группой, имели длительное сохранение сниженного относительного содержания CD4⁺Т-клеток (40,8% (31,6-50,1) и 46,4% (40,0-53,0) против 53,5% (47,36-56,9) при $p < 0,001$ и $p = 0,004$ соответственно), абсолютное содержание CD4⁺Т-лимфоцитов (701 кл/1 мкл (478-807) против 1005 кл/1 мкл (700-1419) при $p = 0,020$ и 876 кл/1 мкл (661-1046) при $p = 0,008$ соответственно), а также более высокие показатели CD8⁺Т-лимфоцитов (29,4% (20,7-39,7) и 26,5% (21,1-32,7), против 21,3% (17,1-26,0), при $p = 0,024$ и $p = 0,026$ соответственно) [4].

Долговременные последствия тяжелого течения COVID-19 заключаются в стойких нарушениях функционирования адаптивного звена иммунной системы, включая формирование значительного количества неспособных полноценно функционировать CD8⁺Т-клеток [16]. У пациентов с тяжелым эпизодом коронавирусной инфекции в анамнезе, спустя шесть месяцев после выздоровления, наблюдается резкое сокращение числа наивных CD8⁺Т-клеток, игра-

ющих важную роль в формировании первичного иммунного ответа [47]. Высокий уровень истощенных CD8⁺ клеток ассоциирован с тяжестью течения COVID-19 и ухудшением исходов болезни [34], а уменьшение численности наивных CD8⁺ лимфоцитов отмечается сразу после перенесенной коронавирусной инфекции [26]. Указанные изменения способны негативно влиять на способность организма противостоять новым инфекционным агентам, злокачественным новообразованиям и способствовать хронизации воспалительных реакций, что значительно усложняет реабилитационный процесс и требует особого внимания в процессе медицинского сопровождения пациента.

Как уже упоминалось выше, переболевшие COVID-19 часто сталкиваются с различными хроническими симптомами постковидного синдрома, а также со сбоями в работе иммунной системы [15, 18, 21]. Такие пациенты нередко сталкиваются с повторными бактериальными и грибковыми инфекциями, обусловленными ослабленным иммунитетом. Несмотря на то, что основная часть лонгитюдных исследований была посвящена пациентам с тяжелым течением COVID-19, современные научные данные [23, 24, 35, 42, 45] демонстрируют наличие разнообразных проявлений long-COVID и у лиц, перенесших инфекцию в легкой или субклинической форме. При этом у данной категории пациентов наблюдаются менее выраженные изменения иммунного профиля и патогенетических механизмов.

Известно, что SARS-CoV-2 вызывает значительные изменения в составе лимфоцитов, приводящие к снижению выработки зрелых лимфоцитов. С помощью проточной цитометрии I. Kwieciec и соавт. провели оценку иммунологического профиля пациентов с COVID-19 с интерстициальными поражениями на рентгенограмме грудной клетки и без таковых в сравнении с условно здоровыми лицами. В группе с изменениями на рентгенограмме отмечен значительно более высокий процент плазмобластов и более низкий процент CD4⁺ лимфоцитов в сравнении с двумя другими группами. У пациентов с положительным рентгенологическим статусом COVID-19 наблюдалась также более низкая доля эффекторных CD4⁺T-клеток, наивных CD8⁺T-клеток и более высокая доля клеток центральной памяти CD4⁺ и эффекторных CD8⁺T-клеток по сравнению с контрольной группой [32].

Вышеуказанные изменения иммунологических параметров свидетельствуют о необходимости

сти пересмотра существующих подходов к оценке функционального состояния иммунной системы у перенесших COVID-19 лиц.

В настоящем исследовании повышение числа лиц с патологическими уровнями TREC и/или KREC свидетельствует о продолжительном влиянии SARS-CoV-2 на состояние иммунной системы. Снижение функциональной активности иммунной системы, проявляющееся в виде дефицита образования новых T- и B-лимфоцитов, способствующего ухудшению гуморального и клеточного звеньев иммунитета, создает основу для развития постковидного синдрома.

Несмотря на увеличение доли лиц с патологическими уровнями TREC и/или KREC, настоящее исследование показало необходимость дифференцированной оценки постпандемических популяционных уровней TREC для разных возрастных групп и единой оценки для KREC лицам 18 лет и старше. Однако при этом продемонстрирована трансформация популяционных диапазонов TREC и KREC в постпандемический период. Были обнаружены следующие ключевые изменения: снижение минимальных популяционных значений TREC в старших возрастных группах относительно допандемических показателей и парадоксальное увеличение нижнего популяционного уровня KREC на 50,5% (75,1 копий/10⁵ клеток по сравнению с допандемическим уровнем 49,9 копий/10⁵ клеток).

Расширение нижних уровней TREC можно объяснить функциональным снижением количества клеток памяти. Основной задачей T-клеток CD8⁺ является, как известно, устранение инфицированных вирусами клеток [5]. Развитие T-клеток, как CD4⁺, так и CD8⁺, происходит в тимусе, откуда выходят недавние клетки-эмигранты тимуса (Recent thymic emigrants, RTE) и направляются во вторичные лимфоидные органы (селезенку и лимфатические узлы) [37]. Созревание RTE приводит к образованию зрелых наивных T-клеток, которые после контакта с антигеном трансформируются в эффекторные и центральные клетки памяти. Эффекторные T-лимфоциты устраняют инфицированные вирусом клетки, в то время как центральные клетки памяти активируются после контакта с другим антигеном и становятся эффекторными клетками памяти или центральными клетками памяти. Зрелые клетки CD4⁺ в основном играют роль в активации, пролиферации и дифференцировке цитотоксических T-лимфоцитов CD8⁺ и стимуляции B-лимфоцитов к образованию специфических антител. То есть, перенесенная вирусная

инфекция может вызывать стойкое снижение уровня TREC, что свидетельствует о возможном долгосрочном или перманентном нарушении иммунной реконституции. Данное предположение находит косвенное подтверждение в выявленной возрастной динамике изменений: если нижние границы значений TREC в группах 18-29 и 30-39 лет остались практически неизменными, то в старших возрастных группах зафиксированы статистически значимые отклонения. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными, свидетельствующими об отсутствии значимых различий в уровнях TREC между инфицированными SARS-CoV-2 и здоровыми лицами молодого возраста (18-29 лет), а также сообщавшими о существовании возраст-ассоциированного роста частоты тяжелых форм COVID-19, который коррелирует со снижением показателей TREC [13].

Если изменение нижних уровней TREC легко объяснить результатом влияния COVID-19, приводящим к длительному снижению уровней Т-лимфоцитов, то увеличение нижнего уровня KREC требует дальнейших исследований.

Анализ международных публикаций выявил работы, в которых зарегистрированные референсные диапазоны существенно превышали показатели, полученные в настоящем исследовании. Так, L. Shakerian и соавт. в 2019 г. обследовали 133 условно здоровых добровольцев из Ирана, выделив две возрастные группы: 15-35 лет ($n = 83$) и от 35 лет ($n = 50$). Для указанных групп были определены диапазоны TREC и KREC (копий/3,2 мм образца крови): для группы 15-35 лет диапазон уровня TREC составил 29 ± 23 копий/3,2 мм образца крови, диапазон уровня KREC составил 24 ± 16 копий/3,2 мм образца крови; для группы от 35 лет диапазон уровня TREC – 0-35 копий/3,2 мм образца крови, диапазон уровня KREC – 29 ± 22 копий/3,2 мм образца крови [43].

В исследовании J.S.Y. Kwok и соавт. в 2020 г. были определены уровни TREC и KREC у 185 взрослых условно здоровых доноров (90 мужчин и 95 женщин; медианный возраст: 44,1 года), жителей Гонконга. Референтные интервалы были установлены для 5-ти возрастных групп: 19-30 лет (уровень TREC: 12-20831 копий/ 10^6 клеток, уровень KREC: 1-3063), 31-40 лет (уровень TREC: 10-8436 копий/ 10^6 клеток, уровень KREC: 2-6098 копий/ 10^6 клеток), 41-50 лет (уровень TREC: 7-6644 копий/ 10^6 клеток, уровень KREC: 4-7363 копий/ 10^6 клеток), 5-60 лет (уровень TREC: 0 и 0 копий/ 10^6 клеток, уровень KREC: 3-5566 ко-

пий/ 10^6 клеток) и от 61 года, (уровень TREC: 0 и 0 копий/ 10^6 клеток, уровень KREC: 1-2907 копий/ 10^6 клеток) [33]. В данном исследовании, ввиду малочисленности выборки, не проводили редактирование выбросов и экстремальных значений, что может быть причиной полученных отличий между проведенным нами исследованием и исследованием в 2020 году. Другой причиной могла оказаться пандемия коронавируса, начавшаяся в 2019 году в Китае, так как достоверно известно, что данная вирусная инфекция влияет на функциональную активность иммунной системы [47, 48].

Расхождения между полученными нами значениями и данными вышеописанных исследований, вероятно, обусловлены недостаточным размером выборки в указанных работах, что не соответствует требованиям международных стандартов для достоверного установления, заявленных авторами референсных интервалов. Наблюдаемые различия в уровнях аналитов могут отражать комплексное влияние региональных факторов, включая экологические условия (как природные, так и антропогенные), а также этнодемографические особенности популяций. При интерпретации полученных данных следует учитывать, что такая мультифакторная обусловленность требует тщательного анализа при сопоставлении результатов между регионами, особенно при наличии значимых различий в уровне загрязнения окружающей среды или этническом составе исследуемых групп.

Тем не менее ни описанные результаты, ни возможные причины различий не объясняют повышение нижней границы KREC при одновременном увеличении доли лиц с патологически низкими его уровнями. Однако можно предположить, что к такому эффекту приводит принципиальное участие В-клеток в противовирусном иммунном ответе. Генерации функционирующих В-клеток предшествует выход переходных В-лимфоцитов из костного мозга. Они мигрируют в периферические лимфоидные органы и в конечном итоге развиваются в наивные В-клетки. Под воздействием антигена наивные В-клетки преобразуются в В-клетки памяти или плазмобласты, созревающие до плазматических клеток, основной функцией которых является интенсивная выработка антител. Таким образом, вирусная инфекция индуцирует активацию иммунного ответа, сопровождающуюся усиленной пролиферацией В-лимфоцитов. Маркером повышенной активации зрелых В-клеток становится пиковое (транзиторное?) повышение уровня KREC.

Косвенным подтверждением предположений о причинах изменения в постпандемическом периоде нижних границ уровней TREC (снижение) и KREC (повышение) являются результаты исследования, показавшего, что активация как CD4⁺/CD8⁺Т-клеток, так и В-клеток, различается у наивных и переболевших COVID-19 людей на протяжении 11-месячного постинфекционного периода [46].

Таким образом, патоген-индуцированные изменения могли вызвать модификацию диапазонов TREC и KREC, что требует оценки необходимости пересмотра ранее принятых нормативных значений, так как только адекватно рассчитанные референсы позволяют определить степень функциональной недостаточности иммунной системы, способность организма к возобновлению нормального синтеза зрелых лимфоцитов, а также оценить стабилизацию иммунологических изменений после перенесенного заболевания. Однако открытым остается вопрос сохранения новых уровней TREC и KREC в популяции на

протяжении следующих лет, что требует дальнейших популяционных исследований в динамике.

Заключение

Проведенное исследование свидетельствует о значительном увеличении частоты патологических значений TREC и KREC в популяции, что, вероятно, отражает долгосрочные изменения иммунного статуса после перенесенного COVID-19. Полученные данные указывают на рост доли лиц с потенциально нарушенной иммунной функцией, что может ассоциироваться с повышенным риском инфекционных и других заболеваний, связанных с иммунной недостаточностью.

Выявленные изменения подчеркивают значимость постоянного мониторинга иммунологического статуса населения в постпандемический период. Перспективным направлением дальнейших исследований представляется изучение временной динамики обнаруженных нарушений и разработка превентивных стратегий для минимизации отдаленных последствий COVID-19.

Список литературы / References

1. Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Коробова З.Р., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В., Куликов А.Н., Лioзнов Д.А., Шарапова М.А., Певцов Д.Э., Тотолян Арег А. Цитокины в плазме крови больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, №2. С. 311-326. [Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Lioznov D.A., Sharapova M.A., Pevtcov D.E., Totolian Areg A. Plasma Cytokines in Patients with COVID-19 During Acute Phase of the Disease and Following Complete Recovery. *Meditinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 311-326. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2312.
2. ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов. М.: Стандартинформ, 2009. 19 с. [GOST R 53022.3-2008. Clinical laboratory technologies. Requirements for the quality of clinical laboratory studies. Part 3. Rules for assessing the clinical information content of laboratory tests]. Moscow: Standartinform, 2009. 19 p.
3. Евгина С.А., Савельев Л.И. Современная теория и практика референтных интервалов // Лабораторная служба, 2019. Т. 8, № 2. С. 36-44. [Evgina S.A., Saveliev L.I. Current Theory and Practice of Reference Interval. *Laboratornaya sluzhba = Laboratory Service*, 2019, Vol. 8, no. 2, pp. 36-44. (In Russ.)]
4. Зурочка А.В., Добрынина М.А., Сафронова Э.А., Зурочка В.А., Зуйкова А.А., Сарапульцев Г.П., Забков О.И., Мосунов А.А., Верховская М.Д., Дукардт В.В., Фомина Л.О., Костоломова Е.Г., Останкова Ю.В., Кудрявцев И.В., Тотолян А.А. Нарушения Т-клеточного звена иммунитета через 6–12 месяцев после острой фазы коронавирусной инфекции: скрининговое исследование // Инфекция и иммунитет, 2024. Т. 14, № 4. С. 756-768. [Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Safronova E.A., Zurochka V.A., Zuikova A.A., Sarapultsev G.P., Zabkov O.I., Mosunov A.A., Verkhovskaya M.D., Ducardt V.V., Fomina L.O., Kostolomova E.G., Ostankova Y.V., Kudryavtsev I.V., Totolian A.A. Alterations in T Cell Immunity Over 6–12 Months Post-COVID-19 Infection in Convalescent Individuals: A Screening Study. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2024, Vol. 14, no. 4, pp. 756-768. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AIT-17646.
5. Иммунология по Ярилину: учебник / Под ред. С.А. Недоспасова, Д.В. Купраша. 2-е изд., испр. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. 808 с. [Immunology According to Yarilin: Textbook. Ed. Nedospasov S.A., Kuprash D.V. 2nd ed., revised and enlarged]. Moscow: GEOTAR-Media, 2021. 808 p.
6. Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Тотолян А.А. Т-хелперы и их клетки-мишени при COVID-19 // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 3. С. 409-426. [Kudryavtsev I.V., Golovkin A.S., Totolian A.A. T helper cell subsets and related target cells in acute COVID-19. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 3, pp. 409-426. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-THC-1882.

7. Останкова Ю.В., Сайтгалина М.А., Арсентьева Н.А., Тотолян А.А. Оценка уровней TREC/KREC у ВИЧ-инфицированных лиц // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии, 2024. Т. 16, № 2. С. 51-59. [Ostankova Yu.V., Saitgalina M.A., Arsentieva N.A., and Totolian A.A. Evaluation of TREC/KREC Levels in HIV-Infected Individuals. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2024, Vol. 16, no. 2, pp. 51-59. (In Russ.)]
8. Попова А.Ю., Горбунова А.Ю., Останкова Ю.В., Егорова С.А., Рейнгардт Д.Э., Иванова А.Р., Щемелев А.Н., Дрозд И.В., Жимбаева О.В., Данилова Е.М., Миличкина А.М., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Буц Л.В., Тотолян Арег А. Популяционный иммунитет к вирусу гепатита А у населения Санкт-Петербурга и Ленинградской области // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 3. С. 625-642. [Popova A.Yu., Gorbunova A.Yu., Ostankova Yu.V., Egorova S.A., Reingardt D.E., Ivanova A.R., Schemelev A.N., Drozd I.V., Zhimbaeva O.B., Danilova E.M., Milichkina A.M., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Bashketova N.S., Buts L.V., Totolian Areg A. Herd Immunity to Hepatitis A Virus in the Saint Petersburg and Leningrad Region. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2025, Vol. 27, no. 3, pp. 625-642. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-HIT-3224.
9. Попова А.Ю., Егорова С.А., Смирнов В.С., Ежлова Е.Б., Миличкина А.М., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Историк О.А., Буц Л.В., Рэмзи Э.С., Дрозд И.В., Жимбаева О.Б., Дробышевская В.Г., Данилова Е.М., Иванов В.А., Тотолян А.А. Популяционный иммунитет к вакциноуправляемым инфекциям (кори, краснухе, эпидемическому паротиту) у населения Санкт-Петербурга и Ленинградской области // Инфекция и иммунитет, 2024. Т. 14, № 6. С. 1187-1208. [Popova A.Yu., Egorova S.A., Smirnov V.S., Ezhlova E.B., Milichkina A.M., Melnikova A.A., Bashketova N.S., Istorik O.A., Buts L.V., Ramsay E.S., Drozd I.V., Zhimbaeva O.B., Drobyshevskaya V.G., Danilova E.M., Ivanov V.A., and Totolian A.A. Herd Immunity to Vaccine Preventable Infections in Saint Petersburg and the Leningrad Region: Serological Status of Measles, Mumps, and Rubella. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2024, Vol. 14, no. 6, pp. 1187-1208. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-HIT-17797.
10. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Чхинджерия И.Г., Гречанинова Т.А., Агапов К.А., Арсентьева Н.А., Баженова Н.А., Бацунов О.К., Данилова Е.М., Зуева Е.В., Комкова Д.В., Кузнецова Р.Н., Любимова Н.Е., Маркова А.Н., Хамитова И.В., Ломоносова В.И., Ветров В.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период эпидемии COVID-19 // Проблемы особо опасных инфекций, 2020. № 3. С. 124-130. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Chkhindzheriya I.G., Grechaninova T.A., Agapov K.A., Arsent'eva N.A., Bazhenova N.A., Batsunov O.K., Danilova E.M., Zueva E.V., Komkova D.V., Kuznetsova R.N., Lyubimova N.E., Markova A.N., Khamitova I.V., Lomonosova V.I., Vetrov V.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., and Totolyan A.A. Herd Immunity to SARS-CoV-2 Among the Population in Saint-Petersburg During the COVID-19 Epidemic. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, no. 3, pp. 124-130. (In Russ.)]
11. Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Определение референтных интервалов циркулирующих в крови эксцизионных колец TREC и KREC у лиц старше 18 лет // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6. С. 1227-1236. [Saitgalina M.A., Liubimova N.E., Ostankova Yu.V., Kuznetsova R.N., and Totolian A.A. Determination of Reference Values for TREC and KREC in Circulating Blood of Persons Over 18 Years. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1227-1236. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-DOR-2587.
12. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Арсентьева Н.А., Коробова З.Р., Любимова Н.Е., Кащенко В.А., Куликов А.Н., Певцов Д.Э., Станевич О.В., Черных Е.И., Тотолян Арег А. Значимость определения уровней молекул TREC и KREC в периферической крови для прогноза исхода заболевания COVID-19 в острый период // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 611-618. [Saitgalina M.A., Ostankova Yu.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Lyubimova N.E., Kashchenko V.A., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Stanevich O.V., Chernykh E.I., Totolian Areg A. Levels of TREC and KREC Molecules Significance Determining in Peripheral Blood for Predicting the Outcome of COVID-19 Disease in the Acute Period. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 611-618. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-14714-LOT.
13. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Арсентьева Н.А., Коробова З.Р., Любимова Н.Е., Кащенко В.А., Куликов А.Н., Певцов Д.Э., Станевич О.В., Черных Е.И., Тотолян А.А. Оценка уровней молекул TREC и KREC у больных COVID-19 с разной степенью тяжести течения заболевания // Инфекция и иммунитет, 2023. Т. 13, № 5. С. 873-884. [Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Arsentieva N.A., Korobova Z.R., Liubimova N.E., Kashchenko V.A., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Stanevich O.V., Chernykh E.I., Totolian A.A. Assessment of trec and krec levels in COVID-19 patients with varying disease severity. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, Vol. 13, no. 5, pp. 873-884. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AOT-16937.
14. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями // Инфекция и иммунитет, 2022, Т. 12, № 5. С. 981-996. [Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetsova R.N., Totolian A.A. Modified

quantitative approach for assessing peripheral blood TREC and KREC levels in immunodeficient patients. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 5, pp. 981-996. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039.

15. Al-Aly Z., Xie Y., Bowe B. High-dimensional characterization of post-acute sequelae of COVID-19. *Nature*, 2021, Vol. 594, no. 7862, pp. 259-264.

16. Alijotas-Reig J., Anunciacion-Llunell A., Esteve-Valverde E., Morales-Pérez S., Rivero-Santana S., Trapé J., González-García L., Ruiz D., Marques-Soares J., Miro-Mur F. Pituitary-Adrenal Axis and Peripheral Immune Cell Profile in Long COVID. *Biomedicines*, 2024, Vol. 12, no. 3, 581. doi: 10.3390/biomedicines12030581.

17. Bergwerk M., Gonen T., Lustig Y., Amit S., Lipsitch M., Cohen C., Mandelboim M., Levin E.G., Rubin C., Indenbaum V., Tal I., Zavitan M., Zuckerman N., Bar-Chaim A., Kreiss Y., Regev-Yochay G. Covid-19 Breakthrough Infections in Vaccinated Health Care Workers. *N. Engl. J. Med.*, 2021, Vol. 385, no. 16, pp. 1474-1484.

18. Bowe B., Xie Y., Al-Aly Z. Postacute sequelae of COVID-19 at 2 years. *Nat. Med.*, 2023, Vol. 29, no. 9, pp. 2347-2357.

19. Brown J.J., Datta V., Browning M.J., Swift P.G.F. Graves' disease in DiGeorge syndrome: patient report with a review of endocrine autoimmunity associated with 22q11.2 deletion. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 2004, Vol. 17, pp. 1575-1579.

20. Dasouki M., Jabr A., AlDakheel G., Elbadaoui F., Alazami A.M., Al-Saud B., Arnaout R., Aldhekri H., Alotaibi I., Al-Mousa H., Hawwari A. TREC and KREC profiling as a representative of thymus and bone marrow output in patients with various inborn errors of immunity. *Clin. Exp. Immunol.*, 2020, Vol. 202, no. 1, pp. 60-71.

21. Davis H.E., McCorkell L., Vogel J.M., Topol E.J. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2023, Vol. 21, no. 3, pp. 133-146.

22. De Ioris M.A., Scarselli A., Bracaglia C., Perrotta D., Bernardi S., Santilli V., Ceglie G., Fabozzi F., Agrati C., Prencipe G., Alaggio R., Mastronuzzi A., De Vito R. Common bone marrow signature in COVID-19-associated multisystem inflammatory syndrome in children: A first-wave small case series experience. *Pediatr. Blood Cancer*, 2022, Vol. 69, no. 11, e29919. doi: 10.1002/psc.29919.

23. Files J.K., Boppana S., Perez M.D., Sarkar S., Lowman K.E., Qin K., Sterrett S., Carlin E., Bansal A., Sabbaj S., Long D.M., Kutsch O., Kobie J., Goepfert P.A., Erdmann N. Sustained Cellular Immune Dysregulation in Individuals Recovering From SARS-CoV-2 Infection. *J. Clin. Invest.*, 2021, Vol. 131, no. 1, 140491. doi: 10.1172/JCI140491

24. García-Abellán J., Padilla S., Fernández-González M., García J.A., Agulló V., Andreo M., Ruiz S., Galiana A., Gutiérrez F., Masiá M. Antibody Response to SARS-CoV-2 Is Associated With Long-Term Clinical Outcome in Patients With COVID-19: A Longitudinal Study. *J. Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 41, no. 7, pp. 1490-1501.

25. Gonçalves R., Couto J., Ferreirinha P., Costa J.M., Silvério D., Silva M.L., Fernandes A.I., Madureira P., Alves N.L., Lamas S., Saraiva M. SARS-CoV-2 variants induce distinct disease and impact in the bone marrow and thymus of mice. *iScience*, 2023, Vol. 26, no. 2, 105972. doi: 10.1016/j.isci.2023.105972.

26. Gong F., Dai Y., Zheng T., Cheng L., Zhao D., Wang H., Liu M., Pei H., Jin T., Yu D., Zhou P. Peripheral CD4⁺ T Cell Subsets and Antibody Response in COVID-19 Convalescent Individuals. *J. Clin. Invest.*, 2020, Vol. 130, no. 12, pp. 6588-6599.

27. Hu B., Huang S., Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2021, Vol. 93, no. 1, pp. 250-256.

28. Ioannou M., Zacharouli K., Doukas S.G., Diamantidis M.D., Tsangari V., Karakousis K., Koukoulis G.K., Vageli D.P. Hemophagocytic lymphohistiocytosis diagnosed by bone marrow trephine biopsy in living post-COVID-19 patients: case report and mini-review. *J. Mol. Histol.*, 2022, Vol. 53, no. 4, pp. 753-762.

29. Khadzhieva M.B., Kalinina E.V., Larin S.S., Sviridova D.A., Gracheva A.S., Chursinova J.V., Stepanov V.A., Redkin I.V., Avdeikina L.S., Rummyantsev A.G., Kuzovlev A.N., Salnikova L.E. TREC/KREC Levels in Young COVID-19 Patients. *Diagnostics*, 2021, Vol. 11, no. 8, 1486. doi: 10.3390/diagnostics11081486.

30. Korobova Z.R., Arsentieva N.A., Butenko A.A., Kudryavtsev I.V., Rubinstein A.A., Turenko A.S., Ostankova Y.V., Boeva E.V., Knizhnikova A.A., Norika A.O., Rassokhin V.V., Belyakov N.A., Totolian A.A. T Cell Dynamics in COVID-19, Long COVID and Successful Recovery. *Int. J. Mol. Sci.*, 2025, Vol. 26, no. 15, 7258. doi: 10.3390/ijms26157258.

31. Korobova Z.R., Zueva E.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Liubimova N.E., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Savin T.V., Stanevich O.V., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Changes in Anti-SARS-CoV-2 IgG Subclasses over Time and in Association with Disease Severity. *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 5, 941. doi: 10.3390/v14050941.

32. Kwiecień I., Rutkowska E., Kłos K., Więsik-Szewczyk E., Jahnz-Różyk K., Rzepecki P., Chciałowski A. Maturation of T and B Lymphocytes in the Assessment of the Immune Status in COVID-19 Patients. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 12, 2615. doi: 10.3390/cells9122615.

33. 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.

34. Li M., Guo W., Dong Y., Wang X., Dai D., Liu X., Wu Y., Li M., Zhang W., Zhou H., Zhang Z., Lin L., Kang Z., Yu T., Tian C., Qin R., Gui Y., Jiang F., Fan H., Heissmeyer V., Sarapultsev A., Wang L., Luo S., Hu D. Elevated

Exhaustion Levels of NK and CD8⁺ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 580237. doi: 10.3389/fimmu.2020.580237.

35. Malkova A., Kudryavtsev I., Starshinova A., Kudlay D., Zinchenko Y., Glushkova A., Yablonskiy P., Shoenfeld Y. Post COVID-19 Syndrome in Patients With Asymptomatic/Mild Form. *Pathogens*, 2021, Vol. 10, no. 11, 1408. doi: 10.3390/pathogens10111408.

36. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J.; HLH Across Specialty Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10229, pp. 1033-1034.

37. Middelkamp V., Kekäläinen E. Measuring thymic output across the human lifespan: a critical challenge in laboratory medicine. *GeroScience*, 2025. doi: 10.1007/s11357-025-01555-3.

38. Ochani R., Asad A., Yasmin F., Shaikh S., Khalid H., Batra S., Sohail M.R., Mahmood S.F., Ochani R., Hussham Arshad M., Kumar A., Surani S. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Infez. Med.*, 2021, Vol. 29, no. 1, pp. 20-36.

39. Quinti I., Soresina A., Spadaro G., Martino S., Donnanno S., Agostini C. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 27, no. 3, pp. 308-316.

40. Rossetti C.L., Cazarin J., Hecht F., Beltrão F.E.L., Ferreira A.C.F., Fortunato R.S., Ramos H.E., de Carvalho D.P. COVID-19 and thyroid function: what do we know so far? *Front. Endocrinol.*, 2022, Vol. 13, 1041676. doi: 10.3389/fendo.2022.1041676.

41. Savchenko A.A., Tikhonova E., Kudryavtsev I., Kudlay D., Korsunsky I., Beleniuk V., Borisov A. TREC/KREC Levels and T and B Lymphocyte Subpopulations in COVID-19 Patients at Different Stages of the Disease. *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 3, 646. doi: 10.3390/v14030646.

42. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.-B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E.; Karolinska COVID-19 Study Group; Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.-I., Sönnernborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.-Gu., Aleman S., Buggert M. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals With Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 1, pp. 158-168.e14.

43. Shakerian L., Pourpak Z., Shamlou S., Domsgen E., Kazemnejad A., Dalili H., Nourizadeh M. Determining Laboratory Reference Values of TREC and KREC in Different Age Groups of Iranian Healthy Individuals. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.*, 2019, Vol. 18, no. 2, pp. 143-152.

44. Sottini A., Serana F., Bertoli D., Chiarini M., Valotti M., Vaglio Tessitore M., Imberti L. Simultaneous quantification of T-cell receptor excision circles (TRECs) and K-deleting recombination excision circles (KRECs) by real-time PCR. *J. Vis. Exp.*, 2014, Vol. 94, 52184. doi: 10.3791/52184.

45. Sudre C.H., Murray B., Varsavsky T., Graham M.S., Penfold R.S., Bowyer R.C., Pujol J.C., Klaser K., Antonelli M., Canas L.S., Molteni E., Modat M., Cardoso M.J., May A., Ganesh S., Davies R., Nguyen L.H., Drew D.A., Astley C.M., Joshi A.D., Merino J., Tsereteli N., Fall T., Gomez M.F., Duncan E.L., Menni C., Williams F.M.K., Franks P.W., Chan A.T., Wolf J., Ourselin S., Spector T., Steves C.J. Attributes and Predictors of Long COVID. *Nat. Med.*, 2021, Vol. 27, no. 4, pp. 626-631.

46. Thoo L., Gumowski P.I., Kammermann K., Nussli S., Grabscheid B., Hausmann O., Axius U., Pichler W.J., Yerly D. Highly Specific and Reliable In Vitro Diagnostic Analysis of Memory T and B Lymphocytes in a Swiss Cohort of COVID-19 Patients. *Swiss Med. Wkly*, 2021, Vol. 151, w30005. doi: 10.4414/sm.w.2021.w30005

47. Wiech M., Chrosicki P., Swatler J., Stepnik D., De Biasi S., Hampel M., Brewinska-Olchowik M., Maliszewska A., Sklinda K., Durlik M., Wierzba W., Cossarizza A., Piwocka K. Remodeling of T Cell Dynamics During Long COVID Is Dependent on Severity of SARS-CoV-2 Infection. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 886431. doi: 10.3389/fimmu.2022.886431.

48. Woodruff M.C., Ramonell R.P., Haddad N.S., Anam F.A., Rudolph M.E., Walker T.A., Truong A.D., Dixit A.N., Han J.E., Cabrera-Mora M., Runnstrom M.C., Bugrovsky R., Hom J., Connolly E.C., Albizua I., Javia V., Cashman K.S., Nguyen D.C., Kyu S., Singh Saini A., Piazza M., Tipton C.M., Khosroshahi A., Gibson G., Martin G.S., Maier C.L., Esper A., Jenks S.A., Lee F.E., Sanz I. Dysregulated Naive B Cells and De Novo Autoreactivity in Severe COVID-19. *Nature*, 2022, Vol. 611, no. 7934, pp. 139-147.

49. World Health Organization. Timeline: WHO's COVID-19 response. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline>.

50. Wu Q., Thakolwiboon S., Ali A.S., Wang Q., Dwyer D., Fox D.A., Mao-Draayer Y. MOG-specific T cell response amplified in para- and post-SAR-CoV-2 infection in myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease. *J. Neuroimmunol.*, 2023, Vol. 382, 578143. doi: 10.1016/j.jneuroim.2023.578143.

51. Xu C.S., Yang W.X. ACE2 in male genitourinary and endocrine systems: does COVID-19 really affect these systems? *Histol. Histopathol.*, 2023, Vol. 38, no. 3, pp. 261-272.

Авторы:

Ольховская А.Ю. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Останкова Ю.В. — к.б.н., заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Сайтгалина М.А. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Егорова С.А. — д.м.н., заместитель директора по инновациям ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Щемелев А.Н. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Дрозд И.В. — к.б.н., заведующая центральной клинико-диагностической лабораторией медицинского центра ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Жимбаева О.Б. — заведующая лабораторией молекулярно-генетической диагностики медицинского центра ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Данилова Е.М. — заведующая диспансерно-поликлиническим отделением Медицинского центра ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Миличкина А.М. — к.м.н., главный врач медицинского центра ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Olkhovskaya A. Yu., Laboratory Research Assistant, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Ostankova Yu. V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Virology HIV, Senior Researcher at the Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Saitgalina M. A., PhD (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Egorova S. A., PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Innovations, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Schemelev A. N., PhD (Biology), Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Virology HIV Infection, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Drozdt I. V., PhD (Biology), Head, Central Clinical Diagnostic Laboratory of the Medical Center, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Zhimbaeva O. B., Head, Laboratory of Molecular Genetic Diagnostics of the Medical Center, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Danilova E. M., Head, Outpatient Department of the Medical Center, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Milichkina A. M., PhD (Medicine), Chief Physician of the Medical Center, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Башкетова Н.С. — руководитель управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по городу Санкт-Петербургу и Ленинградской области, Санкт-Петербург, Россия

Буц Л.В. — к.м.н., специалист 1-й категории ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Bashketova N.S., Head of the Department, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for St. Petersburg and Leningrad Region, St. Petersburg, Russian Federation

Buts L.V., PhD (Medicine), 1st Category Specialist, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 11.08.2025
Принята к печати 18.08.2025

Received 11.08.2025
Accepted 18.08.2025

КОЗЛОВ ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ (К 85-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)



Фото Игоря Парфенова

20 июля 2025 года исполнилось 85 лет со дня рождения Владимира Александровича Козлова – одного из крупнейших советских и российский иммунологов, академика Российской академии наук, профессора, доктора медицинских наук, заведующего кафедрой клинической иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета, научного руководителя Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ), заведующего лабораторией клинической иммунопатологии этого же института.

Владимир Александрович родился в городе Новосибирске. В 1963 году окончил Новосибирский государственный медицинский институт. С 1963 года он последовательно прошел путь ординатора, аспиранта, младшего и старшего научного сотрудника, заведующего лабораторией, заместителя директора по научной работе, директора института, заместителя председателя Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.

В 1969 году Владимир Александрович защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по теме «Постэмбриональные и пострadiaционные сдвиги в иммунокомпетентной ткани животных разных генотипов», в 1981 году им была защищена докторская диссертация на тему «Гуморально-клеточные уровни регуляции основных этапов антителогенеза».

В 1986 году Владимиру Александровичу было присвоено звание «профессор» по специальности «аллергология и иммунология», в 1994 году – избран членом-корреспондентом Российской академии медицинских наук (РАМН) по специальности «Иммунология», в 2002 году – действительным членом (академиком) РАМН по специальности «Иммунология».

Важнейшими трудовыми достижениями Владимира Александровича являются многолетние масштабные комплексные исследования по следующим направлениям:

- молекулярно-генетические основы регуляции процессов дифференцировки, активации и пролиферации клеток иммунной системы;
- интегративная роль иммунной системы во взаимодействии с основными регуляторными системами организма;
- клеточные и молекулярно-генетические механизмы формирования иммунопатологических состояний при развитии основных заболеваний человека.

С именем В.А. Козлова связано развитие фундаментальных исследований в области регуляции иммунного гомеостаза во взаимодействии с нервной, эндокринной и кроветворной системами в норме и патологии.

Владимир Александрович внес большой вклад в развитие экспериментальной иммунологии. Им были выявлены разнонаправленные конкурентные механизмы регуляции пролиферации и дифференцировки стволовых кроветворных клеток, а также впервые в мире выдвинута и обоснована гипотеза об участии полипотентных стволовых кроветворных клеток в формировании иммунного ответа.

Впервые в мире В.А. Козловым с сотрудниками описаны иммунорегуляторные функции эритроидных клеток. По результатам этих исследований в 1990 году Госкомитетом СССР по делам изобретений зарегистрировано открытие «Явление регуляции гуморального иммунного ответа гетерогенной популяцией клеток эритроидного ряда». Впоследствии из эритробластов был выделен иммунодепрессивный фактор, обладающий ингибирующим эффектом на пролиферацию В-лимфоцитов.

Под руководством В.А. Козлова разработан новый иммуноактивный препарат, не имеющий аналогов в России и за рубежом, – Нб (цепь гемоглобина) со свойствами модулятора эритро- и иммунопоза. Обоснована возможность применения нового ингибитора пролиферации стволовых кроветворных клеток (Нбβ, а также входящего в его состав пептида PN951) в качестве химиопротекторного средства.

В последние десятилетия под руководством В.А. Козлова инициированы и успешно ведутся до настоящего времени работы по созданию принципиально нового класса препаратов для лечения основных заболеваний человека на основе биомедицинских клеточных продуктов. Среди наиболее перспективных разработок можно отметить: клеточные продукты на основе генно-модифицированных Т-клеток для терапии онкологических заболеваний (CAR-T, TCR-T, TCR-подобные CAR-T клетки); дендритно-клеточные вакцины в лечении онкологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний; M2-макрофаги и секретируемые ими продукты в лечении нейропатологии и психоневрологических расстройств; Т-клеточные вакцины в лечении аллергических и аутоиммунных заболеваний; стволовые клетки костного мозга в лечении цирроза печени, травматических повреждений спинного и головного мозга, ишемии нижних конечностей.

Можно сказать, что именно благодаря идейному руководству Владимира Александровича фундаментальные и прикладные разработки в области клеточных технологий стали визитной карточкой НИИФКИ, а Клиника иммунопатологии – единственным в Сибири клиническим учреждением, специализирующимся на лечении больных с нарушениями функций иммунной системы, в том числе и с помощью внедренных методов иммунотерапии.

Одним из направлений деятельности института является проведение, поисковых и прикладных исследований, направленных на развитие новых методов иммунодиагностики, иммунопрофилактики и иммунотерапии. В связи с распространением коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, которая стала одним из самых значительных вызовов не только для здравоохранения, но и для научных учреждений страны, при кураторстве В.А. Козлова в НИИФКИ был разработан и запатентован новый способ лечения и реабилитации пациентов с хроническими постковидными нарушениями обоняния, основанный на интраназальном введении пациентами секреторных факторов собственных макрофагов. Данный подход позволил восстановить обоняние у пациентов с продолжительностью такого вида расстройств более 12 месяцев.

В.А. Козлов обогатил науку новыми представлениями о закономерностях функционирования иммунной системы как целостного образования. Системный подход позволил получить ряд уникальных данных о механизмах иммунорегулирующего действия гормонов, нейромедиаторов и нейропептидов, о механизмах нейроэндокринной регуляции функций макрофагов. Его неутомимая энергия и жажда новых идей позволяет развивать направления и воплощать перспективные проекты. Одним из таковых в последние годы является изучение тимуса и основ его функционирования на протяжении всей жизни человека. В основу новой концепции академика положен тот факт, что тимус выступает не только инициатором иммунопатогенеза аутоиммунных и онкологических заболеваний, но и пролонгатором инфекционных болезней, аллергических и других состояний организма, особое место в которых занимает процесс старения. Владимир Александрович ставит тимус как центральный орган иммунной системы во главу угла, делая акцент на необходимости лечения не «периферии» иммунной

системы, а ее «центра» – тимуса. Если мы этому научимся, то можно будет подумать не только о лечении, но и излечении многих заболеваний.

Под руководством В.А. Козлова сформировалась школа высококвалифицированных исследователей в области иммунологии. Им подготовлено более 70 докторов и кандидатов наук. В течение ряда лет В.А. Козлов является председателем защитного диссертационного совета 24.1.184.01 (Д 001.001. XX) по специальности 3.2.7. Иммунология; главным редактором журналов «Клеточная трансплантология и тканевая инженерия» и «Традиционная медицина. Восток и Запад», заместителем главного редактора журнала «Цитокины и воспаление», членом редакционных коллегий журналов «Бюллетень СО РАМН», «Медицинская иммунология» (Санкт-Петербург), «Аллергология и иммунология», «Клеточные технологии в биологии и медицине», членом редакционного совета журнала «Российский иммунологический журнал» (Москва), членом редакционного совета журнала «Иммунология» (Москва).

В.А. Козлов является почетным вице-президентом Российского научного общества иммунологов (РНОИ), президентом Ассоциации специалистов клинических иммунологов и клеточных технологов, вице-президентом Education Instruction Committee of World Federation of Chinese Medicine Societies, почетным членом The World Immunopathology Organization (WIPO), приглашенным профессором в Тяньцзиньском университете традиционной китайской медицины.

Огромны заслуги В.А. Козлова в преподавании иммунологии и усилиях выделить иммунологию в самостоятельную научную дисциплину. Он является заведующим кафедрой иммунологии ФМПЗ ИМТ Новосибирского государственного университета (НГУ) и инициатором создания курсов «Иммунология» и «Клеточные технологии» в этом университете.

В.А. Козлов – автор и соавтор более 1250 научных публикаций, в том числе 15 монографий, 7 руководств и учебников. Им получено 36 патентов, 9 авторских свидетельств, 1 диплом на открытие.

Владимир Александрович удостоен премии РАМН им. Н.И. Пирогова, почетного знака им. акад. РАМН В.И. Иоффе; является кавалером золотого почетного знака «Общественное признание»; ему присвоено почетное звание «заслуженный ветеран Сибирского отделения РАН»; награжден золотой медалью Российского научного общества иммунологов, государственной премией Правительства Российской Федерации в области образования, знаком отличия «За заслуги перед Новосибирской областью» и знаком «Отличник здравоохранения».

В эти юбилейные дни все иммунологи России присоединяются к многочисленным поздравлениям в адрес академика В.А. Козлова и желают ему творческого долголетия и активной работы на благо клинической и фундаментальной иммунологии.

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 β 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 β 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, нарисованные 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 представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок». *Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка»*)

6) Файл в формате .doc, .docx, ttf, 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 www.e-library.ru |

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**

| | | | | | |
|-----------------------|------|-----------------------|------------------|---------------------------|------|
| Абрамовских О.С. | 1053 | Луцкович Е.С. | 1001 | Шмелькова П.Н. | 935 |
| Акрамова Э.Р. | 935 | Мелешко А.Н. | 1001 | Щемелев А.Н. | 1127 |
| Альтман Д.Ш. | 1087 | Меркульева Ю.А. | 1077 | Щербаков Д.Н. | 1077 |
| Андреев С.М. | 1033 | Миличкина А.М. | 1127 | Ali Khodadadi | 1043 |
| Асанбаева А.А. | 1033 | Минасова А.А. | 1053 | Bogatireva K.P. | 985 |
| Башкетова Н.С. | 1127 | Миславский О.В. | 1033 | Bormotova E.A. | 985 |
| Беленькая С.В. | 1077 | Некрасова Е.В. | 1013 | Bukharin O.V. | 961 |
| Боргоякова М.Б. | 1077 | Несмеянова В.С. | 1077 | Chepanov S.V. | 1111 |
| Буц Л.В. | 1127 | Новикова Е.Г. | 973 | Denisova E.A. | 1099 |
| Быков А.С. | 945 | Нохрин Д.Ю. | 1053 | Duplik N.V. | 985 |
| Быстрова Т.Н. | 973 | Олькин С.Е. | 1077 | Gholam Abbas Kaydani | 1043 |
| Волкова Н.В. | 1077 | Ольховская А.Ю. | 1127 | Gupalova T.V. | 985 |
| Волосникова Е.А. | 1077 | Орлов С.В. | 1013 | Ivanova E.V. | 961 |
| Гайнуллина Д.Х. | 935 | Останкова Ю.В. | 1127 | Kogan I.Yu. | 1099 |
| Горшков Г.С. | 945 | Павлов В.Н. | 935 | Kornyushina E.A. | 1111 |
| Давыдова Е.В. | 1087 | Павлов О.В. | 1021, 1111 | Koroleva I.V. | 985 |
| Давыдова Н.В. | 1063 | Пашнин С.Л. | 1087 | Kostolomova E.G. | 961 |
| Даниленко Е.Д. | 1077 | Путков С.Б. | 1063 | Kramskaya T.A. | 985 |
| Данилова Е.М. | 1127 | Пьянков О.В. | 1077 | Ladan Fatahi | 1043 |
| Дрозд И.В. | 1127 | Савочкина А.Ю. | 1053 | Leontieva G.F. | 985 |
| Егорова С.А. | 1127 | Сайтгалина М.А. | 1127 | Marko O.B. | 1099 |
| Еникеева К.И. | 935 | Саматова А.И. | 1053 | Markov A.A. | 961 |
| Есина Т.И. | 1077 | Свитич О.А. | 945 | Maryam Seyedtabib | 1043 |
| Жакупова Я.Т. | 1087 | Сельков С.А. | 1021, 1099, 1111 | Mohammad Rashno | 1043 |
| Жимбаева О.Б. | 1127 | Селятицкая В.Г. | 973 | Mohsen Sarkarian | 1043 |
| Журавлев И.Ю. | 1087 | Смирнов В.В. | 1033 | Moosa Shariffat | 1043 |
| Зайковская А.В. | 1077 | Соколов Д.И. | 899, 1099 | Paromova Ya.I. | 961 |
| Зурочка В.А. | 1087 | Тотолян Арег А. | 1127 | Perunova N.B. | 961 |
| Ильичев А.А. | 1077 | Троицкий А.В. | 973 | Polyanskih E.D. | 961 |
| Исаева А.А. | 1077 | Уразова О.И. | 973 | Sadegh Moradi | 1043 |
| Казаков С.П. | 1063 | Федорова К.С. | 1053 | Shengeliia M.O. | 1111 |
| Калимуллина Л.И. | 935 | Хаитов М.Р. | 1033 | Suvorov A.N. | 985 |
| Керезь М.А. | 1001 | Черченко Н.Г. | 1033 | Timokhina T.K. | 961 |
| Клыч А.В. | 1001 | Чурина Е.Г. | 973 | Tkhai D.V. | 1111 |
| Копылова А.Д. | 1033 | Шарифьянова Ю.В. | 935 | Tyshchuk E.V. | 1099 |
| Корнюшина Е.А. | 1021 | Шатилов А.А. | 1033 | | |
| Луцкович Д.В. | 1001 | Шатилова А.В. | 1033 | | |

| | | | |
|--|------------|--|-----------|
| адгезионный фенотип | 1022 | простата..... | 936 |
| активация макрофагов | 974 | протективность | 986 |
| аллергены..... | 1034 | ПЦР | 1043 |
| антиген | 1001 | рак..... | 936 |
| антигенный фенотип..... | 1112 | рекомбинантная химерная вакцина | 986 |
| беременность..... | 1022, 1112 | рекомбинантные белки | 1034 |
| бифидобактерии | 962 | РНК | 936 |
| военный стресс..... | 1088 | секвенирование..... | 936 |
| воспаление..... | 974, 1054 | симбиоз..... | 962 |
| вторичный иммунодефицит | 1128 | сперматозоиды | 1054 |
| гематологические индексы | 1088 | спермиологический анализ | 1054 |
| дезоксирибонуклеазы..... | 1054 | стрептококк группы А..... | 986 |
| дифференцировка..... | 900 | субпопуляции лимфоцитов | 1064 |
| ДНК..... | 936 | субпопуляции моноцитов..... | 1022 |
| заболевание COVID-19 | 1064 | субпопуляционный профиль лимфоцитов..... | 1088 |
| иммунный ответ..... | 962 | субъединичные вакцины | 1078 |
| иммуногенность..... | 986, 1078 | транскриптомика | 936 |
| иммунология | 946 | тромбоцитарно-моноцитарные комплексы | 1112 |
| иммунотерапия | 1001 | тромбоциты | 1112 |
| инфекции..... | 974 | трофобласт..... | 1100 |
| ИФА | 1043 | фенотип | 900 |
| катионные дендримерные пептиды | 1034 | фенотипы макрофагов | 974 |
| качество эякулята..... | 1054 | цитокиновый шторм | 1064 |
| конъюгаты пептидов | 1034 | цитокины | 900, 1043 |
| лабораторная диагностика..... | 1128 | цитотоксичность..... | 900 |
| лимфопения | 1064 | шкала Глисона | 1043 |
| лимфоциты | 900 | экзотоксин SpeA | 986 |
| макрофаги человека..... | 1013 | эндоглин | 1100 |
| маркеры активации | 1022 | antiVEGF..... | 1100 |
| механизм действия | 974 | Bet v 1..... | 1034 |
| механоиммунология..... | 946 | C5a-пептидаза | 986 |
| механотрансдукция | 946 | CAR-T | 1001 |
| механочувствительность | 946 | CAR-T-клеточная терапия | 946 |
| микробиота..... | 962 | <i>ccl19</i> | 1013 |
| моноциты..... | 1022, 1112 | CD105..... | 1100 |
| мужское бесплодие | 1054 | COVID-19 | 962, 1128 |
| наномоторы | 946 | GD2 | 1001 |
| нарушения адаптации | 1088 | γδТ-клетки | 900 |
| нарушения сперматогенеза..... | 974 | KREC | 1128 |
| нейробластома | 1001 | long-COVID | 1128 |
| нейтрализующие антитела..... | 1078 | NK-клетки..... | 1100 |
| нетрин-1 | 1013 | <i>ntn1</i> | 1013 |
| окисленный декстран..... | 974 | О-ацетил-GD2 | 1001 |
| опухоль..... | 1043 | RBD | 1078 |
| ось «кишечник – легкие»..... | 962 | S-белок | 1078 |
| пептидные адьюванты..... | 1034 | SARS-CoV-2 | 1078 |
| показатели клеточного звена иммунитета | 1064 | scRNAseq..... | 936 |
| постпандемический период..... | 1128 | Т-клетка | 946 |
| привычное невынашивание беременности..... | 1022, 1112 | TGF-β..... | 1100 |
| пробиотики..... | 962 | TREC..... | 1128 |
| провоспалительный фенотип..... | 1022 | <i>unc5b</i> | 1013 |
| прогноз..... | 1064 | | |

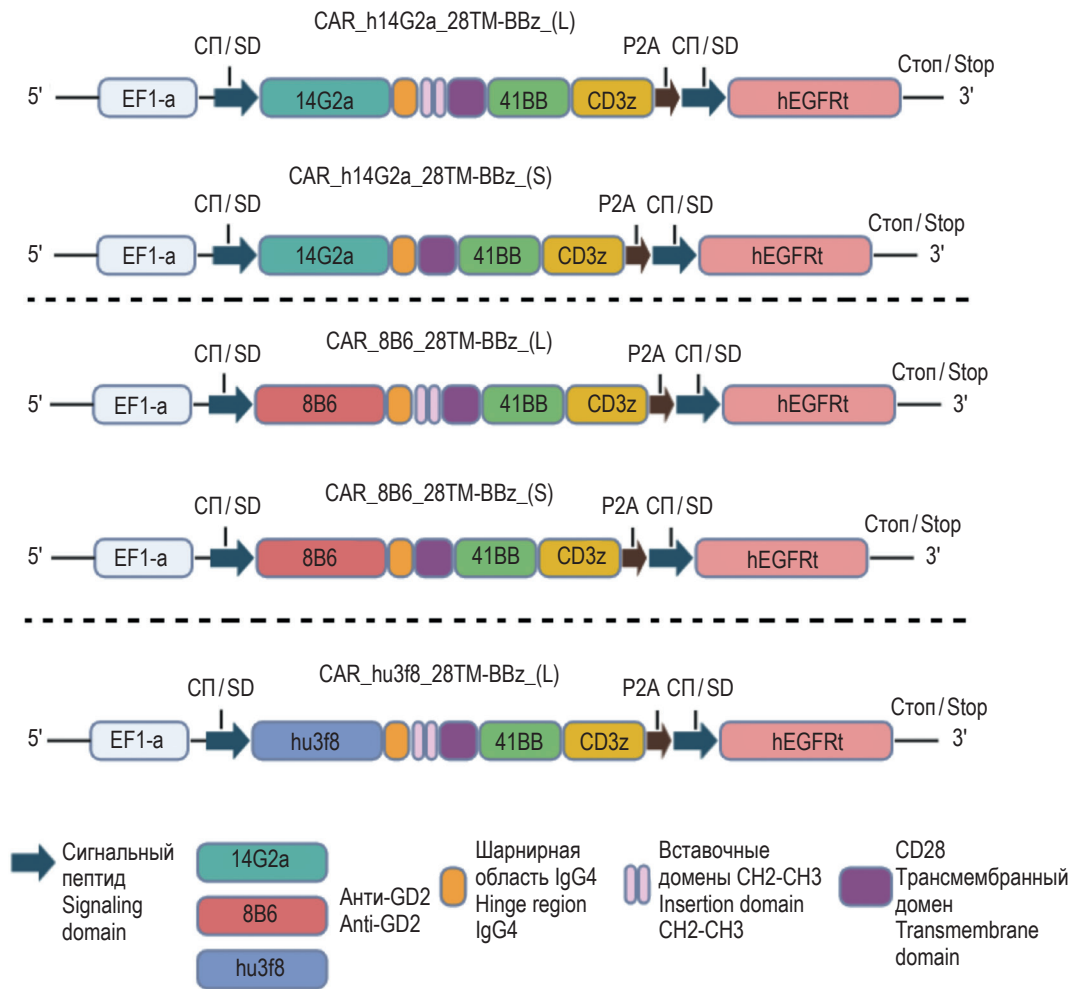


Рисунок 2. Схема конструкции CAR анти-GD2 второго поколения

Figure 2. Schematic diagram of the second-generation CAR anti-GD2 design

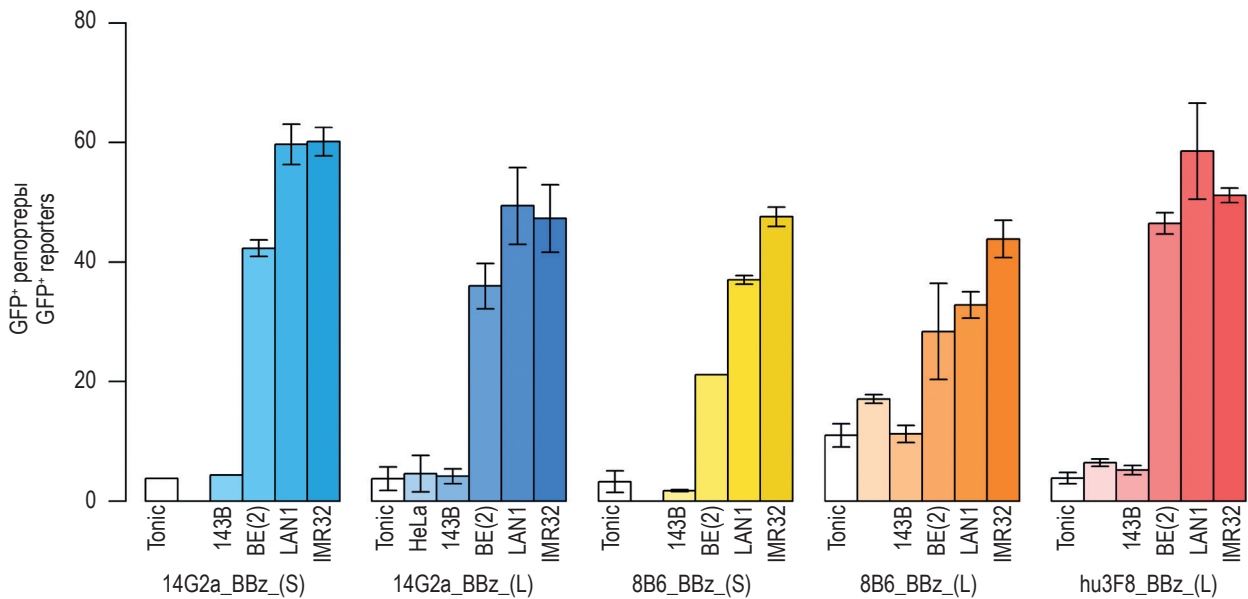


Рисунок 3. Активация репортерной линии Jurkat-NFAT-GFP в тесте с клетками-мишенями

Figure 3. Activation of the Jurkat-NFAT-GFP reporter line in a test with target cells

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311**

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >