

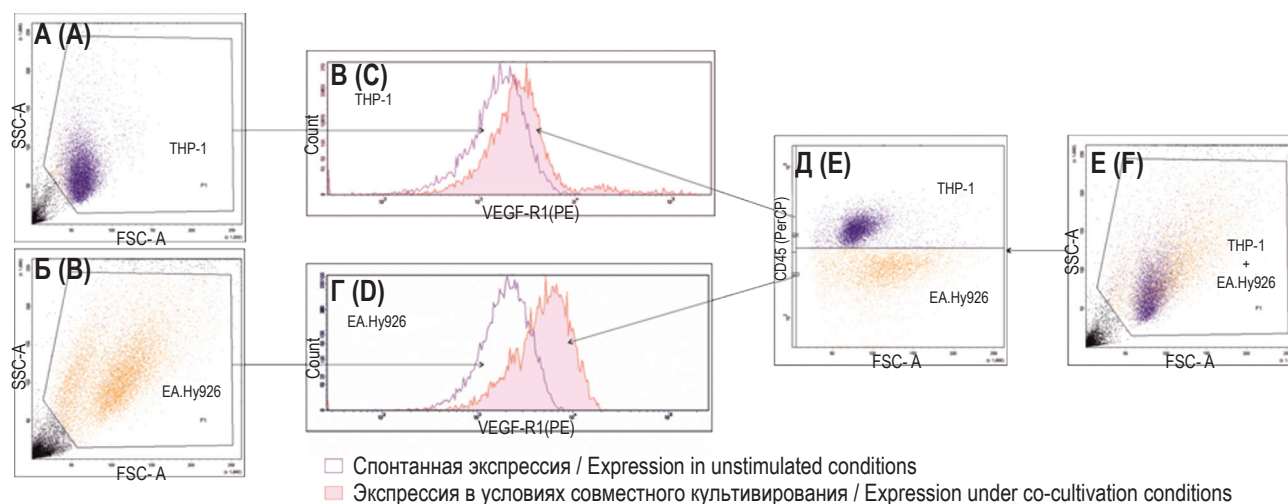
ISSN 1563-0625 (print)  
ISSN 2313-741X (online)

Том 22, № 2. С. 201-398

**2020**

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

# МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

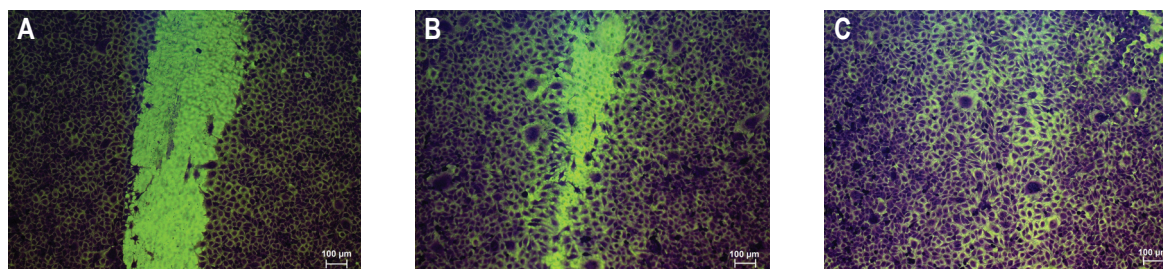


**Рисунок 2. Экспрессия VEGFR1 на ЭК и клетках линии THP-1**

Примечание. А – график в координатах прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния для клеток линии THP-1 (монокультивирование). Б – график в координатах FSC и SSC для ЭК (монокультивирование). В – изменение интенсивности экспрессии VEGFR1 на клетках линии THP-1 при их совместном культивировании с ЭК. Г – изменение интенсивности экспрессии VEGFR1 на ЭК при их совместном культивировании с клетками линии THP-1. Д – график в координатах FSC и CD45 (PerCP) отражает разделение клеток линии THP-1 и ЭК; разделение ЭК и клеток линии THP-1. Е – график в координатах FSC и SSC для совместного культивирования ЭК и клеток линии THP-1.

Figure 2. Expression of VEGFR1 by EC and THP-1 cells

Note. A, the graph displaying THP-1 cells (monoculture) in forward scatter light (FSC) and side scatter light (SSC) coordinates. B, the graph displaying EC (monoculture) in FSC and SSC coordinates. C, change of the intensity of VEGFR1 expression by THP-1 cells during their cultivation with EC. D, change of the intensity of expression of VEGFR1 by EC during their cultivation with THP-1 cells. E, the graph in FSC and CD45 (PerCP) coordinates reflects the separation of THP-1 cells and EC. F, the graph in FSC and SSC coordinates for the co-cultivation of EC and THP-1 cells.



**Supplementary Figure 1. Migration of cells of the EA.Hy926 cell line**

Note. Stained with crystal violet,  $\times 100$  (A) Initial width of the disrupted monolayer (migration surface) line. (B) Migration after incubation in medium containing 2.5% FCS for 24 hours. (C) Migration after incubation in medium containing 10% FCS for 24 hours.

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

---

# МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

март-апрель

**2020, том 22**

**№ 2**

---

Основан в марте 1999 года

## Главный редактор

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

## Заместитель главного редактора

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

## Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

**Назаров Петр Григорьевич** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 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

**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

**Хаитов Рахим Мусаевич** – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

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

## Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

## Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.  
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

## Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

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

## Адрес для корреспонденции:

197136, Санкт-Петербург, а/я 58.

**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.

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 27.03.2020 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 24,75. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1032

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

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

---

# **MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA**

March-April

**2020, volume 22**

**No. 2**

---

Published since March 1999

## Editor-in-Chief

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

## Deputy Editor-in-Chief

**Areg A. Totolian** – PhD, MD, Professor, RAS full member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, 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

**Petr G. Nazarov** – PhD, MD, Professor, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

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

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

**Rahim M. Khaitov** – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology, Scientific Director, Moscow, 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

## Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia  
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

## Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

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

## Address for correspondence:

197136, St. Petersburg, P.O. Box 58.

**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

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 27.03.2020. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 24.75. Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

199178, Russian Federation, St. Petersburg, 8 line of Vasilevsky 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 June 2016, the Medical Immunology Journal is included into international SCOPUS database.*

# СОДЕРЖАНИЕ

## Обзоры

Олейник Е.К., Шибяев М.И., Игнатъев К.С., Олейник В.М., Жулай Г.А.

МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ: ФОРМИРОВАНИЕ ИММУННОГО ПРОФИЛЯ ..... 207

Полозова Э.И., Пузанова Е.В., Сеськина А.А.

РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ И ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ  
В ГЕНЕЗЕ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ ..... 221

## Оригинальные статьи

Козырева А.Р., Львова Т.Ю., Маркова К.Л., Симбирцев А.С., Ищенко А.М., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ВЛИЯНИЕ ДЕПРИВАЦИИ VEGF НА ОБРАЗОВАНИЕ СОСУДОВ ЭНДОТЕЛИЕМ В ПРИСУТСТВИИ МАКРОФАГОВ ..... 231

Маркова К.Л., Михайлова В.А., Кореньевский А.В., Милютин Ю.П., Родыгина В.В., Александрова Е.П., Марков А.С., Балабас О.А.,  
Сельков С.А., Соколов Д.И.

МИКРОВЕЗИКУЛЫ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ ЛИНИИ NK-92 ВЛИЯЮТ НА ФЕНОТИП И ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ  
КЛЕТОК ЛИНИИ EA.Hy926 ..... 249

Тыринова Т.В., Леллина О.Ю., Тихонова М.А., Сахно Л.В., Максимова А.А., Останин А.А., Черных Е.Р.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНЕРИРУЕМЫХ *IN VITRO* ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК С СОДЕРЖАНИЕМ  
CD16<sup>+</sup> КЛЕТОК В ПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ..... 269

Королевская Л.Б., Сайдакова Е.В., Шмагель Н.Г., Шмагель К.В.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ  
ПАЦИЕНТОВ С ДИСКОРДАНТНЫМ ОТВЕТом НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ ..... 281

Бацунов О.К., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Эсауленко Е.В., Семенов А.В., Тополян Арег А.

СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В  
НА РАННИХ СТАДИЯХ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ ..... 291

Нероев В.В., Зайцева О.В., Балацкая Н.В., Лазутова А.А.

ЛОКАЛЬНАЯ И СИСТЕМНАЯ ПРОДУКЦИЯ 45 ЦИТОКИНОВ ПРИ ОСЛОЖНЕННОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ  
РЕТИНОПАТИИ ..... 301

Маснавицева Л.Б., Кудяева И.В., Кузнецова Ю.А.

АУТОАНТИТЕЛА КАК МАРКЕРЫ СОСТОЯНИЯ СЕРДЦА У ПАЦИЕНТОВ С ВИБРАЦИОННОЙ БОЛЕЗНЬЮ, ОТЯГОЩЕННОЙ  
САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ..... 311

Винник Ю.С., Дунаевская С.С., Антюфреева Д.А.

ЦИРКУЛЯЦИЯ МИКРОЧАСТИЦ ЛИМФОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ..... 319

Ширинский В.С., Калиновская Н.Ю., Филатова К.Ю., Ширинский И.В.

КЛИНИЧЕСКАЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА ОСТЕОАРТРИТА ..... 327

Ермоленко Е.И., Кудрявцев И.В., Соловьева О.И., Карасева А.Б., Цапиева А.Н., Кондратенко Ю.Д., Котылева М.П., Серебрякова М.К.,  
Шумихина И.А., Суворов А.Н.

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ И МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА  
ПРИ СИНДРОМЕ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА ..... 335

Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Мошев А.В.

ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПА И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ ОТ КОЛИЧЕСТВА Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ  
КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ ..... 347

Шуклина М.А., Степанова Л.А., Ковалева А.А., Коротков А.В., Шалджян А.А., Зайцева М.В., Елецкая Е.И., Цыбалова Л.М.

ИНТРАНАЗАЛЬНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ НА ОСНОВЕ M2e-ПЕПТИДА И ФРАГМЕНТА ВТОРОЙ  
СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСОВ ГРИППА А ИНДУЦИРУЕТ КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ  
И Т-КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ У МЫШЕЙ ..... 357

Бауэр Т.В., Трегубчик Т.В., Щелкунов С.Н., Максютков Р.А., Гаврилова Е.В.

ПОЛУЧЕНИЕ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ С ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРИОНОВ  
И НАПРАВЛЯЮЩИМ СИНТЕЗОМ GM-CSF КАК ПЕРСПЕКТИВНОЙ ОСНОВЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ ..... 371

## Случай из практики

Кувшинова Е.В., Куртасова Л.М., Борисов А.Г., Шмидт А.Р., Герасимова Т.А.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ПЕРВИЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТНОГО СОСТОЯНИЯ: X-СЦЕПЛЕННАЯ АГАММАГЛОБУЛИНЕМИЯ ..... 379

Марченко В.Н., Бручкус Е.А., Лебедева А.А., Давыдов Д.А., Шапорова Н.П., Дудина О.В., Стумльская О.А., Зинакова М.К.

КОМОРИДНЫЙ ПАЦИЕНТ С ЭОЗИНОФИЛЬНЫМ ГРАНУЛЕМАТОЗОМ С ПОЛИАНГИТОМ: ВСЕГДА ЛИ ОДНОЗНАЧНА  
ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ..... 383

Юбилей ..... 393

Правила для авторов ..... 395

Авторский указатель ..... 398

Предметный указатель ..... 398

# CONTENTS

## Reviews

Oleinik E.K., Shibaev M.I., Ignatiev K.S., Oleinik V.M., Zhulai G.A.

**TUMOR MICROENVIRONMENT: THE FORMATION OF THE IMMUNE PROFILE ..... 207**

Polozova E.I., Puzanova E.V., Seskina A.A.

**ROLE OF IMMUNOLOGICAL DISORDERS, ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND HEMOSTATIC DISORDERS IN THE GENESIS OF ARTERIAL HYPERTENSION IN THE METABOLIC SYNDROME ..... 221**

## Original articles

Kozyreva A.R., Lvova T.Yu., Markova K.L., Simbirtsev A.S., Ischenko A.M., Selkov S.A., Sokolov D.I.

**INFLUENCE OF VEGF DEPRIVATION UPON VASCULAR FORMATION BY ENDOTHELIUM IN THE PRESENCE OF MACROPHAGES ..... 231**

Markova K.L., Mikhailova V.A., Korenevsky A.V., Milyutina Yu.P., Rodygina V.V., Aleksandrova E.P., Markov A.S., Balabas O.A., Selkov S.A., Sokolov D.I.

**MICROVESICLES PRODUCED BY NATURAL KILLER CELLS OF THE NK-92 CELL LINE AFFECT THE PHENOTYPE AND FUNCTIONS OF ENDOTHELIAL CELLS OF THE EA.Hy926 CELL LINE ..... 249**

Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Sakhno L.V., Maximova A.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

**RELATIONSHIP BETWEEN THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF IN VITRO GENERATED MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS AND THE PRESENCE OF CD16<sup>+</sup> CELLS AMONG PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES ..... 269**

Korolevskaya L.B., Saidakova E.V., Shmagel N.G., Shmagel K.V.

**REGULATORY T CELL SUBSETS IN PERIPHERAL BLOOD OF HIV-INFECTED PATIENTS WITH DISCORDANT RESPONSE TO ANTIRETROVIRAL THERAPY ..... 281**

Batsunov O.K., Arsentieva N.A., Lyubimova N.E., Esaulenko E.V., Semenov A.V., Totolyan Areg A.

**CONTENT OF CERTAIN CYTOKINES AND CHEMOKINES IN BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B IN THE EARLY STAGES OF LIVER FIBROSIS ..... 291**

Neroev V.V., Zaytseva O.V., Balatskaya N.V., Lazutova A.A.

**LOCAL AND SYSTEMIC PRODUCTION OF 45 CYTOKINES IN COMPLICATED PROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY ..... 301**

Masnavieva L.B., Kudaeva I.V., Kuznetsova Yu.A.

**AUTOANTIBODY AS MARKERS OF THE HEART STATE IN PATIENTS WITH VIBRATION DISEASE BURDENED DIABETES MELLITUS ..... 311**

Vinnik Yu.S., Dunayevskaya S.S., Antyufriyeva D.A.

**CIRCULATION OF MICROPARTICLES OF LYMPHOCYTIC ORIGIN AT CRITICAL ISCHEMIA OF THE LOWER EXTREMITIES ..... 319**

Shirinsky V.S., Kalinovskaya N.Yu., Filatova K.Yu., Shirinsky I.V.

**CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF METABOLIC PHENOTYPE OF OSTEOARTHRITIS ..... 327**

Ermolenko E.I., Kudryavtsev I.V., Solovyova O.I., Karaseva A.B., Tsapleva A.N., Kondratenko Yu.D., Kotyleva M.P., Serebryakova M.K.,

Shumikhina I.A., Suvorov A.N.

**PROFILE OF SUBPOPULATION COMPOSITION OF REGULATORY T LYMPHOCYTES AND INTESTINAL MICROBIOTA IN PATIENTS WITH IRRITABLE BOWEL SYNDROME ..... 335**

Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V.

**DEPENDENCE OF PHENOTYPE AND CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF MONOCYTES ON THE T REGULATORY CELLS CONTENT IN PATIENTS WITH KIDNEY CANCER ..... 347**

Shuklina M.A., Stepanova L.A., Kovaleva A.A., Korotkov A.V., Shaldzhyan A.A., Zaitseva M.V., Eletskaia E.I., Tsybalova L.M.

**INTRANASAL IMMUNIZATION WITH A RECOMBINANT PROTEIN BASED ON THE M2e PEPTIDE AND SECOND SUBUNIT OF INFLUENZA A VIRAL HEMAGGLUTININ FRAGMENT INDUCES A CROSS-PROTECTIVE HUMORAL AND T CELL RESPONSE IN MICE ..... 357**

Bauer T.V., Tregubchak T.V., Shchelkunov S.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V.

**OBTAINING VACCINIA VIRUS WITH INCREASED PRODUCTION OF EXTRACELLULAR ENVELOPED VIRIONS AND DIRECTING GM-CSF SYNTHESIS AS A PROMISING BASIS FOR DEVELOPMENT OF ANTITUMOR DRUG ..... 371**

## Clinical case

Kuvshinova E.V., Kurtasova L.M., Borisov A.G., Schmidt A.R., Gerasimova T.A.

**CLINICAL CASE OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCY: X-LINKED AGAMMAGLOBULINEMIA ..... 379**

Marchenko V.N., Bruchkus E.A., Lebedeva A.A., Davydov D.A., Shapороva N.L., Dudina O.V., Smulskaya O.A., Zinakova M.K.

**EOSINOPHILIC GRANULOMATOSIS WITH POLYANGIITIS IN COMORBID PATIENT: IS THE IMMUNOLOGICAL DIAGNOSTICS ALWAYS UNAMBIGUOUS ..... 383**

**Anniversary ..... 393**

**Instructions to Authors ..... 395**

**Author index ..... 398**

**Subject index ..... 398**

## МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ: ФОРМИРОВАНИЕ ИММУННОГО ПРОФИЛЯ

Олейник Е.К.<sup>1</sup>, Шибяев М.И.<sup>2</sup>, Игнатьев К.С.<sup>2</sup>, Олейник В.М.<sup>1</sup>,  
Жулай Г.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

**Резюме.** Микроокружение опухоли (Tumor Microenvironment — TME) формируется в результате взаимодействия и образования перекрестных связей между опухолевой клеткой и разными типами окружающих клеток. Исследования последних лет показали, что опухоль так перепрограммирует микроокружение, что TME способствует развитию первичных опухолей, их метастазированию и становится важным регулятором онкогенеза. Под влиянием опухоли значительным изменениям, «редактированию», подвергается иммунный профиль в TME. Образуется иммунодепрессивная сеть, которая подавляет активность главного эффектора клеточного иммунитета — Т-лимфоцитов. Т-клетки в TME находятся в состоянии анергии и истощения и характеризуются повышенной экспрессией ингибирующих рецепторов, снижением секреции цитокинов и цитолитической активности. Блокирование ингибиторных рецепторов специфическими антителами может привести к восстановлению функций истощенных Т-клеток. Поэтому восстановление функциональной активности Т-лимфоцитов представляет одну из важных стратегий в иммунотерапии рака. На формирование иммунного профиля влияют накапливающиеся в опухоли генетические аберрации, которые играют важную роль в создании специфического, характерного только для данной опухоли иммунного окружения в TME. Генетические изменения опухолевых клеток приводят к фенотипическим и функциональным перестройкам лимфоцитов, что позволяет опухоли избежать реакции иммунных клеток. Поскольку многие опухоли возникают после длительного воспаления или проявляют характеристики хронического воспаления по мере прогрессирования, воспаление считается важным фактором формирования TME, оказывающим влияние на иммунный профиль. Иммунные инфильтраты из разных опухолей человека, ассоциированных с воспалением, могут содержать ценную прогностическую и патофизиологическую информацию. Так, макрофаги в TME уже стали рассматриваться как информативный маркер и как терапевтическая мишень. Одним из основных механизмов, с помощью которого опухолевые клетки перепрограммируют окружающие клетки, является выделение экзосом — мелких везикул, которые переносят и доставляют белки и нуклеиновые кислоты к другим клеткам. При поглощении экзосомного груза в реципиентной клетке происходят молекулярные, транскрипционные и трансляционные изменения, которые оказывают влияние на функции неопухолевых клеток в TME. Поэтому опухолевые экзосомы представляют собой эффективное средство, с помощью которого опухоль может изменять реактивность иммунных клеток в TME. Таким образом, наряду с индивидуальным молекулярным и геномным тестированием опухоли, следует обратить внимание на более глубокий анализ

### Адрес для переписки:

Олейник Евгения Константиновна  
ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук»  
185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11.  
Тел.: 8 (8142) 76-98-10.  
Тел./факс: 8 (8142) 76-98-10.  
E-mail: ole@krc.karelia.ru

### Address for correspondence:

Oleinik Eugenia K.  
Institute of Biology of Karelian Research Centre  
185910, Russian Federation, Republic of Karelia, Petrozavodsk, Pushkinskaya str., 11.  
Phone: 7 (8142) 76-98-10.  
Phone/Fax: 7 (8142) 76-98-10.  
E-mail: ole@krc.karelia.ru

### Образец цитирования:

Е.К. Олейник, М.И. Шибяев, К.С. Игнатьев, В.М. Олейник, Г.А. Жулай «Микроокружение опухоли: формирование иммунного профиля» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 207–220.  
doi: 10.15789/1563-0625-TMT-1909  
© Олейник Е.К. и соавт., 2020

### For citation:

E.K. Oleinik, M.I. Shibaev, K.S. Ignatiev, V.M. Oleinik, G.A. Zhulay "Tumor microenvironment: the formation of the immune profile", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 207–220. doi: 10.15789/1563-0625-TMT-1909  
DOI: 10.15789/1563-0625-TMT-1909

иммунного профиля ТМЕ, который представляет собой большой ресурс биомаркеров и мишеней для иммунотерапии.

*Ключевые слова:* микроокружение опухоли, Т-лимфоциты, супрессия, опухоли, гетерогенность, экзосомы, иммунный профиль

## TUMOR MICROENVIRONMENT: THE FORMATION OF THE IMMUNE PROFILE

Oleinik E.K.<sup>a</sup>, Shibaev M.I.<sup>b</sup>, Ignatiev K.S.<sup>b</sup>, Oleinik V.M.<sup>a</sup>, Zhulai G.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

<sup>b</sup> Republican Cancer Dispensary, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

**Abstract.** Tumor microenvironment (TME) is formed as a result of interaction and cross-linking between the tumor cell and different types of surrounding cells. Recent studies have shown that the tumor reprograms the microenvironment so that TME promotes the development of primary tumors, their metastasis and becomes an important regulator of oncogenesis. Under the influence of the tumor, the immune profile in the TME undergoes significant changes, "editing". An immunosuppressive network is formed, which suppresses the activity of the main effector of cellular immunity – T lymphocytes. T cells in TMA are in a state of anergy and exhaustion. T cells in TME are characterized by increased expression of inhibitory receptors, decreased secretion of cytokines and cytolytic activity. Blocking inhibitory receptors with specific antibodies can lead to the restoration of the functions of exhausted T cells. Therefore, the restoration of the functional activity of T lymphocytes is one of the important strategies in cancer immunotherapy. The formation of the immune profile is influenced by genetic aberrations accumulating in the tumor. They play an important role in creating a specific, characteristic only for this tumor immune environment in the TME. Genetic changes in tumor cells lead to phenotypic and functional rearrangements of lymphocytes, which allows the tumor to escape the reaction of immune cells. Since many tumors occur after prolonged inflammation or exhibit characteristics of chronic inflammation as they progress, inflammation is considered an important factor in the formation of immune profile in TME. Immune infiltrates from different human tumors associated with inflammation may contain valuable prognostic and pathophysiological information. Macrophages in the TME now began to be regarded as descriptive marker and as a therapeutic target. One of the main mechanisms by which tumor cells reprogram surrounding cells is the release of exosomes – small vesicles that carry and deliver proteins and nucleic acids to other cells. When exosomal cargo is absorbed, molecular, transcriptional and translational changes occur in the recipient non-tumor cells in the TME. Therefore, tumor exosomes are an effective means by which the functions of immune cells in TME are purposefully changed. Thus, along with individual molecular and genomic testing of the tumor, attention should be paid to a deeper analysis of the immune profile of TME. It is a large resource of biomarkers and targets for immunotherapy.

*Keywords:* tumor microenvironment, T lymphocytes, suppression, tumors, heterogeneity, exosomes, immune profile

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН, бюджетная тема № 0218-2019-0083.

### Введение

До недавнего времени считалось, что причиной образования опухоли являются генетические аномалии, и онкогенез диктуется внутренними генетическими событиями в клетке. И на самом деле, онкогенез начинается после ступенчатого накопления генетических и эпигенетических изменений и возникновения неопластических фенотипов в нормальных клетках [28]. Гены-су-

прессоры опухолей (TSGs) регулируют самые важные процессы в клетке, такие как клеточный цикл, апоптоз, миграция, выживание и генетические изменения, которые приводят к нарушению этих процессов и могут привести к злокачественной трансформации. Однако в последние десятилетия появились новые экспериментальные данные, которые продемонстрировали, что генетические aberrации самостоятельно необходимы, но недостаточны, чтобы развился рак, и накопленные мутации, как правило, не приводят к образованию опухоли. Трансформированные клетки выживают и превращаются в инвазивные опухоли только в такой окружающей среде, кото-

рая обеспечит их в достаточном количестве питательными веществами и кислородом и где отсутствуют сильные цитотоксические сигналы [78]. Поэтому решающую роль в развитии рака может играть окружение опухоли (ТМЕ) — микросреда, которая образуется в результате взаимодействия и образования перекрестных связей между опухолевой клеткой и разными типами окружающих клеток, таких как инфильтрирующие иммунные, ангиогенные сосудистые, эндотелиальные и стромальные клетки [2, 3]. ТМЕ включает также внеклеточные сигнальные молекулы, хемокины, цитокины, факторы роста, а также метаболические регуляторы. В формирование ТМЕ также могут быть вовлечены и местные факторы тканевой среды (микробный баланс в кишечнике, иннервация и др.), внося дополнительную специфику в опухолевое микроокружение [63]. Под влиянием опухолевых клеток лимфоциты постепенно перепрограммируются, обретая самые разные функции в онкогенезе, иногда противоположные, проявляя как противоопухолевую, так и проопухолевую активность. Изменения, происходящие в ТМЕ с клетками иммунной системы под влиянием опухоли, формируют иммунный профиль, характерный для данной конкретной опухоли. Состав и функции иммунных клеток в ТМЕ значительно различаются не только между, но и внутри разных типов рака [78]. Анализ данных по экспрессии генов и клинических результатов 18 000 опухолей человека позволил установить существенные различия в относительном составе лейкоцитов как между различными типами опухолей, так и внутри одного их типа [26]. Например, среди разных подтипов рака молочной железы (РМЖ) только тройной отрицательный РМЖ (triple-negative ER/PR/HER2<sup>-</sup>) представлен самыми высокими уровнями опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) и макрофагов [68]. Были выявлены значительные вариации в присутствии в ТМЕ определенных подгрупп иммунных клеток и возможной связи их присутствия с течением болезни. Например, клетки-памяти (CD4<sup>+</sup>Т-клетки) были ассоциированы с неблагоприятным исходом при раке мочевого пузыря, но они же коррелировали с благоприятным исходом при аденокарциноме легкого. Это позволяет предполагать, что различия в иммунном профиле проявляются не только фенотипически, но имеют и функциональное значение. Но что определяет эти существенные различия иммунного профиля между разными опухолями? На фоне возрастающего интереса к использованию иммуномодулирующих препаратов для лечения онкологических больных становится крайне важным понять, какие факторы формируют гетерогенность и определяют специфику иммун-

ного профиля в ТМЕ, чтобы использовать эти знания для принятия рациональных комбинированных решений при иммунной терапии. Здесь имеются уже некоторые положительные примеры. Например, блокада Т-клеточных ингибиторных контрольных молекул (inhibitory checkpoint molecules) CTLA-4 и PD1 или ее лиганда PDL1 может индуцировать противоопухолевую активность Т-клеток и привести к позитивной клинической реакции у пациентов с прогрессирующей опухолью [58]. В последние десятилетия также стали активно использовать антитела, нацеленные на CTLA-4 и/или ось PD1-PDL1 при меланоме, немелкоклеточном раке легкого (NSCLC), почечно-клеточном раке (RCC), лимфоме Ходжкина, раке мочевого пузыря, опухолях с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI) [63]. Однако терапия с иммунными контрольными молекулами остается все-таки ограниченной для множества пациентов, так как показатели реагирования широко варьируют, и многие пациенты остаются невосприимчивыми к такому лечению [6]. Кроме того, пациенты с раком поджелудочной железы, предстательной железы или колоректальным раком (КРР) редко получают положительный эффект от блокады этих иммунных контрольных точек. Возможно, что в этих случаях очень важно установить те факторы в ТМЕ, которые не позволяют эффективно использовать иммунные контрольные молекулы.

Ниже будут рассматриваться данные об основных путях и механизмах иммунной модуляции в ТМЕ: о функциональном состоянии Т-клеток и иммуносупрессии, о механизмах ингибирования иммунных клеток экзосомами из опухолевых клеток, о роли воспаления и генетических аберраций в формировании иммунного профиля.

#### **Иммунные клетки в ТМЕ**

##### **Т-лимфоциты**

Клеточные и молекулярные механизмы, которые устанавливаются в ТМЕ, снижают реактивный статус Т-лимфоцитов — основных эффекторов иммунитета. Большинство исследований свидетельствует о том, что Т-клетки в ТМЕ находятся в состоянии анергии. Т-клеточная анергия обычно описывается как индуцированное опухолью состояние гипореактивности с нарушенной пролиферацией и IL-2 секрецией. Точные причины и пути развития анергии Т-клеток в ТМЕ пока не совсем ясны. Анергия Т-клеток обычно наступает после их неполной активации в ответ на субоптимальные количества IL-2 или из-за отсутствия костимулирующего сигнала. Механизмы, ответственные за Т-клеточную анергию в ТМЕ, зависят в основном от молекулярных свойств этих клеток, таких как экспрессия поверхностных молекул. Истощенные Т-клетки в микро-

окружении опухоли проявляют сверхэкспрессию ингибиторных рецепторов, снижение продукции эффекторных цитокинов и цитолитической активности, что и затрудняет элиминацию опухолевых клеток [34]. А опухолевые клетки и антигенпрезентирующие клетки сверхэкспрессируют PD-L1, тогда как экспрессия стимулирующих рецепторов CD80 и CD86 уменьшается.

Исследования пациентов с РМЖ показали, что при его воспалительном типе (IBC — Inflammatory breast cancer) заметно уменьшается абсолютное число лимфоцитов в периферической крови пациентов с метастатическим вариантом IBC [41, 46]. Отмечены также некоторые различия в функциях Т-лимфоцитов у пациентов с IBC и не-IBC. У пациентов с IBC наблюдали более низкие проценты TCR-активированных CD4<sup>+</sup> клеток и TCR-активированных CD8<sup>+</sup> клеток, которые секретируют IL-4 и IL-10 соответственно, а сверхэкспрессия лиганда апоптоза 1 (PDL1) происходила чаще при опухолях IBC (38%), чем при других типах опухолей РМЖ (10–30%) [11]. В целом анергия Т-клеток является обратимым дисфункциональным состоянием субпопуляций Т-клеток, и восстановление функций истощенных Т-клеток в ТМЕ является важнейшей стратегией иммунотерапии.

#### **Цитотоксические Т-лимфоциты (CTLs)**

Изучение CTLs в ТМЕ показало, что эти клетки находятся в состоянии истощения (exhausted) и характеризуются снижением уровня пролиферации, повышенной экспрессией ингибирующих рецепторов PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, BTLA, TIGIT, снижением продукции IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , гранзима В и нарушенной цитотоксичностью [28, 57, 79]. Типичным признаком истощения является экспрессия ингибиторного рецептора PD-1 [28]. Интересно, что истощенные CTLs и человека, и мышей коэкспрессируют ингибиторные рецепторы и число этих рецепторов коррелирует с уровнем истощения Т-клеток [34]. Примерно одна треть CD8<sup>+</sup>TILs коэкспрессирует PD-1 и CTLA-4. Эти PD-1<sup>+</sup>CTLA4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TILs демонстрируют более низкую пролиферацию и низкую способность продуцировать цитокины, чем обычные CTLs. Другие ингибиторные рецепторы, включая TIM-3, LAG-3, BTLA и TIGIT, также участвуют в развитии истощения опухоль-инфильтрирующих Т-клеток в ТМЕ [34]. Возможно, истощение происходит из-за непрерывного стимулирования CTLs, что приводит к потере ими эффективности и к апоптозу. Также есть мнение, что развитие отклонений в Т-клетках памяти может быть одной из главных причин истощения [34, 57].

Очевидно, ТМЕ оказывает большое влияние на фенотип, метаболизм, функциональность

и поддержание CTLs. По всей видимости, нарушается процесс дифференцировки CTLs в эффекторные клетки, а наивные Т-клетки не могут полностью активироваться. Это может быть связано с целым рядом причин: с низкой иммуногенностью опухолевых АГ из-за первоначального сходства опухолевых АГ с аутоантигенами, с низкой аффинностью специфических Т-клеточных рецепторов (TCR) к опухолевым АГ, недостаточной эффективностью и неадекватным представлением опухолевых АГ в процессе распознавания TCRs, а также с отсутствием воспалительных цитокинов и уменьшением экспрессии коstimуляторных молекул [57]. Скорее всего, здесь включаются механизмы иммунологической толерантности, что и приводит к снижению эффективности ответа CTLs в ТМЕ.

С другой стороны, эффекторные CTLs сталкиваются в ТМЕ со сложной регуляторной сетью различных клеток, включая опухолевые, воспалительные и стромальные клетки, и секретируемых этими клетками цитокинов, которые могут подавлять их активность и индуцировать истощенный фенотип. Изменения в метаболическом состоянии и доступность питательных веществ также могут изменить функциональную судьбу этих Т-лимфоцитов в ТМЕ. Некоторые исследователи полагают, что истощение CTLs может быть вызвано метаболическим стрессом в пределах ТМЕ [85]. Поскольку опухолевые клетки активно потребляют глюкозу через гликолиз в качестве основной метаболической программы обмена веществ, захватывая высокий процент глюкозы в окружающей среде, Т-клетки могут испытывать недостаток глюкозы в ТМЕ из-за конкуренции с опухолевыми клетками, и в таком случае гипогликемия может мешать полной активации CTLs, а также уменьшить экспансию и дифференцировку Т-клеток в регуляторные Т-лимфоциты (Tregs) [15]. С другой стороны, чрезмерное потребление глюкозы через гликолиз опухолевыми клетками связано с накоплением большого количества молочной кислоты, которая может подавлять пролиферацию, продукцию цитокинов и цитотоксическую активность CTLs в ТМЕ. Также чрезмерный метаболизм аминокислот (таких как триптофан, аргинин и глутамин) может подавлять противоопухолевые реакции CTLs в ТМЕ [30]. Накопление адипоцитов и адипоцитоподобных фибробластов и продукция больших количеств жирных кислот опухолевыми клетками приводит к обогащению ТМЕ липидами. Эти метаболические изменения могут способство-

вать развитию Tregs и подавлению эффекторных функций CTLs в ТМЕ.

Определенное влияние на состояние CTLs в ТМЕ оказывает их старение. Исследования пациентов с раком легкого (РЛ), опухолями головы и шеи показали, что происходят уменьшение экспрессии CD28 и избыточная экспрессия TIM-3, CD57 и лектин-подобных рецепторов семейства G, что ассоциируется со старением Т-клеток [28]. Совместное культивирование опухолевых клеток с Т-клетками индуцирует старение в Т-клетках и фактически ингибирует нормальную активность Т-клеток. В дополнение к фенотипическим изменениям, стареющие клетки постепенно утрачивают способность киллинга и развивают негативные регуляторные функции.

#### ***γδ Т-клетки***

Хотя большинство исследований Т-клеток в ТМЕ сосредоточено на клетках, которые экспрессируют специфичный  $\alpha\beta$ TCR, важными участниками иммунитета против опухоли также являются  $\gamma\delta$ TCR-экспрессирующие Т-клетки [66, 67].  $\gamma\delta$ Т-клетки имеют много общих качеств с  $\alpha\beta$ Т-клетками, таких как цитотоксические эффекторные функции, продукция провоспалительных цитокинов, но существует одно главное отличие этих клеток — их относительная независимость от главного комплекса гистосовместимости (МНС).  $\gamma\delta$ TCR не связывает молекулы МНС, и распознавание антигена  $\gamma\delta$ Т-клетками не рестриктировано по HLA [67, 73]. Это открывает новые возможности для разработки аллогенных стратегий иммунотерапии с использованием  $\gamma\delta$ Т-клеток, избегая эффектов «трансплантат против хозяина» из-за МНС-несоответствия. Аллогенная  $\gamma\delta$ Т-клеточная иммунотерапия уже была успешно использована для лечения агрессивных гематологических опухолей [2]. Эта стратегия может быть особенно полезна для лечения опухолей с низкой мутационной нагрузкой, когда ограничен выбор мишеней для ингибирования или вообще не удастся четко определить мишень [65].

#### ***Тканево-резидентные Т-клетки памяти ( $T_{RM}$ )***

Важную роль в контроле солидных опухолей могут играть клетки памяти  $T_{RM}$ . Это недавно обнаруженная линия Т-клеток, специализирующихся на жизни и функционировании в тканях [5, 86]. Оказалось, что инфильтрация солидных опухолей  $T_{RM}$  является благоприятным прогностическим признаком [8]. Поэтому усилия по стимуляции Т-клеточного иммунитета в ТМЕ стали направлять на повышение числа специфических к опухолевым антигенам  $T_{RM}$  и на защиту их от функционального истощения [20].

Специализированные  $T_{RM}$  (они могут быть  $CD4^+$  или  $CD8^+$ ) адаптируются к среде обитания и затем остаются для постоянного пребывания в ТМЕ [20, 31, 37]. Сольидные опухоли, большинство из которых эпителиального происхождения, часто оказываются заметно обогащенными клетками  $T_{RM}$ , которые отличаются экспрессией интегрина CD103 ( $\alpha E\beta 7$ ), а также VLA-1 (CD49a) и CD69 [22, 25]. Эпителий опухоли в отличие от стромы характеризуется наиболее значительным обогащением  $CD8^+CD103^+T_{RM}$ . Инфильтрация эпителия опухоли  $T_{RM}$  коррелирует с более высокой общей выживаемостью больных РМЖ [75], РЛ [76], аденокарциномой эндометрия [83], раком шейки матки [35], а также раком мочевого пузыря [74]. Клетки  $T_{RM}$  (особенно  $CD49a^+$ ) могут быть мощными киллерами для клеток опухоли [47], а  $CD8^+T_{RM}$  также секретируют  $IFN\gamma$  — цитокин, ассоциированный с благоприятным прогнозом для пациентов с раком [53]. Это связано с тем, что  $IFN\gamma$  может подавлять непосредственно деление опухолевых клеток и даже блокировать их устойчивость к химиотерапии, повышая активацию других иммунных клеток [75].

Если сравнивать опухоли с одинаковой степенью инфильтрации Т-клетками, то наилучший прогноз имеют пациенты, у которых в ТМЕ отмечается наиболее высокая доля  $CD103^+T_{RM}$ . Вакцины, в которых используют  $T_{RM}$ , дают более эффективный противоопухолевый иммунитет, чем вакцины, которые вызывают системный иммунитет.

Таким образом,  $T_{RM}$  являются специализированными защитниками ткани, и их наличие в ТМЕ связывают с усилением противоопухолевого иммунитета, что позволяет некоторым авторам считать эти клетки одними из наиболее важных участников борьбы с солидными опухолями изнутри [5].

#### ***Регуляторные Т-клетки (Tregs)***

Эти клетки выполняют важную функцию обеспечения толерантности к собственным антигенам, предотвращая аутоиммунитет. В сущности, являясь супрессорами, Tregs могут подавлять активацию, пролиферацию и эффекторные функции широкого круга иммунокомпетентных клеток, включая  $CD4^+$  и  $CD8^+$ Т-клетки, а также НК-, NKT- и другие клетки. Поэтому и в ТМЕ Tregs подавляют эффективный иммунитет против опухоли. У онкологических больных наблюдается большое количество инфильтрирующих опухоль  $FoxP3^+$ Treg и низкое соотношение  $CD8^+$ Т-клеток к Treg-клеткам в опухолевых тканях, что ассоциируется, как правило, с неблагоприятным прогнозом для больного [70, 71]. Существует несколько механизмов иммунной супрессии, кото-

рые реализуются с активным участием Tregs: ингибирование костимуляторных сигналов CD80 и CD86, значительное потребление интерлейкина IL-2, секреция ингибиторных цитокинов, метаболическая модуляция триптофана и аденозина и прямое уничтожение эффекторных Т-клеток. Tregs привлекаются в ТМЕ градиентами хемокинов, такими как CCR4-CCL17/CCL22, CCR8-CCL1, CCR10-CCL28 и CXCR3-CXCL9/CXCL10/CXCL11 [51]. Попытки удаления Tregs с использованием моноклональных антител к молекулам иммунной супрессии (таким как PD-1, PD-L1), рецепторам хемокинов, которые в значительной степени экспрессируются Tregs, по большей части не приводят к избирательному истощению или ингибированию Tregs [71]. Основным препятствием является отсутствие специфической мишени для истощения и функционального разрушения опухоль-инфильтрирующих Tregs. Следует учитывать, что системное истощение Tregs может увеличить риск аутоиммунизации пациента, поэтому необходимо разрабатывать стратегии, которые могут селективно разрушать клетки Tregs в ТМЕ. Биология Tregs-клеток сложная, но решение этих вопросов может привести к новым высокоточным методам иммунотерапии.

#### **Клетки-супрессоры в ТМЕ**

В недавних исследованиях было показано, что, кроме Treg, ТМЕ наполнено и другими иммуносупрессивными клетками, такими как опухоль-ассоциированные макрофаги, плазмацитоидные дендритные клетки, мезенхимальные стволовые клетки.

#### **Опухоль-ассоциированные макрофаги (TAMs – Tumor associated macrophages)**

Макрофаги, которые накапливаются в ТМЕ, связаны с ростом, ангиогенезом и метастазированием при различных видах рака через поляризацию TAM M1- на альтернативный M2-фенотип [28, 29]. Макрофаги с фенотипом M1 способны продуцировать значительное количество провоспалительных цитокинов, тогда как фенотипы M2, продуцируя несколько факторов роста, участвуют в ремоделировании тканей. Увеличение числа M2-клеток в ТМЕ ассоциируется с ухудшением прогноза. TAMs секретируют ингибиторные цитокины IL-10 и TGF- $\beta$ , подавляют пролиферацию лимфоцитов в ТМЕ, а также приводят к конверсии Т-клеток в регуляторные Tregs. Опухолевые клетки, продуцируя VEGF, CCL2, M-CSF и ангиопоэтин 2, способствуют миграции моноцитов из кровотока в ТМЕ, где затем они дифференцируются в TAMs. Сверхэкспрессия CCL2 клетками фиброкарциномы приводит к рекрутированию TAMs и помогает онкогенезу [16]. Наиболее хорошо изучены TAMs в ТМЕ при воспалительном типе РМЖ (IBC) [41].

Установлено, что TAMs в ТМЕ пациентов с IBC характеризуются выраженной экспрессией маркеров CD68 и CD163 [32]; также они участвуют в ремоделировании опухолевого внеклеточного матрикса и оказывают поддержку сосудистой проходимости, тем самым способствуя развитию опухоли и инвазии [69]. Клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что опухолевые ткани с высокой инфильтрацией TAMs ассоциируются с неблагоприятным прогнозом для пациента и резистентностью к терапии, поэтому нацеливание на истощение TAMs в опухолях считается перспективной стратегией иммунотерапии [29]. Таким образом, в настоящее время в основном обсуждаются вопросы о факторах, ответственных за хоминг макрофагов в опухолях, механизмах преобразования TAMs M1 в M2, а также возможных способах активного воздействия на функции M2 TAMs [41, 45].

#### **Плазмацитоидные дендритные клетки pDCs (plasmacytoid-DCs)**

Дендритные клетки (DCs) – самые эффективные антигенпрезентирующие клетки, включают две подгруппы: плазмацитоидные и миелоидные DCs (mDCs). DCs распознают антигены и вызывают цитокинами опосредованную Т-клеточную активацию и созревание. Однако, в ТМЕ pDC, продуцируя индоламин – 2,3-диоксигеназу (IDO), индуцируют Tregs и в конечном счете подавляют иммунный ответ [41]. Популяция таких pDC в ТМЕ мышей с раком предстательной железы экспрессировала низкие уровни костимулирующих лигандов CD80, CD86, CD40 и высокие уровни ингибирующих лигандов PD-1 и IDO, активно индуцируя истощение CTLs. Есть данные о пониженных количествах mDCs в периферической крови пациентов с локально развивающимся РМЖ, IBC и метастатическим IBC [46]. При этом пациенты с IBC, у которых было более высокое содержание TLR-активированных mDCs, секретирующих провоспалительный фактор некроза опухоли (TNF), имели более благоприятный прогноз, чем больные с более низким числом mDCs. А экспрессия хемокинового рецептора CCR7 и корецептора стимуляции CD86 на TLR-активированных DCs была ассоциирована с неблагоприятными исходами болезни.

#### **Мезенхимальные стволовые клетки MSCs (Mesenchymal stem cells)**

MSCs являются важным компонентом ТМЕ, так как способны подавлять функции различных иммунных эффекторных клеток, а также способствовать активности регуляторных иммунных клеток. MSCs (иногда упоминаются как мезенхимальные стромальные клетки, указывая на их происхождение) играют решающую роль в прогрессировании опухоли. С одной

стороны, они обеспечивают основу для закрепления опухолевых клеток в форме опухолевой стромы (anchoring) и секретируют факторы, способствующие росту опухоли [59]. С другой стороны, MSCs, представленные в TME, могут дифференцироваться под влиянием цитокинов и хемокинов в макрофаги 2 типа (M2) и в миелоид-зависимые супрессорные клетки (MDSC). Рекрутирование MSCs к опухоли и их перепрограммирование приводят к драматическим изменениям фенотипа и функций MSCs. Эти клетки превращаются в производителей множества факторов, способствующих прогрессии опухоли [80] и, следовательно, имеют потенциал для проявления широкого круга разнообразных взаимодействий с разными типами клеток в TME, обеспечивая поддержку роста опухоли.

#### **Экзосомы опухолевых клеток**

Опухолевые клетки являются активными производителями экзосом (TEX — Tumor derived exosomes) — мелких везикул, которые повсеместно присутствуют в опухолевой среде и в жидкостях организма всех пациентов с опухолями [44]. Экзосомы рассматриваются в последнее время как новая универсальная и эффективная система коммуникаций и транспортировки нуклеиновых кислот и белков, работающая между клетками, вовлеченными в поддержание опухолевой прогрессии [23, 80]. Поэтому интерес к этим везикулам растет, и сейчас активно разрабатываются методы для выделения и характеристики экзосом, высвобождаемых не только опухолевыми клетками, но и другими, например Т-клетками. Если родительской клеткой является опухолевая, то часть экзосом в плазме пациента, вероятно, будет опухоль-зависимой и будет нести признаки опухолевой клетки. Поэтому такие экзосомы могут рассматриваться как потенциальный циркулирующий биомаркер опухоли. Соотношение TEX с нормальными клеточными экзосомами плазмы у разных больных варьирует, но, как правило, TEX представляет значительную долю от общего количества экзосом, выделенных из плазмы, особенно у пациентов с развивающейся малигнизацией [80]. Экзосомы заключены в белок-фосфолипидную мембрану со специфическим набором белков, липидов и гликанов. Поверхность TEX обогащена многочисленными биологически активными белками, а TEX, выделенные из плазмы пациентов с опухолями, обогащены иммуносупрессивными рецепторами-лигандами, включая PD-1/PD-L1, Fas/FasL, TRAIL/TRAILR [44]. TEX также обогащены молекулами адгезии, предположительно для облегчения их взаимодействия с реципиентной клеткой [36]. Просвет экзосомы заполнен разными клеточными белками, онкогенными ДНК (включая KRAS, HRAS,

BCR-ABL), онкогенными микроРНК (miR125b, 130b, 155) и mRNAs (BrR-ABL1), растворимыми факторами, включая цитокины и хемокины, ферменты и кофакторы [12]. Компоненты экзосомного груза являются биологически активными, и могут быть «адресованы» родительской клеткой в направлении определенного молекулярного контакта с реципиентной клеткой. Экзосомы способны через подходящие рецепторы на поверхности клетки или просто, встраиваясь в мембрану, доставлять свое содержимое реципиентной клетке, и это взаимодействие приводит к потере или усилению функции клетки-мишени. В последнее время особое внимание было сфокусировано на транспортировке экзосомами miRNAs в качестве основного механизма перепрограммирования реципиентной клетки, приводящего к фенотипическим и функциональным изменениям, так как результаты исследований указывают на высокий потенциал использования miRNAs в терапии [48].

Наиболее частой мишенью TEX являются MSCs, и именно экзосомы из этих перепрограммированных MSCs способны модулировать действия иммунных эффекторных клеток, включая Т- и В-лимфоциты, NK-клетки, моноциты/макрофаги и DCs [13, 84]. Содержимое таких экзосом указывает на то, что они предназначены для обеспечения иммунного ингибирования. Этот сложный груз может содержать более 850 уникальных генных продуктов и более 150 различных miRNAs [81]. Экзосомы содержат CD39 и CD73, эктонуклеотидазы, катализирующие продукцию аденозина, и множество других иммуносупрессорных факторов, включая индоламин-2,3-диоксигеназу, TGF- $\beta$ , IL-6, PGE2, PD-1, galectin-1 и HLA-G5 [4, 82]. В культурах мононуклеаров периферической крови с экзосомами из MSCs активация Т-клеток, как правило, подавлялась, а доля Tregs увеличивалась. При этом действие экзосом из MSCs на CD4<sup>+</sup>Т-клетки способствовало экспансии Th2-клеток, ограничивая пролиферацию Th1- и Th17-популяций. Наблюдаемые эффекты были связаны со сдвигом в цитокиновом профиле PBMC из провоспалительного IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  до противовоспалительного TGF- $\beta$ , что и указывает на то, что экзосомы из MSCs могут влиять на функциональную активность Т-клеток [21]. Экзосомы, полученные из MSCs, могут также активировать моноциты по TLR-сигнальному пути [18]. Когда моноциты стимулируются экзосомами из MSCs, они дифференцируются в макрофаги, которые секретируют IL-10, приводя к экспансии Treg. В TME эти противовоспалительные эффекты MSCs усиливаются, и воздействие экзосом из MSCs может стать основным механизмом, ответственным

ным за экспансию Tregs и MDSCs, способствуя поддержанию иммуносупрессии в ТМЕ. Примечательно, что паракринная активность ТЕХ не ограничивается опухолью, ТЕХ циркулируют и распространяются в тканях и клетках, удаленных от опухоли [81]. Может быть, с этим связано то, что экстраторакальные малигнизации, включая РМЖ, КРР, меланому, системно репрограммируют микроокружение в ткани легких для поддержания колонизации и роста рассеивающихся опухолевых клеток и для генерации вторичных опухолей [3].

#### Воспаление в ТМЕ

Воспаление может быть важным фактором, оказывающим влияние на иммунный профиль в ТМЕ. Многие опухоли возникают после длительного воспаления или проявляют характеристики хронического воспаления (часто вялотекущего) по мере прогрессирования [38]. Иммунные инфильтраты из разных опухолей человека, ассоциированных с воспалением, могут содержать ценную прогностическую информацию [78], которая может быть использована как существенная характеристика рака [11]. Например, макрофаги в ТМЕ в настоящее время предлагается рассматривать как прогностический маркер и как удобную терапевтическую мишень [45]. Кроме макрофагов, в ТМЕ присутствуют другие воспалительные клетки, включая нейтрофилы, эозинофилы и базофилы [24]. Как важный фактор воспаления при прогрессировании опухоли упоминается также комплемент (C5a и C3a) [1]. Замечено, что длительное лечение нестероидными противовоспалительными лекарствами является чрезвычайно эффективным в снижении заболеваемости раком и смертности. Один из лучших примеров опухоли, ассоциированной с хроническим воспалением, начиная с самых ранних стадий возникновения опухоли — это КРР. ТМЕ при КРР содержит воспалительные медиаторы, способные подавлять локальные DC [52]. Известно, что КРР чаще всего возникает спорадически (с нечеткой наследственной основой), он обычно сопровождается соматической мутацией гена, кодирующего компонент Wnt-сигнального пути, или иногда с наследственной мутацией, как у пациентов с синдромом Линча, или семейным аденоматозным полипозом (FAP). Значительно реже КРР возникает после длительного воспаления в кишечнике, например при болезни Крона или язвенном колите. Хотя наследственные случаи рака редко предшествуются открытым хроническим воспалением, оказывается, их можно предотвратить или отсрочить путем обработки противовоспалительными лекарствами [38], что позволяет предполагать все-таки вовлеченность воспалительных процессов в возникновение

опухоли. Воспалительные реакции часто связаны с микрофлорой кишечника, так как существенные изменения и нарушения в микробных популяциях могут повлиять на воспалительные реакции и способствовать развитию опухоли. Установлена связь между хронической обструктивной легочной болезнью и РЛ, воспалительными заболеваниями кишечника и КРР, воспалением желудка, индуцированным *Helicobacter pylori* и опухолями желудка, простатитом и раком простаты и т.п. [27]. Хроническое воспаление ассоциируется с увеличением в опухолях числа измененных генов, которые, возможно, специфичны для каждого отдельного типа воспаления. Эти изменения, как правило, приводят к аномалиям ацетилирования гистонов, которые, в свою очередь, связаны с активизацией медиаторов воспаления. Более того, окислительный стресс и медиаторы воспаления, возможно, через митоген-активированные протеинкиназные сигнальные пути, способствуют ацетилированию гистонов, приводя к поддержанию постоянного воспалительного процесса. Промотор ключевого, ассоциированного с воспалением фермента (15-липооксигеназа тип 1) появляется вместе с изменениями метилирования не только в опухолевых линиях клеток, но также в периферических моноцитах и Т-лимфоцитах крови. Следовательно, разумно ожидать «распространения метилирования» на гены и иммунных клеток. Несмотря на большие усилия понять биологию воспалительного варианта РМЖ, изучение ТМЕ, геномные исследования не привели к открытию точных биологических механизмов при ИВС, которые могли бы привести к успешным терапевтическим стратегиям. Поэтому ИВС остается хотя и редким (2-4% всех РМЖ), но агрессивным заболеванием, ответственным за смертность 7-10% больных. Однако появились некоторые сдвиги в изучении ТМЕ как важного участника агрессивной природы ИВС, воспалительных путей, включая уникальный состав и сочетание различных типов иммунных клеток в ТМЕ при ИВС [41, 42].

Изучение воспалительных медиаторов внутри ТМЕ позволило выделить два общих механизма, которые могут поддерживать воспаление при развитии опухоли [55]. Первый механизм заключается в том, что воздействие канцерогеном или активация онкогенов может активировать внутриклеточные сигнальные пути, приводящие к продукции разнообразных провоспалительных хемокинов и цитокинов в клетках-предшественниках опухоли. Например, в случае с опухолью легкого Kras-активация в легочных бронхоальвеолярных эпителиальных клетках стимулирует экспрессию KC и MIP2, которые являются ли-

гандами для хемокинового рецептора CXCR2. Продукция KC и MIP2 функционально ответственна за активное привлечение воспалительных нейтрофильных клеток к месту начального возникновения опухоли. Аналогично онкогенная мутация EGER в эпителиальных клетках легкого индуцирует высокие количества CCL2, CCL5, IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , которые могут потенциально рекрутировать и активировать моноциты и макрофаги. Второй механизм связывают с тем, что рост опухолевых клеток может вызвать деструкцию окружающего внеклеточного матрикса и гибель соседних клеток, так же как и самих опухолевых клеток. Все эти тканевые повреждения будут вызывать воспалительный ответ, секрецию хемокинов и экспрессию хемокиновых рецепторов и рекрутирование миелоидных воспалительных клеток. Например, изучение опухоли яичника показало, что Tregs направляются к опухолевой массе и асцитам через хемокин CCR4 в ответ на CCL22-секрецию опухолевыми клетками и опухоль-инфильтрирующими TAMs [51]. Однако, скорее всего, CCR4 — это не единственный хемокиновый рецептор, управляющий трафиком Т-клеток в различных типах опухолей.

#### **Генетические aberrации опухолей и иммунный профиль в ТМЕ**

Изучение механизмов, посредством которых формируется иммунная среда в ТМЕ, указывает на важную детерминирующую роль генетических aberrаций опухолевых клеток. Благодаря высокой генетической нестабильности опухолевых клеток развивается их способность последовательно формировать иммунорезистентные фенотипы с последующей селекцией наиболее резистентных клонов. Генетическая нестабильность опухолевых клеток позволяет индуцировать изменения, приводящие к обходу иммунных эффекторных механизмов. Только в результате хромосомной нестабильности могут быть изменены до 25-50% аллелей опухолевой клетки, и мишенями таких разрушений и потерь могут быть гены, которые кодируют различные опухолевые АГ, а также медиаторы процессинга и презентации этих АГ Т-клеткам хозяина.

Высказана гипотеза о том, что более высокая мутационная нагрузка опухоли неизбежно приводит к более «чужой» пептидной презентации АГ и, следовательно, более высокой иммуногенности опухоли и в потенциале к более сильному адаптивному иммунитету [62]. Мутации и другие геномные реаранжировки в опухолевых клетках могут вызвать появление неоантигенов, экспрессированных исключительно данной опухолью, а презентируемые МНС молекулами, они потенциально могут быть распознаны эндогенным Т-клеточным репертуаром [65]. И действительно,

но, «неоантиген-специфические» Т-клетки появлялись у пациентов при меланоме [43] и опухолях с относительно высоким мутационным бременем, таких как немелкоклеточный рак легких (NSCLC) [60]. Опухоли с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI) показывали увеличение количества опухоль-специфических Т-клеток и лучше отвечали на иммунотерапию по сравнению с опухолями с более низким мутационным грузом [40, 72]. Изучение опухолей щитовидной железы показало, что BRAF-мутированные опухоли характеризуются инфильтрацией иммуносупрессивными клетками, в то время как RAS-мутированный подтип отличался более активным притоком Т-клеток и снижением экспрессии молекул МНС, несмотря на сопоставимую мутационную нагрузку [17]. А терапия анти-CTLA-4 антителами у пациентов с меланомой показала, что мутации в онкогенах, таких как KRAS, ATM и mTOR, коррелируют с хорошим ответом на такую иммунотерапию только для некоторых типов опухолей [50]. Таким образом, эти наблюдения свидетельствуют о том, что мутационная нагрузка, подтип опухоли и aberrантная экспрессия онкогенов и TSG сильно влияют на иммунное микроокружение опухоли. Тем не менее есть значительное число пациентов с хорошим иммунным ответом при низком мутационном грузе и наоборот [7, 17, 42]. Известно, что даже одиночные мутации и изменения в генах-супрессорах опухолей (TSG) могут быть ассоциированы с определенным иммунным наполнением опухоли. Например, при глиобластомах мутация в гене NF1 связана с увеличением количества макрофагов в ТМЕ и снижением числа моноцитов [77], а мутации супрессора опухоли TP53 в ER-негативных РМЖ связаны со снижением экспрессии маркеров цитотоксических Т-клеток в ТМЕ и плохой выживаемостью [56]. Следует учитывать, что мутационный груз не является величиной статичной и по мере развития опухоли может значительно изменяться и качественно, и количественно, имея на каждом этапе свои индивидуальные черты. Таким образом, генетические aberrации в опухолевых клетках могут стать доминирующей движущей силой в формировании иммунного профиля и ответа на иммунотерапию, придавая в каждом отдельном случае индивидуальные черты.

Иммунологическое микроокружение опухоли изменяется экстремально динамично не только на уровне фенотипа. Стало известно, что множество генов в самих иммунных клетках из ТМЕ часто находят гиперметилированными, и лимфоциты могут быть затронуты эпигенетическими изменениями генов, связанных с клеточным циклом, p53, ДНК-репарациями. Возможно, что

именно эпигенетические события являются источником наиболее сильных изменений, так как частота, с которой новые эпиааллели появляются, может достигать 100% на локус, в то время как скорость мутации ДНК намного ниже [27]. У больных РЛ среди периферических лимфоцитов обнаруживаются клетки с аномальным метилированием генов, ассоциированных с опухолью, например с p53. В ТМЕ экспериментальных животных часто наблюдается зависимость от метилирования редукция Fas-экспрессии в CTLs, специфичных к опухолевым АГ. Распространение метилирования, как выяснилось, является не единичным дискретным событием, а представляет собой серию событий, напоминающую цепную реакцию, которая приводит к падению транскрипционного потенциала или же к полному прекращению транскрипции, что наблюдается при молчании генов. Механизмы такого распространения остаются неизвестными, но могут быть связаны с тем, что частично метилированный ДНК представляет собой субстрат для ДНК-метилтрансферазы 1, и поэтому процесс метилирования не прекращается, обеспечивая, таким образом, поддержание состояния непрерывного метилирования генома. Вероятно, что и гены иммунных клеток, участвующих в формировании иммунного профиля в ТМЕ, таким же образом подвергаются эпигенетическим изменениям. Можно полагать, что особенности мутационной нагрузки опухоли играют важную роль в создании специфического, характерного только для данной опухоли иммунного профиля в ТМЕ, индуцируя фенотипические, функциональные и эпигенетические изменения в клетках иммунной системы и поддерживая состояние непрерывного метилирования генома.

На основе молекулярного и генетического анализа в пределах данного типа опухоли можно сформировать отдельные подтипы, которые отличаются особенностями прогрессирования и режимом лечения. При опухолях РМЖ, например, CD8<sup>+</sup>Т-клетки в повышенных количествах обнаруживаются в тройных негативных опухолях (triple-negative ER/PR/HER2<sup>-</sup>), и эти пациенты с внутриопухолевым высоким изобилием Т-клеток характеризуются лучшей выживаемостью [64, 68]. Опухоли РМЖ, которые экспрессируют гормональные рецепторы или HER2, более часто инфильтрируются FoxP3<sup>+</sup>Tregs по сравнению с другими Т-клетками, что позволяет прогнозировать установление этими лимфоцитами-супрессорами иммунодепрессивной обстановки в ТМЕ [33]. Соответственно, присутствие Tregs в таких случаях РМЖ может указывать на дальнейшее метастазирование и плохую выживаемость. Для других типов рака, таких как КРР,

глиобластома и рак головы и шеи, также наблюдались подобные субтипоспецифические для опухоли иммунные инфильтраты с отличающимися иммунными пейзажами [9, 77].

При аденокарциноме поджелудочной железы (PDAC) снижение экспрессии генов, связанных с цитотоксической функцией Т-клеток и молекулами иммунного контроля, сопровождалось усилением экспрессии MYC, NOTCH2 и FGFR1, но не мутационной нагрузки [7]. У пациентов с аденокарциномой легкого накопление p53 в опухолевых клетках коррелировало с увеличением экспрессии PD-L1, в то время как мутантные по EGFR опухоли характеризовались низкой экспрессией PD-L1 [14]. При метастатической нейробластоме усиление MYCN коррелировало с низкой экспрессией PD-L1 и сниженной экспрессией знаковых генов Т-клеток в ТМЕ по сравнению с MYCN-нормальными опухолями [39].

Таким образом, развивающаяся опухоль создает вокруг себя микросреду, в которой перепрограммируются окружающие клетки и формируется иммунный профиль (cancer immunoediting) [27], позволяющий опухолевым клеткам стать резистентными к иммунному ответу. И выработка этого механизма избегания опухолью иммунной реакции представляет собой окончательный результат взаимного противостояния между трансформирующимися клетками и иммунной системой.

## Заключение

В последнее десятилетие признается важнейшая роль ТМЕ в инициации и прогрессировании опухоли. Опухоль перепрограммирует свое микроокружение таким образом, что ТМЕ способствует как развитию первичных опухолей, так и их метастазированию. Под влиянием опухоли значительным изменениям, «редактированию», подвергается иммунный профиль в ТМЕ. Основные эффекторы иммунитета — Т-клетки — находятся в подавленном состоянии, активируются супрессорные клетки (Tregs, TAMs, pDCs, MSCs, MDSCs). Если опухоль ассоциирована с воспалением, то воспалительные факторы могут влиять на иммунный фенотип опухолевых инфильтратов, изменять функции Т-лимфоцитов, воспалительные медиаторы оказывают влияние на рекрутирование иммунных клеток в ТМЕ. Специфика генетического груза опухоли (набор мутаций, эпигенетических изменений) во многом определяет уникальность иммунного профиля опухоли в ТМЕ, придавая свои индивидуальные особенности и черты, которые могут быть связаны с разными исходами болезни. Для обеспечения иммунного перепрофилирования опухолевые клетки продуцируют экзосомы, которые являют-

ся переносчиками огромного количества белков, нуклеиновых кислот, с помощью которых перепрограммируются другие клетки в ТМЕ и модулируются функции иммунных клеток. Экзосомальные miRNAs рассматриваются в качестве основного средства модификации реципиентных клеток и поэтому имеют большой потенциал для использования в терапии рака. Таким образом, зависимые от опухоли генетические, мо-

лекулярные, метаболические факторы индуцируют формирование иммунодепрессивной сети в ТМЕ; клеточный иммунитет сильно подавляется, что способствует развитию опухоли и метастазированию. Поэтому при разработке методов иммунотерапии рака повышенное внимание и интерес в настоящее время смещаются к тому, чтобы лучше понимать и контролировать процессы, влияющие на иммунный профиль в ТМЕ.

## Список литературы / References

1. Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. *J. Clin. Invest.*, 2017, Vol. 127, no. 3, pp. 780-789.
2. Airolid I., Bertaina A., Prigione I., Zorzoli A., Pagliara D., Cocco C., Meazza R., Loiacono F., Lucarelli B., Bernardo M.E., Barbarito G., Pende D., Moretta A., Pistoia V., Moretta L., Locatelli F.  $\gamma\delta$  T cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR- $\alpha\beta^+$ /CD19 $^+$  lymphocytes. *Blood*, 2015, Vol. 125, no. 15, pp. 2349-2358.
3. Altorki N.K., Markowitz G.J., Gao D., Port J.L., Saxena A., Stiles B., McGraw T., Mittal V. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 2019, Vol. 19, no. 1, pp. 9-31.
4. Amarnath S., Foley J.E., Farthing D.E., Gress R.E., Laurence A., Eckhaus M.A., Metais J.Y., Rose J.J., Hakim F.T., Felizardo T.C., Cheng A.V., Robey P.G., Stroncek D.E., Sabatino M., Battiwalla M., Ito S., Fowler D.H., Barrett A.J. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells harness purinergic signaling to tolerize human Th1 cells *in vivo*. *Stem Cells*, 2015, Vol. 33, no. 4, pp. 1200-1212.
5. Amsen D., Klaas P.J.M., van Gisbergen P.H., Rene A.W., van Lier A. Tissue-resident memory T cells at the center of immunity to solid tumors. *Nat. Immunol.*, 2018, Vol. 19, no. 6, pp. 538-546.
6. Andrews L.P., Yano H., Dario A.A., Vignali D.A. A. Inhibitory receptors and ligands beyond PD-1, PD-L1 and CTLA-4: breakthroughs or backups. *Nat. Immunol.*, 2019, Vol. 20, no. 11, pp. 1425-1434.
7. Balli D., Rech A.J., Stanger, B.Z., Vonderheide R.H. Immune cytolytic activity stratifies molecular subsets of human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2017, Vol. 23, no. 12, pp. 3129-3138.
8. Becht E., Giraldo N.A., Dieu-Nosjean M.C., Sautès-Fridman C., Fridman W.H. Cancer immune contexture and immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.*, 2016, Vol. 39, pp. 7-13.
9. Becht E., de Reyniès A., Giraldo N.A., Pilati C., Buttard B., Lacroix L., Selves J., Sautès-Fridman C., Laurent-Puig P., Fridman W.H. Immune and stromal classification of colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 2016, Vol. 22, pp. 4057-4066.
10. Bertucci F., Finetti P., Colpaert C., Mamessier E., Parizel M., Dirix L., Viens P., Birnbaum D., van Laere S. PDL1 expression in inflammatory breast cancer is frequent and predicts for the pathological response to chemotherapy. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, no. 15, pp. 13506-13519.
11. Bottazzia B., Riboli E., Mantovani A. Aging, inflammation and cancer. *Sem. Immunol.*, 2018, Vol. 40, pp. 74-82.
12. Boyiadzis M., Whiteside T.L. The emerging roles of tumor-derived exosomes in hematological malignancies. *Leukemia*, 2017, Vol. 6, pp. 1259-1268.
13. Burrello J., Monticone S., Gai C., Gomez Y., Kholia S., Camussi G. Stem cell-derived extracellular vesicles and immune-modulation. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2016, Vol. 4, 83. doi: 10.3389/fcell.2016.00083.
14. Cha Y.J., Kim H.R., Lee C.Y., Cho B.C., Shim H.S. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand-1 expression in lung adenocarcinoma and its relationship with p53 status. *Lung Cancer*, 2016, Vol. 97, pp. 73-80.
15. Chang C.H., Curtis J.D., Maggi L.B., Faubert B., Villarino A.V., O'Sullivan D.O., Huang S.C., van der Windt G.J., Blagih J., Qiu J., Weber J.D., Pearce E.J., Jones R.G., Pearce E.L. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*, 2013, Vol. 153, no. 6, pp. 1239-1251.
16. Chang C.H., Qiu J., O'Sullivan D., Buck M.D., Noguchi T., Curtis J.D., Chen Q. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. *Cell*, 2015, Vol. 162, no. 6, pp. 1229-1241.
17. Charoentong P., Finotello F., Angelov M., Mayer C., Efremova M., Rieder D., Hackl H., Trajanoski Z. Pan-cancer immunogenomic analyses. Reveal genotype-immunophenotype relationships and predictors of response to checkpoint blockade. *Cell Rep.*, 2017, Vol. 18, no. 1, pp. 248-262.
18. Chen W., Huang Y., Han J., Yu L., Li Y., Lu Z., Li H., Liu Z., Shi C., Duan F., Xiao Y. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. *Immunol. Res.*, 2016, Vol. 64, no. 4, pp. 831-840.
19. Chen D.S., Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 2017, Vol. 541, no. 7637, pp. 321-330.

20. Dadi S., Li M. O. Tissue-resident lymphocytes: sentinel of the transformed tissue. *J. Immunother. Cancer*, 2017, Vol. 5, 41. doi: 10.1186/s-017-0244-3.
21. di Trapani M., Bassi G., Midolo M., Gatti A., Kamga P.T., Cassaro A., Carusone R., Adamo A., Krampera M. Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 24120. doi: 10.1038/srep24120.
22. Djenidi F.J., Goubar A., Durgeau A., Meurice G., de Montpréville V., Validire P., Besse B., Mami-Chouaib M. CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 7, pp. 3475-3486.
23. Dostert G., Mesure B., Menu P., Velot E. How do mesenchymal stem cells influence or are influenced by microenvironment through extracellular vesicles communication? *Front. Cell Dev. Biol.*, 2017, Vol. 5, 6. doi: 10.3389/fcell.2017.00006.
24. Galdiero M.R., Varricchi G., Loffredo S., Mantovani A., Marone G. Roles of neutrophils in cancer growth and progression. *J. Leukoc. Biol.*, 2018, Vol. 103, no. 3, pp. 457-464.
25. Ganesan A.P., Clarke J., Wood G., Garrida-Martes E.M., Che S.J., Mellows T. Tissue-resident memory features are linked to the magnitude of cytotoxic T cell responses in human lung cancer. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 8, pp. 940-950.
26. Gentles A.J., Newman A.M., Liu C.L., Bratman S.V., Feng W., Kim D., Nair V. S., Xu Y., Khuong A., Hoang C.D. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 8, pp. 938-945.
27. Germainis A.E., Karanikas V. Immunoepigenetics: the unseen side of cancer immunoediting. *Immunol. Cell Biol.*, 2007, Vol. 85, no. 1, pp. 55-59.
28. Gholami M.D., Alikardar G., Saeedi Y., Heydari S., Garssen J., Falak R. Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: significance and effective mechanisms. *Cell. Immunol.*, 2017, Vol. 322, pp. 1-14.
29. Goswami K.K., Ghosh T., Ghosh S., Sarkar M., Bose A., Baral R. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. *Cell. Immunol.*, 2017, Vol. 316, no. 6, pp. 1-10.
30. Hensley C.T., Wasti A.T., de Berardinis R.J. Gutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 9, pp. 3678-3684.
31. Hombrink P., Helbig C., Backer R.A., Piet B., Oja A.E., Stark R., Brasser G., Jongejan A., Jonkers R.E., Nota B., Basak O., Clevers H.C., Moerland P.D., Amsen D., van Lier R.A. Programs for the persistence, vigilance and control of human CD8<sup>+</sup> lung-resident memory T cells. *Nat. Immun.*, 2016, Vol. 17, no. 12, pp. 1467-1478.
32. Jhaveri K., Teplinsky E., Silvera D., Valeta-Magara A., Arju R., Giashudin Sh., Sarfraz Y. Hyperactivated mTOR and JAK2/STAT3 pathways: molecular drivers and potential therapeutic targets of inflammatory and invasive ductal breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *Clin. Breast Cancer*, 2016, Vol. 16, no. 2, pp. 113-122.
33. Jiang D., Gao Z., Cai Z., Wang M., He J. Clinicopathological and prognostic significance of FOXP3<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*, 2015, Vol. 15, 727. doi: 10.1186/s12885-015-1742-7.
34. Jiang Y., Li Y., Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis.*, 2015, Vol. 6, e1792. doi: 10.1038/cddis.2015.162.
35. Komdeur F.L., Prins T.M., van de Wall S., Plat A., Wisman G.B.A., Hollema H., Daemen T., Church D.N., de Bruyn M., Nijman H.W. CD103<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes are tumorreactive intraepithelial CD8<sup>+</sup> T cells associated with prognostic benefit and therapy response in cervical cancer. *OncoImmunology*, 2017, Vol. 6, no. 9, e1338230. doi:10.1080/2162402X.2017.1338230.
36. Kumar B., Garcia M., Murakami J.L., Chen C.C. Exosome-mediated microenvironment dysregulation in leukemia. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1863, no. 3, pp. 464-470.
37. Kumar B. V., Ma W., Miron M., Granot T., Guyer R., Carpenter D., Senda T., Sun X. Human tissue-resident memory T cells are defined by core transcriptional and functional signatures in lymphoid and mucosal sites. *Cell Rep.*, 2017, Vol. 12, pp. 2921-2934.
38. Lasry A., Zingler A., Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlines colorectal cancer. *Nat. Immunol.*, 2016, Vol. 17, no. 3, pp. 230-240.
39. Layer J.P., Kronmüller M.T., Quast T., van den Boorn-Konijnenberg D., Efferen M., Hinze D., Althoff K., Schramm A., Westerman F., Peifer M. Amplification of N-Myc is associated with a T-cell-poor microenvironment in metastatic neuroblastoma restraining interferon pathway activity and chemokine expression. *OncoImmunology*, 2017, Vol. 6, no. 6, e1320626. doi: 10.1080/2162402X.2017.1320626.
40. Le D.T., Uram J.N., Wang H., Bartlett B.R., Kemberling H., Eyring A.D., Skora A.D., Lubner B.S., Azad N.S., Laheru D. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N. Engl. J. Med.*, 2015, Vol. 372, no. 26, pp. 2509-2520.
41. Lim B., Wendy A.W., Xiaoping W., James M.R., Naoto T.U. Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. *Nat. Rev. Cancer*, 2018, Vol. 18, no. 8, pp. 485-499.
42. Lim W.A., June C.H. The principles of engineering immune cells to treat cancer. *Cell*, 2017, Vol. 168, no. 4, pp. 724-740.
43. Linnemann C., van Buuren M.M., Bies L., Verdegaal E.M., Schotte R., Calis J.J., Behjati S., Velds A., Hilkmann H., Atmioui D.E. Highthroughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4<sup>+</sup> T cells in human melanoma. *Nat. Med.*, 2015, Vol. 21, no. 1, pp. 81-85.

44. Ludwig S., Floros T., Theodoraki M.N., Hong C.S., Jackson E.K., Lang S., Whiteside T.L. Suppression of lymphocyte functions by plasma exosomes correlates with disease activity in patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2017, Vol. 23, no. 16, pp. 4843-4854.
45. Mantovani A.F., Marchesi A., Malesci L., Laghi P.A. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2017, Vol. 14, no. 7, pp. 399-416.
46. Mego M., Gao H., Cohen E.N., Anfossi S., Giordano A., Tin S., Fouat T.M. Circulating tumor cells (CTCs) are associated with abnormalities in peripheral blood dendritic cells in patients with inflammatory breast cancer. *Oncotarget*, 2016, Vol. 8, no. 22, pp. 35656-35658.
47. Murray T., Marraco S.A.F., Baumgaertner P., Bordry N., Cagnon L., Donda A., Romero P., Verdeil G., Speiser D.E. Very late antigen-1 marks functional tumor-resident CD8 T cells and correlates with survival of melanoma patients. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, e573. doi: 10.3389/fimmu.2016.00573.
48. Neviani P., Fabbri M. Exosomal microRNAs in the tumor microenvironment. *Front. Med. (Lausanne)*, 2015, Vol. 2, e47. doi: 10.3389/fmed.2015.00047.
49. Nizard M., Roussel H., Diniz M.O., Karaki S., Tran T., Voron T., Dransart E., Sandoval F., Riquet M., Rance B., Marcheteau E., Fabre E., Mandavit M., Terme M., Blanc C., Escudie J.B., Gibault L., Barthes F.L.P., Granier C., Ferreira L.C.S., Badoual C., Johannes L., Tartour E. Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, e15221. doi: 10.1038/ncomms15221.
50. Ock C.Y., Hwang J.E., Keam B., Kim S.B., Shim J.J., Jang H.J., Park S., Sohn B.H., Cha M., Ajani J.A. Genomic landscape associated with potential response to anti-CTLA-4 treatment in cancers. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, no. 1, e1050. doi: 10.1038/s41467-017-01018-0.
51. Ohue Y., Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci.*, 2019, Vol. 110, pp. 2080-2089.
52. O'Toole A., Michielsen A.J., Nolan B., Tosetto M., Sheahan E., Mulcahy H.E., Winter D.C., Hyland J.M., O'Connell P.R., Fennelly D., O'Donoghue D.O., O'Sullivan J., Doherty G.A., Ryan E.J. Tumour microenvironment of both early- and late-stage colorectal cancer is equally immunosuppressive. *Br. J. Cancer*, 2014, Vol. 111, pp. 927-932.
53. Parker B.S., Rautela J., Hertzog P.J. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2016, Vol. 16, no. 3, pp. 131-144.
54. Pauken E., Wherry E.J. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 38, no. 4, pp. 265-276.
55. Qin F.X. Dynamic behavior and function of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in tumor bearing host. *Cell. Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 6, no. 1, pp. 3-13.
56. Quigley D., Silwal-Pandit L., Dannenfelser R., Langerød A., Vollen H.K., Vaske C., Siegel J.U., Troyanskaya O., Chin S.F., Caldas C. Lymphocyte invasion in IC10/basal-like breast tumors is associated with wild-type TP53. *Mol. Cancer Res.*, 2015, Vol. 13, no. 3, pp. 493-501.
57. Reiser J., Banerjee A. Effector, memory, and dysfunctional CD8(+) T cell fates in the antitumor immune response. *J. Immunol.*, 2016, no. 2016, 8941260. doi: 10.1155/2016/8941260.
58. Ribas A., Wolchok J.D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 2018, Vol. 359, no. 6382, pp. 1350-1355.
59. Ridge S.M., Sullivan F.J., Glynn S.A. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol. Cancer*, 2017, Vol. 16, no. 1, 31. doi: 10.1186/s12943-017-0597-8.
60. Rizvi N.A., Hellmann M.D., Snyder A., Kvistborg P., Makarov V., Havel J.J., Lee W., Yuan J., Wong P., Ho T.S. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 2015, Vol. 348, no. 6230, pp. 124-128.
61. Robinson D.R., Wu Y.M., Lonigro R.J., Vats P., Cobain E., Everett J., Cao X., Rabban E., Kumar-Sinha C., Raymond V. Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature*, 2017, Vol. 548, no. 7667, pp. 297-303.
62. Rooney M.S., Shukla S.A., Wu C.J., Getz G., Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*, 2015, Vol. 160, no. 1-2, pp. 48-61.
63. Salmon H., Remark R., Gnjatich S., Merad M. Host tissue determinants of tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer*, 2019, Vol. 19, no. 4, pp. 215-227.
64. Savas P., Salgado R., Denkert C., Sotiriou C., Darcy P.K., Smyth M.J., Loi S. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2016, Vol. 13, pp. 228-241.
65. Schumacher T.N., Schreiber R.D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*, 2015, Vol. 348, no. 6230, pp. 69-74.
66. Silva-Santos B., Serre K., Norell H.  $\gamma\delta$  T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 11, pp. 683-691.
67. Silva-Santos B., Mensurado S., Coffelt S.  $\gamma\delta$  T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2019, Vol. 19, no. 7, pp. 392-404.
68. Stanton S.E., Adams S., Disis M.L. Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. *JAMA Oncol.*, 2016, Vol. 2, no. 10, pp. 1354-1360.
69. Su Sh., Liu Q., Chen J., Chen J., Xiao F., He Ch., Huang D., Wu W., Lin L., Huang W., Cui X. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell*, 2014, Vol. 25, pp. 605-620.
70. Tanaka A., Sakaguchi Sh. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res.*, 2017, Vol. 27, no. 1, pp. 109-118.

71. Tanaka A., Sakaguchi Sh. Targeting Treg cells in cancer immunotherapy. *Eur. J. Immunol.*, 2019, Vol. 49, pp. 1140-1146.
72. van Allen E.M., Miao D., Schilling B., Shukla S.A., Blank C., Zimmer L., Sucker A., Hillen U., Foppen M.H.G., Goldinger S.M. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*, 2015, Vol. 350, no. 6257, pp. 207-211.
73. Vermijlen D., Gatti D., Kouzeli A., Rus T., Eberl M.  $\gamma\delta$  T cell responses: how many ligands will it take till we know? *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2018, Vol. 84, pp. 75-86.
74. Wang B., Wu S., Zeng H., Liu Z., Dong W., He W., Chen X., Dong X., Zheng L., Lin T., Huang J. CD103<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes predict a favorable prognosis in urothelial cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 2015, Vol. 194, no. 2, pp. 556-562.
75. Wang W., Kryczek I., Dostál L., Lin H., Tan L., Zhao L., Lu F., Wei S., Maj T., Peng D., He G., Vatan L., Szeliga W., Kuick R., Kotarski J., Tarkowski R., Dou Y., Rattan R., Munkarah A., Liu J.R., Zou W. Effector T cells abrogate stroma-mediated chemoresistance in ovarian cancer. *Cell*, 2016, Vol. 165, no. 5, pp. 1092-1105.
76. Wang Z.Q., Milne K., Derocher H., Webb J.R., Nelson B.H., Watson P.H. CD103 and intratumoral immune response in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2016, Vol. 22, no. 24, pp. 6290-6297.
77. Wang Q., Hu B., Hu X., Kim H., Squatrito M., Scarpaccia L., deCarvalho A.C., Lyu S., Li P., Li Y. et al. Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer Cell*, 2017, Vol. 32, no. 1, pp. 42-56.
78. Wellenstein M.D., de Visser K.E. Cancer-cell-intrinsic mechanisms shaping the tumor immune landscape. *Immunity*, 2018, Vol. 48, no. 3, pp. 399-416.
79. Wherry T.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 8, pp. 486-499.
80. Whiteside T.L. Tumor-derived exosomes and their role in cancer progression. *Adv. Clin. Chem.*, 2016, Vol. 74, pp. 103-141.
81. Whiteside T.L. Exosomes carrying immunoinhibitory proteins and their role in cancer. *Clin. Exp. Immunol.*, 2017, Vol. 189, no. 3, pp. 259-267.
82. Whiteside T.L. Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment. *Semin. Immunol.*, 2018, Vol. 35, no. 2, pp. 69-79.
83. Workel H.H., Komdeur F.L., Wouters M.C., Plat A., Klip H.G., Eggink F.A., Wisman G.B., Arts H.J., Oonk M.H., Mourits M.J., Yigit R., Versluis M., Duiker E.W., Hollema H., de Bruyn M., Nijman H.W. CD103 defines intraepithelial CD8<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> tumour-infiltrating lymphocytes of prognostic significance in endometrial adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer*, 2016, Vol. 60, pp. 1-11.
84. Zhang B., Yin Y., Lai R.C., Tan S.S., Choo A.B., Lim S.K. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells Dev.*, 2014, Vol. 23, no. 11, pp. 1233-1244.
85. Zhang Y., Ertl H.C. Starved and asphyxiated: How can CD8<sup>+</sup> T cells within a tumor microenvironment prevent tumor progression. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 32. doi.org/10.3389/fimmu.2016.00032.
86. Zundler S., Becker E., Spocinska M., Slawik M., Parga-Vida L., Stark R., Wiendl M., Atreya T., Rath M., Leppkes M., Hildner K., Lypcz-Posadas R., Lukassen S., Ekici A. B., Neufert C., Atreya I., van Gisbergen K.J.G., Neurath M.F. Hobit- and Blimp-1-driven CD4<sup>+</sup> tissue-resident memory T cells control chronic intestinal inflammation. *Nat. Immunol.*, 2019, Vol. 20, no. 3, pp. 288-300.

**Авторы:**

**Олейник Е.К.** — д.б.н., доцент, главный научный сотрудник, руководитель группы иммунологии ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

**Шибачев М.И.** — к.м.н., хирург-онколог ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

**Игнатиев К.С.** — хирург-онколог ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

**Олейник В.М.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

**Жулай Г.А.** — младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

**Authors:**

**Oleinik E.K.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Main Research Associate, Head of Immunology Group, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

**Shibaev M.I.**, PhD (Medicine), Oncology Surgeon, Republican Cancer Dispensary, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

**Ignatiev K.S.**, Oncology Surgeon, Republican Cancer Dispensary, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

**Oleinik V.M.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

**Zhulay G.A.**, Junior Research Associate, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Поступила 03.12.2019  
Принята к печати 29.01.2020

Received 03.12.2019  
Accepted 29.01.2020

# РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ И ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ В ГЕНЕЗЕ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Полозова Э.И., Пузанова Е.В., Сеськина А.А.

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

**Резюме.** Смертность от болезней системы кровообращения является острой проблемой современного здравоохранения. Основной вклад в развитие кардиоваскулярных осложнений вносит артериальная гипертензия (АГ), часто протекающая на фоне метаболических нарушений. Патогенез АГ в настоящее время рассматривается с позиций мультифакториальности. В условиях метаболических нарушений патогенез АГ, безусловно, имеет определенные особенности. Поэтому актуальным является обобщение источников литературы по оценке роли иммунологических нарушений, эндотелиальной дисфункции и гемостатических расстройств в генезе АГ при метаболическом синдроме (МС). Большинство авторов сходятся во мнении о существовании нескольких механизмов, обуславливающих наличие связи АГ и инсулинорезистентности. Развитие АГ у пациентов с МС является следствием иммунометаболических процессов. Важный компонент МС — абдоминальное ожирение, при гипертензии ассоциированное с хроническим воспалением висцеральной жировой ткани, чрезмерной инфильтрацией иммунными клетками и повышенной выработкой адипокинов и цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-6). АГ связана со значительным увеличением Т-клеток, которые опосредуют эндотелиальную дисфункцию (ЭД) и обеспечивают связь между гипертензией и последующим атеросклерозом. Т-лимфоциты запускают каскад реакций, конечным продуктом которого является IL-17, участвующий не только в повышении артериального давления, но и способствующий развитию жесткости сосудистой стенки у пациентов с АГ. Таким образом, взаимосвязь между несколькими типами иммунных клеток приводит к воспалительным реакциям, в том числе и в сосудистой стенке, инициирующим дисфункцию эндотелия. Хроническое неспецифическое воспаление при МС, поддерживаемое системой цитокинов, является триггерным механизмом запуска ЭД. Классическими маркерами ЭД является избыточная продукция эндотелина-1 и ингибирование выработки оксида азота. Иммунное повреждение приводит к дисбалансу выработки эндотелием вазоконстрикторных и вазодилатирующих, пролиферативных и антипролиферативных факторов. Показано, что в патогенезе артериальной гипертензии, связанном с метаболическими нарушениями, ЭД является интегральным аспектом синдрома инсулинорезистентности и способствует ее углублению, увеличению реактивности сосудов и дальнейшему формированию АГ. Согласно современным исследованиям показано, что избыточный синтез провоспалительных цитокинов привносит нарушения в систему сосудистого гемостаза.

## Адрес для переписки:

Полозова Элла Ивановна  
Национальный исследовательский Мордовский  
государственный университет имени Н.П. Огарева  
430000, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск,  
ул. Димитрова, 35/67.  
Тел.: 8 (927) 174-05-31.  
E-mail: ellanac78@mail.ru

## Address for correspondence:

Polozova Ella I.  
Ogarev Mordovia State University  
430000, Russian Federation, Republic of Mordovia, Saransk,  
Dimitrov str., 35/67.  
Phone: 7 (927) 174-05-31.  
E-mail: ellanac78@mail.ru

## Образец цитирования:

Э.И. Полозова, Е.В. Пузанова, А.А. Сеськина «Роль иммунологических нарушений, эндотелиальной дисфункции и гемостатических расстройств в генезе артериальной гипертензии при метаболическом синдроме» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 221-230. doi: 10.15789/1563-0625-ROI-1926  
© Полозова Э.И. и соавт., 2020

## For citation:

E.I. Polozova, E.V. Puzanova, A.A. Seskina "Role of immunological disorders, endothelial dysfunction and hemostatic disorders in the genesis of arterial hypertension in the metabolic syndrome", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 221-230. doi: 10.15789/1563-0625-ROI-1926  
DOI: 10.15789/1563-0625-ROI-1926

Изучив проведенные исследования по влиянию метаболических нарушений на систему гемостаза, можно сделать вывод, что активация фибринолитической и плазменной цепи происходит одинаково как у мужчин, так и у женщин, с небольшими гендерными особенностями отдельных компонентов. При МС изменяются и реологические свойства крови. Систематизация имеющихся данных литературы по исследуемому вопросу может служить основой для определения прогностических критериев прогрессирования АГ и риска возникновения тромботических осложнений.

*Ключевые слова: артериальная гипертензия, метаболические нарушения, метаболический синдром, инсулинорезистентность, неспецифическое воспаление, иммунные нарушения, эндотелиальная дисфункция, гемостатические расстройства*

## ROLE OF IMMUNOLOGICAL DISORDERS, ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND HEMOSTATIC DISORDERS IN THE GENESIS OF ARTERIAL HYPERTENSION IN THE METABOLIC SYNDROME

Polozova E.I., Puzanova E.V., Seskina A.A.

Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

**Abstract.** Mortality from diseases of the circulatory system is a challenge for the modern health care. Arterial hypertension (AH) mostly contributes to development of cardiovascular complications. It often proceeds against the background of metabolic disorders. Pathogenesis of hypertension is currently being considered a multifactorial disease. Pathogenesis of hypertension certainly has distinct features in presence of metabolic disorders. Therefore, it is relevant to summarize current literature on the role of immunological disorders, endothelial dysfunction and hemostatic disorders in AH genesis during metabolic syndrome (MS). Most authors agree with existence of several mechanisms that determine relationships between AH and insulin resistance. Development of hypertension in MS patients with is a consequence of immunometabolic processes. Abdominal obesity is an important component of MS. It is associated with chronic inflammation of visceral adipose tissue, its excessive infiltration by immune cells, and increased production of adipokines and cytokines (TNF $\alpha$ , IL-6) with hypertension. AH is associated with a significant increase in T cells, that mediate endothelial dysfunction (ED) and provide a link between hypertension and subsequent atherosclerosis. T lymphocytes trigger a cascade of reactions. IL-17 is the end product of these events. It is involved not only in increasing blood pressure, but also contributes to the development of vascular wall stiffness in AH patients. Thus, the relationship between several types of immune cells leads to inflammatory reactions, including those of vascular wall, initiating endothelial dysfunction. Chronic non-specific inflammation in MS, supported by the cytokine system, is a triggering mechanism for ED progression. Excessive production of endothelin-1 and inhibition of nitric oxide production are the classic markers of ED. Immune damage leads to imbalance in the production of vasoconstrictor and vasodilating substances, proliferative and antiproliferative factors in endothelium. It was shown that ED is an integral aspect of the insulin resistance syndrome in pathogenesis of arterial hypertension associated with metabolic disorders, and contributes to its worsening, increased vascular reactivity and further AH development. According to modern studies, it has been shown that excessive synthesis of pro-inflammatory cytokines introduces disturbances in the system of vascular hemostasis. When studying the effects of metabolic disorders upon hemostatic system, we may conclude that activation of fibrinolytic and plasma chains occurs in the same way for both men and women, with small gender characteristics of individual components. The rheological properties of the blood are also changed with developing MS. Systematization of the available literature data on the issue under study can serve as a basis for determining prognostic criteria of hypertension progression and risk of thrombotic complications.

*Keywords: arterial hypertension, metabolic disorders, metabolic syndrome, insulin resistance, nonspecific inflammation, immune disorders, endothelial dysfunction, hemostatic disorders*

## Введение

Смертность от болезней системы кровообращения является острой проблемой современного здравоохранения. Ежеминутно в мире от данной нозологии умирает 33 человека, за год — 32 млн человек. В связи с этим национальный проект здравоохранения призван сократить сердечно-сосудистую смертность на 23% к 2024 году. Артериальная гипертензия (АГ) продолжает оставаться важным фактором риска сердечно-сосудистых событий и отличается высокой распространенностью [8, 29].

По статистическим данным, 62% женского населения и 34% мужского населения с АГ имеют избыточный индекс массы тела, а треть пациентов с АГ страдает ожирением. Кроме этого, пациенты с АГ и избыточным весом имеют нарушения липидного, углеводного и пуринового обмена, то есть страдают метаболическим синдромом (МС) [7].

Патогенез АГ в настоящее время рассматривается с позиций мультифакториальности. В условиях метаболических нарушений патогенез АГ, безусловно, имеет определенные особенности. Большинство авторов сходятся во мнении, что развитие АГ у пациентов с МС является следствием иммунометаболических процессов, запускающих процессы эндотелиальной дисфункции и нарушающих гомеостаз свертывающей системы.

Важная роль в научных публикациях отводится процессам хронического вялотекущего воспаления, влияющим на течение и прогрессирование АГ при МС и развитие сердечно-сосудистых катастроф. В последние годы накапливаются новые данные о связи выявляемых в крови маркеров воспаления с атеросклерозом и ассоциированными с ним сердечно-сосудистыми заболеваниями. Постоянно растет интерес к системе цитокинов, влиянию иммунного ответа, установлению роли медиаторов воспаления, показателям системы гемостаза как предикторам тромботических осложнений [24].

**Целью нашего исследования** явилась систематизация данных литературы, посвященных изучению особенностей генеза АГ у больных с метаболическими нарушениями в свете иммунологических, эндотелиальных и гемостатических нарушений.

Распространение МС у больных с АГ ведет к поражению органов мишеней, прогрессированию атеросклероза и к развитию сердечно-сосудистых осложнений. Основным механизмом прогрессирования АГ при МС является инсулинорезистентность (ИР) и гиперинсулинемия [30]. Генез ИР при МС может быть заложен на геномном уровне и/или усугубляться степенью

висцерального ожирения. Доказано, что степень выраженности гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ) при метаболических нарушениях (МН) выше, чем у лиц с АГ без признаков МС [17, 18, 19]. Среди пациентов с МН преобладают «нон-дипперы», а более высокий уровень пульсового артериального давления (АД) у данной категории пациентов ассоциирован с более выраженными факторами риска сердечно-сосудистых событий [14]. На фоне гиперинсулинемии (ГИ) и ИР усиливается пролиферация гладкомышечных клеток сосудистой стенки, эндотелий становится более чувствительным к воздействию различных биологически активных веществ за счет повышения содержания ионов кальция и натрия в артериальной стенке [6].

### **Роль неспецифического воспаления и иммунологических нарушений в генезе АГ**

Важность изучения АГ в связи с МС состоит в том, что МН являются модифицируемыми предикторами развития сердечно-сосудистых осложнений. Висцеральная жировая ткань является источником продукции таких биологически активных веществ, как адипокины, лептин, фактор некроза опухолей (TNF $\alpha$ ), провоспалительные цитокины (интерлейкин (IL)-1, IL-4, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ ), трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), эстрогены, ангиотензиноген и др. Известен тот факт, что хроническое воспаление при МС поддерживается как за счет звеньев клеточного, так и гуморального иммунитета на фоне ослабленного адаптивного иммунитета [11].

По результатам проведенных исследований, у больных с АГ и МС количество лептина в крови превышало таковой уровень в сравнении с группой АГ без МН. Лептин у лиц с АГ приводит к еще большей стимуляции симпатической нервной системы и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), ускоряя прогрессирование АГ. Лептин запускает процессы фиброза в почечной ткани и стимулирует синтез эндотелина-1, приводя к эндотелиальной дисфункции в почечных сосудах [4]. Также лептин инициирует продукцию TGF- $\beta$  клетками эндотелия. Повышенная продукция цитокина TGF- $\beta$  стимулирует рост жировой ткани за счет того, что является индуктором преадипоцитов. Избыточный синтез TGF- $\beta$  приводит к пролиферации фибробластов и сосудистому ремоделированию [10].

Общеизвестно, что различные подтипы Т-лимфоцитов способны синтезировать определенные цитокины, участвующие в различных биологических реакциях [49]. Th1-подтип лимфоцитов генерирует выработку TNF $\alpha$ , IL-2, IFN $\gamma$ ; Th2-подтип продуцирует IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, ингибирует клеточно-опосредованный иммунитет и стимулирует В-лимфоциты. Th17-

подтип лимфоцитов продуцирует IL-17, IL-22 и принимает участие в развитии аутоиммунного ответа [47]. CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты являются дополнительным источником синтеза TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ . У лиц с эссенциальной АГ в сыворотке крови определялось повышение CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и более выраженное почечное и сосудистое ремоделирование [53]. Кроме того, доказано, что Т-лимфоциты экспрессируют на своей поверхности минералокортикоидный рецептор, участвующий в развитии и прогрессировании гипертонической болезни. Данный рецептор стимулирует продукцию IFN $\gamma$  CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, вызывая поражение органов мишеней. Препараты группы антагонистов минералокортикоидных рецепторов ингибируют синтез IFN $\gamma$  CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитами, замедляя процессы ремоделирования при АГ [44, 52].

IFN $\gamma$  и IL-17 — два мощных вазопрессора при АГ. IFN $\gamma$  повышает концентрацию в крови ангиотензина II, опосредованно воздействуя на продукцию ангиотензиногена в гепатоцитах и почечных канальцах. Кроме того, IFN $\gamma$  подавляет выработку оксида азота — важного вазодилатора [27, 40].

IL-17 независимо экспрессируется различными типами Т-лимфоцитов. Причем различают несколько подтипов IL-17 (А, С, D, E, F). IL-17 способен инициировать синтез TNF $\alpha$ , IL-6, хемокинов, металлопротеиназ. В эксперименте доказан механизм повышения АД и развитие сосудистого ремоделирования за счет активации данных цитокинов [43, 48].

Таким образом, цитокины между собой находятся в тесной связи. Избыток в крови цитокина IFN $\gamma$  у пациентов с МС в сочетании с АГ ведет к стимуляции выработки макрофагов, запускающих продукцию других провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, в том числе и TNF $\alpha$ ), и тормозит выработку противовоспалительных медиаторов (IL-4, IL-10) [20]. Экспериментально доказано, что одним из мощных участников воспаления при МС является IL-6, достоверно увеличивающий утренний подъем АД. Он индуцирует выработку С-реактивного белка (СРБ), аполипопротеина- $\alpha$ , фибриногена, компонентов комплемента, которые, в свою очередь, замыкают порочный круг в стимуляции локального и системного воспаления [24]. Повышение уровня IL-6 в сыворотке крови коррелирует с тромботическими осложнениями у больных с МС вследствие прокоагулянтной активности. Общеизвестным фактом является влияние данного цитокина на эндотелиальную дисфункцию. При АГ и МС пропорционально идет рост и числа рецепторов к IL-6 [54]. В связи с этим полезным будет применение в лечении АГ антагонистов кальция,

которые способны блокировать рецепторы IL-6 на эндотелии сосудов [37].

Локальная гиперпродукция отдельных цитокинов (IL-4, IL-10) ведет к подавлению воспаления. Напротив, хроническая активация на системном уровне приводит к генерализованным иммунным реакциям [12].

Завершает цепь иммунных реакций образование IL-17, независимо экспрессируемого различными подтипами Т-лимфоцитов, избыточное количество которого увеличивает жесткость сосудистой стенки [45]. Отягощает тяжесть хронического субклинического воспалительного процесса вовлечение в иммунный ответ лимфоцитов и моноцитов. Выявлены различия субпопуляционного состава лимфоцитов у пациентов с МС в сочетании с АГ и у здоровых лиц [51].

У пациентов с МС обнаружено повышение в сыворотке крови CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> лимфоцитов и CD36<sup>+</sup> моноцитов. Данные субпопуляции тормозят аутоиммунные процессы в организме, вызывая супрессию избыточного воспалительного процесса. Выявление прямой корреляционной взаимосвязи повышения в организме CD4<sup>+</sup> лимфоцитов с компонентами МС (уровнем систолического АД, степенью ожирения, нарушением углеводного, пуринового и липидного обменов) подтверждает иммунное воспаление при МС [2].

Доказана и роль В-лимфоцитов в развитии и прогрессировании АГ. Помимо синтеза антигенспецифических иммуноглобулинов, В-лимфоциты способны продуцировать ряд цитокинов — трансформирующий фактор роста (TGF)- $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, IL-35 [38, 41]. Повышенная активность гуморального иммунитета у лиц с МС проявляется повышенным содержанием в крови активированных CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>В-клеток [34]. Также известно, что хронический воспалительный процесс поддерживается за счет синтеза жировой тканью провоспалительных цитокинов CD14<sup>+</sup>Т-клеток [57].

В эксперименте показано, что В-лимфоциты увеличивают активацию макрофагов и продукцию иммуноглобулинов у лиц с АГ [35]. По данным зарубежных авторов, увеличение содержания иммуноглобулинов класса G при АГ в сочетании с МН поддерживает хронический вялотекущий воспалительный процесс в сосудистой стенке и способствует развитию атеросклероза [44].

Висцеральная жировая ткань становится главным источником TNF $\alpha$ , повышение уровня которого в сыворотке крови свидетельствует о клеточном апоптозе и активных процессах липолиза. Свободные жирные кислоты пополняют пул атерогенного холестерина, ускоряя процессы атеросклероза при АГ [25]. Избыточное количество TNF $\alpha$  блокирует инсулиновые рецепторы и при-

водит к развитию ИР, наличие которой только усугубляется у лиц с МН. Роль  $\text{TNF}\alpha$  в развитии эндотелиальной дисфункции (ЭД) заключается в ингибировании продукции оксида азота и активации синтеза эндогенного вазоконстриктора — эндотелина [46]. Кроме того,  $\text{TNF}\alpha$  стимулирует выработку молекул адгезии (GM-CSF, MCP-1, ICAM, VCAM) на структурной единице эндотелия, в результате чего развивается воспалительная реакция с участием лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов [5].

Исследователями доказана связь длительно-сти течения АГ и уровня СРБ в плазме. Высокий уровень СРБ в крови ассоциируется с развитием кардиоваскулярных осложнений у больных с АГ и МС. Экспериментально доказано, СРБ стимулирует экспрессию ангиотензина II (АТ II) 1-го типа на гладкомышечных клетках сосудистой стенки, приводя к процессам ремоделирования [31]. Ангиотензин II пролонгирует синтез провоспалительных цитокинов, молекул адгезии клетками эндотелия, увеличивает выработку эндотелина-1 [33].

#### **Эндотелиальная дисфункция при АГ и МС**

Хроническое неспецифическое воспаление при МС, поддерживаемое системой цитокинов, является триггерным механизмом запуска ЭД. Классическими маркерами ЭД являются избыточная продукция эндотелина-1 и ингибирование выработки оксида азота [16]. Иммунное повреждение приводит к дисбалансу выработки эндотелием вазоконстрикторных и вазодилатирующих, пролиферативных и антипролиферативных факторов. Активированные звенья иммунной системы повреждают эндотелиальные клетки, вызывая структурные и функциональные изменения в сосудистой стенке, способствуя прогрессированию АГ [9, 21]. Повышенный уровень гомоцистеина (ГЦ) в сыворотке крови у пациентов с АГ и МН, выявляемый как маркер раннего развития ЭД, является предиктором тромботических и ишемических событий [13]. Избыточное количество ГЦ ассоциировано с угнетением синтеза оксида азота и повышенной продукцией эндотелина. Другими маркерами дисфункции эндотелия выступают натрийуретический пептид С, компенсаторно синтезирующийся при дефиците оксида азота, и высокий уровень липопротеина ( $\alpha$ ). Липопротеин ( $\alpha$ ), взаимодействуя с интегрином Мас-1, способствует привлечению моноцитов в сосудистую стенку, активации фактора транскрипции NF- $\kappa$ B и интеграции воспалительного процесса [1].

По-прежнему неоспорима роль самого мощного фактора ЭД и активного компонента РААС — ангиотензина II. Ангиотензин II блокирует синтез брадикинина и простагландинов и,

напротив, индуцирует синтез вазопрессина, способствуя развитию вазоконстрикции.

Имеет место в диагностике ЭД определение уровня копептина, являющегося предшественником вазопрессина, но имеющего более стабильный характер секреции в кровь в отличие от самого гормона. Копептин имеет клиническое значение при стратификации риска у пациентов с обострениями ишемической болезни, развитии сердечной недостаточности и смерти [28, 56].

В условиях нарушенного липидного обмена изменяется окисление липопротеинов низкой плотности (ЛНП). Окисленные ЛНП подавляют вазодилатирующие факторы эндотелия, повышают синтез эндотелина, увеличивают пролиферацию гладкомышечных клеток меди сосудов; стимулируют миграцию моноцитов в эндотелий, запускают процессы тромбообразования за счет индукции синтеза эндотелием тканевого фактора, инициируют агрегацию тромбоцитов [15].

Немалый интерес представляет и определение в крови циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) по отношению к лейкоцитам, являющихся не прямым маркером ЭД, а продуктом повреждения эндотелия. Уровень, превышающий 3 ЦЭК на 300 тыс. лейкоцитов в плазме крови, повышает риск развития атеросклеротической болезни сердца в 4 раза у женщин до 60 лет. А при наличии ишемической болезни сердца риск коронарного синдрома увеличивается в 8 раз [5].

Прямыми факторами, вызывающими ЭД, являются собственно повышенное АД и курение. Установлена дозозависимая связь между количеством выкуренных сигарет и прогрессированием ЭД. Никотин не только уменьшает содержание оксида азота и простаглицлина, но и способствует тромбообразованию путем стимуляции экспрессии гликопротеинов на мембране тромбоцита. Токсические вещества в табачном дыме напрямую повреждают стенку эндотелия, что приводит к увеличению ЦЭК в плазме крови. Длительное воздействие повышенного АД на стенку эндотелия нарушает его процессы гомеостаза, возникают предпосылки для развития атеросклероза, а повышенное общее периферическое сопротивление сосудов способствует прогрессированию АГ [3].

Фактором, влияющим на прогноз у пациентов с АГ и МС, является определение микроальбуминурии (МАУ). Известно, что хроническая болезнь почек остается независимым фактором риска развития кардиоваскулярных осложнений. Скорость клубочковой фильтрации 30–50 мл/мин автоматически заносит пациента в группу высокого сердечно-сосудистого риска, менее 30 мл/мин — в группу очень высокого риска. В связи с чем, МАУ как ранний маркер ЭД при АГ, имеет вы-

сокую диагностическую ценность на начальных стадиях поражения почек [36, 50, 55].

#### Изменения в системе гемостаза при АГ и МС

В условиях ИР и ГИ усиливаются процессы гиперкоагуляции и гипофибринолиза, создаются предпосылки для тромботических осложнений у пациентов с АГ и МС [22]. Экспериментально показано, что избыточный синтез провоспалительных цитокинов у лиц с МН приводит к нарушениям в системе сосудистого гемостаза. Фибринолитические изменения выявляются при повышенной активности D-димера, фибрина, фибрин-мономерных комплексов на фоне снижения уровня плазминогена и активации ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (РАI-1) без гендерных различий. Отслежена положительная линейная корреляция между содержанием ангиотензина II и РАI-1 [24]. Изменения плазменного состава связаны с изменением таких показателей, как укорочение активированного парциального тромбопластинного времени (АПТВ), повышение показателя ингибитора внешнего пути свертывания (TFPI) у женщин с МС и АГ. Определена достоверная связь повышения уровня фибриногена со степенью висцерального ожирения у мужчин. Изучив проведенные исследования по влиянию МН на систему гемостаза, можно сделать вывод, что активация фибринолитической и плазменной цепи происходит одинаково как у мужчин, так и у женщин [32].

У лиц женского пола с признаками МС наблюдается компенсаторная стимуляция антикоагулянтной системы гемостаза [26]. Согласно литературным источникам, повышение активности факторов свертывания крови (особенно фактора VII) при МС опосредовано гиперинсулинемией и ИР [39].

Изменения реологических свойств крови при МС связаны с повышением вязкости плазмы крови на 27%, повышенной степенью агрегации эритроцитов на 63%, уменьшением эффектив-

ности транспорта кислорода на 20%. Изменения системы гемостаза у лиц с АГ и МС напрямую связаны с ЭД, вследствие низкой продукции простациклина [23].

## Заключение

Таким образом, показана роль взаимодействия различных систем (иммунной, эндотелиальной, системы гемостаза) в развитии, прогрессировании АГ и формировании сердечно-сосудистых осложнений. Модификация метаболических нарушений, в том числе снижение степени висцерального ожирения, способна замедлить процессы хронического неспецифического воспаления, развитие ЭД, прогрессирование АГ и развитие ассоциированных клинических состояний. Проведенные многочисленные клинические исследования доказывают роль ЭД в развитии осложнений АГ. ЭД является важным предиктором развития процессов атеросклероза и повышения агрегационных способностей тромбоцитов. Изучение ранних маркеров ЭД поможет в определении тактики ведения пациента с МН и АГ, определении интенсивности лечения, направленного на предупреждение развития сосудистых катастроф.

Появляется множество доказательств связи патогенеза АГ с инсулинорезистентностью, каскадом иммуопосредованных реакций, системой цитокинов. Запуск иммуометаболических процессов способствует прогрессированию АГ, приводит к более выраженным изменениям в органах мишенях, резистентному и агрессивному течению АГ. Доказана роль ГИ и ИР, ангиотензина II в активации системы гиперкоагуляции, нарушении реологических свойств крови.

Систематизация имеющихся данных литературы по исследуемому вопросу может служить основой для определения прогностических критериев прогрессирования АГ и риска возникновения тромботических осложнений.

## Список литературы / References

1. Афонасьева Т.М. Эндотелиальная дисфункция. Возможности ранней диагностики // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке», 2016. № 11. С. 101-104. [Afonasyeva T.M. Endothelial dysfunction. Opportunities for early diagnosis. *Zhurnal nauchnykh statey "Zdorovye i obrazovanie v veke" = Journal of Scientific Articles "Health and Education Millennium"*, 2016, Vol. 18, no. 11. pp. 101-104. (In Russ.)]
2. Беспалова И.Д., Рязанцева Н.В., Калюжин В.В., Мурашев Б.Ю., Осихов И.А., Медянцев Ю.А., Афонасьева Д.С. Субпопуляции и метаболическая активность мононуклеаров крови при метаболическом синдроме // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 4. С. 345-352. [Bespalova I.D., Ryazantseva N.V., Kalyuzhin V.V., Murashev B.Yu., Osikhov I.A., Medyantsev Yu.A., Afanasyeva D.S. Subpopulations and metabolic activity of blood mononuclear cells in metabolic syndrome. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 345-352. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-4-345-352.
3. Бигаева Д.У., Даурова М.Д., Гатагонова Т.М., Болиева Л.З. Особенности структурно-функциональных изменений сердечно-сосудистой системы у больных с артериальной гипертензией и хронической обструктивной болезнью легких [Электронный ресурс] // Современные проблемы науки и образования: электронный научный журнал, 2014, № 4. Режим доступа: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=14483>.

[Bigaeva D.U., Daurova M.D., Gatagonova T.M., Bolieva L.Z. Features of structural and functional changes in the cardiovascular system in patients with arterial hypertension and chronic obstructive pulmonary disease [Electronic resource]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* = *Modern Problems of Science and Education: Electronic Scientific Journal*, 2014, no. 4. (In Russ.)] Access mode: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=14483>.

4. Бояринова М.А., Ротарь О.П., Конради А.О. Адипокины и кардиометаболический синдром // Артериальная гипертензия, 2014. Т. 20, № 5. С. 422-432. [Boyarinova M.A., Rotar O.P., Konradi A.O. Adipokines and cardiometabolic syndrome. *Arterialnaya gipertenziya* = *Arterial Hypertension*, 2014, Vol. 20, no. 5, pp. 422-432. (In Russ.)]

5. Булаева Н.И., Голухова Е.З. Эндотелиальная дисфункция и оксидативный стресс: роль в развитии кардиоваскулярной патологии // Креативная кардиология, 2013. № 1. С. 14-22. [Bulaeva N.I., Golukhova E.Z. Endothelial dysfunction and oxidative stress: a role in the development of cardiovascular pathology. *Kreativnaya kardiologiya* = *Creative Cardiology*, 2013, no. 1, pp. 14-22. (In Russ.)]

6. Вершинина А.М., Реут Ю.С., Гапон Л.И., Бусарова Е.С., Третьякова Н.В., Копылова Л.Н., Плюснин А.В. Сравнительная эффективность комбинированной антигипертензивной терапии у пациентов артериальной гипертензией в сочетании с метаболическими нарушениями // Медицинская наука и образование Урала, 2013. Т. 14, № 3 (75). С. 14-17. [Vershina A.M., Reut Yu.S., Gapon L.I., Busarova E.S., Tretyakova N.V., Kopylova L.N., Plyusnin A.V. Comparative efficacy of combined antihypertensive therapy in patients with arterial hypertension in combination with metabolic disorders. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala* = *Medical Science and Education of the Ural*, 2013, Vol. 14, no. 3 (75), pp. 14-17. (In Russ.)]

7. Герасимова А.С., Олейников В.Э., Елисеева И.В. Особенности течения артериальной гипертензии и поражения органов-мишеней при метаболическом синдроме // Кардиология, 2008. № 3. С. 22-29. [Gerasimova A.S., Oleinikov V.E., Eliseeva I.V. Peculiarities of the course of arterial hypertension and target organ damage in the metabolic syndrome. *Kardiologiya* = *Cardiology*, 2008, no. 3, pp. 22-29. (In Russ.)]

8. Ионов М.В., Звартау Н.Э., Конради А.О. Совместные клинические рекомендации ESH/ESC 2018 по диагностике и ведению пациентов с артериальной гипертензией: первый взгляд // Артериальная гипертензия, 2018. № 24 (3). С. 351-358. [Ionov M.V., Zvartau N.E., Konradi A.O. Joint clinical recommendations of ESH / ESC 2018 for the diagnosis and management of patients with arterial hypertension: a first look. *Arterialnaya gipertenziya* = *Arterial Hypertension*, 2018, no. 24 (3), pp. 351-358. (In Russ.)]

9. Исламгалеева З.М., Мингазетдинова Л.Н., Кабилова А.В., Бакиров А.Б. Взаимосвязь эндотелиальной дисфункции с полиморфизмом генов SELP и VEGF у женщин с метаболическим синдромом и артериальной гипертензией // Медицинский вестник Башкортостана, 2017. Т. 12, № 6 (72). С. 21-26. [Islamgaleeva Z.M., Mingazetdinova L.N., Kabilova A.V., Bakirov A.B. The relationship of endothelial dysfunction with polymorphism of the SELP and VEGF genes in women with metabolic syndrome and arterial hypertension. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana* = *Medical Journal of Bashkortostan*, 2017, Vol. 12, no. 6 (72), pp. 21-26. (In Russ.)]

10. Князева Л.А., Шишова А.С., Горайнов И.И. Влияние терапии на маркеры субклинического воспаления и ригидность сосудистого русла у больных артериальной гипертензией с метаболическим синдромом // Современные проблемы науки и образования, 2012. № 6. С. 267. [Knyazeva L.A., Shishova A.S., Goryainov I.I. The effect of therapy on markers of subclinical inflammation and stiffness of the vascular bed in patients with arterial hypertension with metabolic syndrome. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* = *Modern Problems of Science and Education*, 2012, no. 6, p. 267. (In Russ.)]

11. Крюков Н.Н., Гинзбург М.М., Киселева Е.В. Современный взгляд на роль асептического воспаления жировой ткани в генезе ожирения и метаболического синдрома // Артериальная гипертензия, 2013. Т. 19, № 4. С. 305-310. [Kryukov N.N., Ginzburg M.M., Kiseleva E.V. A modern view of the role of aseptic inflammation of adipose tissue in the genesis of obesity and metabolic syndrome. *Arterialnaya gipertenziya* = *Arterial Hypertension*, 2013, Vol. 19, no. 4, pp. 305-310. (In Russ.)]

12. Литвинова Л.С., Кириенкова Е.В., Аксенова Н.Н., Газатова Н.Д., Затолокин П.А. Особенности клеточного иммунитета и цитокинового репертуара у пациентов с метаболическим синдромом // Бюллетень сибирской медицины, 2012. № 3. С. 53-57. [Litvinova L.S., Kirienkova E.V., Aksenova N.N., Gazatova N.D., Zatolokin P.A. Features of cellular immunity and cytokine repertoire in patients with metabolic syndrome. *Byulleten sibirskoy meditsiny* = *Bulletin of Siberian Medicine*, 2012, no. 3, pp. 53-57. (In Russ.)]

13. Лындина М.Л., Шишкин А.Н., Тесля О.В. Особенности ранней диагностики эндотелиальной дисфункции у больных с метаболическим синдромом // Вестник СПбГУ. Сер. 11. 2014. Вып. 3. С. 56-64. [Lyndina M.L., Shishkin A.N., Teslya O.V. Features of early diagnosis of endothelial dysfunction in patients with metabolic syndrome. *Vestnik SPbGU* = *Bulletin of St. Petersburg State University, Ser. 11*, 2014, Iss. 3, pp. 56-64. (In Russ.)]

14. Мамедов М.Н., Горбунов В.М., Киселева Н.В., Оганов Р.Г. Особенности структурно-функциональных изменений миокарда и гемодинамических нарушений у больных с метаболическим синдромом: вклад артериальной гипертензии в формирование суммарного коронарного риска // Кардиологический вестник, 2005. № 1. С. 11-16. [Mamedov M.N., Gorbunov V.M., Kiseleva N.V., Oganov R.G. Features of structural and functional changes in the myocardium and hemodynamic disorders in patients with metabolic syndrome: the contribution of arterial hypertension to the formation of total coronary risk. *Kardiologicheskiy vestnik* = *Cardiological Bulletin*, 2005, no. 1, pp. 11-16. (In Russ.)]

15. Марков Х.М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия // Кардиология, 2005. № 12. С. 62-67. [Markov Kh.M. Molecular mechanisms of vascular endothelial dysfunction. *Kardiologiya = Cardiology*, 2005, no. 12, pp. 62-67. (In Russ.)]

16. Невзорова В.А., Помогалова О.Г., Настрадаин О.В. Роль эндотелиальной дисфункции в прогрессировании метаболического синдрома от факторов риска до сосудистых катастроф // Тихоокеанский медицинский журнал, 2008. № 3. С. 69-74. [Nevzorova V.A., Pomogalova O.G., Nastradin O.V. The role of endothelial dysfunction in the progression of the metabolic syndrome from risk factors to vascular accidents. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2008, no. 3, pp. 69-74. (In Russ.)]

17. Полозова Э.И., Мамкина Н.Н., Сеськина А.А., Пузанова Е.В., Абрамова С.Г., Азизова Э.З. Диастолическая дисфункция левого желудочка у больных метаболическим синдромом и артериальной гипертензией // XLVI Огарёвские чтения: Материалы науч. конф.: в 3 ч. Ч. 2: Естественные науки / отв. за вып. П.В. Сенин. Саранск: Мордов. гос. ун-т, 2018. С. 352-357. [Polozova E.I., Mamkina N.N., Seskina A.A., Puzanova E.V., Abramova S.G., Azizova E.Z. Diastolic dysfunction of the left ventricle in patients with metabolic syndrome and arterial hypertension. XLVI Ogaryovskiy Reading: Materials of Scientific Conference: in 3 hours. Part 2: Natural Sciences / ed. for issue P.V. Senin. Saransk]. Mordovia State University, 2018, pp. 352-357. (In Russ.)]

18. Полозова Э.И., Сорокина Н.Н., Сеськина А.А., Пузанова Е.В., Азизова Э.З., Абрамова С.Г. Новые возможности диагностики кардиоренальных нарушений при метаболическом синдроме // Инновации в образовании и медицине: Материалы V Всероссийской науч.-практ. конф. с международным участием. Махачкала, 2018. С. 235-240. [Polozova E.I., Sorokina N.N., Seskina A.A., Puzanova E.V., Azizova E.Z., Abramova S.G. New opportunities for the diagnosis of cardiorenal disorders in metabolic syndrome. Innovations in education and medicine: Materials of the V All-Russian Scientific-practical Conference with International Participation]. Makhachkala, 2018, pp. 235-240.

19. Полозова Э.И., Сорокина Н.Н., Чегодаева Л.В., Трохина И.Е., Сеськина А.А., Пузанова Е.В. Исследование ренальной дисфункции у больных артериальной гипертензией и метаболическим синдромом // Материалы VI Евразийского конгресса кардиологов. Москва. 18-19 апреля 2018. С. 10-11. [Polozova E.I., Sorokina N.N., Chegodaeva L.V., Trokhina I.E., Seskina A.A., Puzanova E.V. The study of renal dysfunction in patients with arterial hypertension and metabolic syndrome. Materials of the VI Eurasian Congress of Cardiology]. Moscow, April 18-19, 2018, pp. 10-11.

20. Прокудина Е.С., Маслов Л.Н., Иванов В.В., Беспалова И.Д., Письменный Д.С., Воронков Н.С. Роль активных форм кислорода в патогенезе дисфункции адипоцитов при метаболическом синдроме: перспективы фармакологической коррекции // Вестник РАМН, 2017. № 72 (1). С. 11-16. [Prokudina E.S., Maslov L.N., Ivanov V.V., Bepalova I.D., Pismenniy D.S., Voronkov N.S. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of adipocyte dysfunction in the metabolic syndrome: prospects for pharmacological correction. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2017, no. 72 (1), pp. 11-16. (In Russ.)]

21. Салихова А.Ф. Иммунологические аспекты патогенеза артериальной гипертензии при метаболическом синдроме // Казанский медицинский журнал, 2014. Т. 95, № 3. С. 322-325. [Salikhova A.F. Immunological aspects of the pathogenesis of arterial hypertension in the metabolic syndrome. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2014, Vol. 95, no. 3, pp. 322-325. (In Russ.)]

22. Сергеева В.В., Родионова А.Ю. Современный подход к оценке артериальной гипертензии в сочетании с метаболическими нарушениями // Артериальная гипертензия, 2013. Т. 19, № 5. С. 397-404. [Sergeeva V.V., Rodionova A.Yu. A modern approach to the assessment of arterial hypertension in combination with metabolic disorders. *Arterialnaya gipertenziya = Arterial Hypertension*, 2013, Vol. 19, no. 5, pp. 397-404. (In Russ.)]

23. Сидельникова Н.С., Якусевич В.В., Петроченко А.С., Тихомирова И.А., Петроченко Е.П. Особенности реологических и микроциркуляторных показателей у пациентов с метаболическим синдромом // Ярославский педагогический вестник, 2012. № 2. С. 91-97. [Sidelnikova N.S., Yakusevich V.V., Petrochenko A.S., Tikhomirova I.A., Petrochenko E.P. Features of rheological and microcirculatory parameters in patients with metabolic syndrome. *Yaroslavskiy pedagogicheskiy vestnik = Yaroslavl Pedagogical Bulletin*, 2012, no. 2, pp. 91-97. (In Russ.)]

24. Сумеркина В.А., Чулков В.С., Ожигина Е.В. Состояние системы гемостаза и цитокиновый профиль у пациентов с метаболическим синдромом // Казанский медицинский журнал, 2015. Т. 96, № 5. С. 728-734. [Sumerkina V.A., Chulkov V.S., Chulkov V.S., Ozhigina E.V. The state of the hemostatic system and the cytokine profile in patients with metabolic syndrome. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2015, Vol. 96, no. 5, pp. 728-734. (In Russ.)]

25. Сумеркина В.А., Головнева Е.С., Телешева Л.Ф. Маркеры дисфункции эндотелия и цитокиновый профиль у пациентов с метаболическим синдромом и абдоминальным ожирением // Клиническая лабораторная диагностика, 2016. Т. 61, № 7. С. 408-412. [Sumerkina V.A., Golovneva E.S., Telesheva L.F. Markers of endothelial dysfunction and the cytokine profile in patients with metabolic syndrome and abdominal obesity. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2016, Vol. 61, no. 7, pp. 408-412. (In Russ.)]

26. Сумеркина В.А., Чулков В.С. Гендерные особенности системы свертывания крови, углеводного и липидного обмена при метаболическом синдроме и изолированном абдоминальном ожирении // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2014. Т. 16, № 5 (4). С. 1422-1426. [Sumerkina V.A.,

Chulkov V.I.S. Gender features of the blood coagulation system, carbohydrate and lipid metabolism in metabolic syndrome and isolated abdominal obesity. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk = Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2014, Vol. 16, no. 5 (4), pp. 1422-1426. (In Russ.)]

27. Тимашева Я.Р. Иммунологические аспекты эссенциальной гипертензии // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 407-418. [Timasheva Ya.R. Immunological aspects of essential hypertension. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 407-418. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-407-418.

28. Феоктистова В.С., Вавилова Т.В., Сироткина О.В., Болдueva С.А., Гайковая Л.Б., Леонова И.А., Ласковец А.Б., Ермаков А.И. Новый подход к оценке дисфункции эндотелия: определение количества циркулирующих эндотелиальных клеток методом проточной цитометрии // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. № 4. С. 23-39. [Feoktistova V.S., Vavilova T.V., Sirotkina O.V., Baldueva S.A., Gaykovaya L.B., Leonova I.A., Laskovets A.B., Ermakov A.I. A new approach to assessing endothelial dysfunction: determining the number of circulating endothelial cells by flow cytometry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, no. 4, pp. 23-39. (In Russ.)]

29. Чазова И.Е., Жернакова Ю.В., Ощепкова Е.В. Распространенность факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний в российской популяции больных артериальной гипертензией // Кардиология, 2014. № 10. С. 4-12. [Chazova I.E., Zhernakova Yu.V., Oshchepkova E.V. The prevalence of risk factors for cardiovascular diseases in the Russian population of patients with arterial hypertension. *Kardiologiya = Cardiology*, 2014, no. 10, pp. 4-12. (In Russ.)]

30. Чазова И.Е., Недогода С.В., Жернакова Ю.В., Сусеков А.В., Медведева И.В., Шестакова М.В. Рекомендации по ведению больных артериальной гипертензией с метаболическими нарушениями // Кардиологический вестник, 2014. Т. 9, № 1. С. 3-57. [Chazova I.E., Nedogoda S.V., Zhernakova Yu.V., Susekov A.V., Medvedeva I.V., Shestakova M.V. Recommendations for the management of patients with arterial hypertension with metabolic disorders. *Kardiologicheskii vestnik = Cardiological Bulletin*, 2014, Vol. 9, no. 1, pp. 3-57. (In Russ.)]

31. Чукаева И.И., Орлова Н.В., Хавка Н.Н., Клепикова М.В. Изучение факторов воспаления у больных с метаболическим синдромом // Лечебное дело, 2010. № 4. С. 50-56. [Chukaeva I.I., Orlova N.V., Khavka N.N., Klepikova M.V. The study of inflammatory factors in patients with metabolic syndrome. *Lechebnoe delo = Medicine*, 2010, no. 4, pp. 50-56. (In Russ.)]

32. Чулков В.С., Сумеркина В.А., Чулков В.С. Оценка взаимосвязи уровней адипокинов, цитокинов, маркеров дисфункции эндотелия и показателей гемостаза с состоянием органов-мишеней при сочетании артериальной гипертензии с абдоминальным ожирением у лиц молодого возраста // In the World of Scientific Discoveries, 2016. № 6 (78). С. 64-79. [Chulkov V.S., Sumerkina V.A., Chulkov V.I.S. Estimation of the relationship of adipokine, cytokine, endothelial dysfunction markers and hemostasis indices with the state of target organs with a combination of arterial hypertension and abdominal obesity in young people. *In the World of Scientific Discoveries*, 2016, no. 6 (78), pp. 64-79. (In Russ.)]

33. Caillon A., Mian M.O.R., Fraulob-Aquino J.C., Huo K.-G., Barhoumi T., Ouerd S., Sinnaeve P.R., Paradis P., Schiffrin E.L.  $\gamma\delta$  T cells mediate angiotensin II-induced hypertension and vascular injury: clinical perspective. *Circulation*, 2017, Vol. 135, no. 22, pp. 2155-2162.

34. Caillon A., Schiffrin E.L. Role of inflammation and immunity in hypertension: Recent epidemiological, laboratory, and clinical evidence. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2016, Vol. 18, no. 3, 21. doi: 10.1007/s11906-016-0628-7.

35. Dinh Q.N., Drummond G.R., Kemp-Harper B.K., Diep H., de Silva T.M., Kim H.A., Sobey C.G. Pressor response to angiotensin II is enhanced in aged mice and associated with inflammation, vasoconstriction and oxidative stress. *Aging*, 2017, Vol. 9, no. 6, pp. 1595-1605.

36. Dzantieva E.O., Khripun I.A., Vorobev S.V., Gusova Z.R., Puzyreva V.P., Ibishev Kh.S., Belousov I.I., Chernyy A.A. Influence of sex hormones on the formation of endothelial dysfunction and cytokine imbalance in men with type 2 diabetes. *Modern Problems of Science and Education*, 2015, no. 6. Available at: <https://science-education.ru/en/article/view?id=23526>.

37. Espeli M., Smith K.G., Clatworthy M.R. Fc $\gamma$ RIIB and autoimmunity. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 269, no. 1, pp. 194-211.

38. Fauchais A.L., Lallou F., Lise M.C., Boumediene A., Preud'homme J.L., Vidal E., Jauberteau M.O. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 5, pp. 3027-3038.

39. Horigome H., Katayama Y., Yoshinaga M., Kato Y., Takahashi H., Sumazaki R. Significant associations among hemostatic parameters, adipokines, and components of the metabolic syndrome in Japanese preschool children. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2012, Vol. 18, no. 2, pp. 189-194.

40. Kobori H., Nangaku M., Navar L.G., Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: From physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol. Rev.*, 2007, Vol. 59, no. 3, pp. 251-287.

41. Krishnan S.M., Ling Y.H., Huuskes B.M., Ferens D.M., Saini N., Chan C.T., Diep H., Kett M.M., Samuel C.S., Kemp-Harper B.K., Robertson A.A.B., Cooper M.A., Peter K., Latz E., Mansell A.S., Sobey C.G., Drummond G.R., Vinh A. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 2019, Vol. 115, no. 4, pp. 776-787.

42. Liu X., Zhang Q., Wu H., Du H., Liu L., Shi H., Wang C., Xia Y., Guo X., Li C., Bao X., Su Q., Sun S., Wang X., Zhou M., Jia Q., Zhao H., Song K., Niu K. Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor of hypertension. *Am. J. Hypertens.*, 2015, Vol. 28, no. 11, pp. 1339-1346.
43. Madhur M.S., Lob H.E., McCann L.A., Iwakura Y., Blinder Y., Guzik T.J., Harrison D.G. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*, 2010, Vol. 55, no. 2, pp. 500-507.
44. Marko L., Kvakan H., Park J.K., Qadri F., Spallek B., Binger K.J., Bowman E.P., Kleinewietfeld M., Fokuhl V., Dechend R., Muller D.N. Interferon-gamma signaling inhibition ameliorates angiotensin II-induced cardiac damage. *Hypertension*, 2012, Vol. 60, no. 6, pp. 1430-1436.
45. Mian M.O., Barhoumi T., Briet M., Paradis P., Schiffrin E.L. Deficiency of t-regulatory cells exaggerates angiotensin II-induced microvascular injury by enhancing immune responses. *J. Hypertens.*, 2016, Vol. 34, no. 1, pp. 97-108.
46. Moore J.P., Vinh A., Tuck K.L., Sakkal S., Krishnan S., Chan C., Lieu M., Samuel C.S., Diep H., Harper B.K., Tare M., Ricardo S.D., Guzik T.J., Sobey C.G., Drummond G.R. M2 macrophage accumulation in the aortic wall during angiotensin II infusion in mice is associated with fibrosis, elastin loss, and elevated blood pressure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2015, Vol. 309, no. 5, pp. 906-917.
47. Norlander A.E., Madhur M.S., Harrison D.G. The immunology of hypertension. *J. Exp. Med.*, 2018, Vol. 215, no. 1, p. 21-33.
48. Norlander A.E., Saleh M.A., Pandey A.K., Itani H.A., Wu J., Xiao L., Kang J., Dale B.L., Goleva S.B., Laroumanie F., Du L., Harrison D.G., Madhur M.S. A salt-sensing kinase in T lymphocytes, SGK1, drives hypertension and hypertensive end-organ damage. *JCI Insight*, 2017, Vol. 2, no. 13, e92801. doi: 10.1172/jci.insight.92801.
49. O'Shea J.J., Paul W.E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4<sup>+</sup> T cells. *Science*, 2010, Vol. 327, no. 5969, pp. 1098-1102.
50. Ozyol A., Yucel O., Ege M.R., Zorlu A., Yilmaz M.B. Microalbuminuria is associated with the severity of coronary artery disease independently of other cardiovascular risk factors. *Angiology*, 2012, Vol. 63, no. 6, pp. 457-460.
51. Rubtsova K., Rubtsov A.V., Cancro M.P., Marrack P. Age-associated B cells: a T-bet-dependent effector with roles in protective and pathogenic immunity. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 5, pp. 1933-1937.
52. Saleh M.A., McMaster W.G., Wu J., Norlander A.E., Funt S.A., Thabet S.R., Kirabo A., Xiao L., Chen W., Itani H.A., Michell D., Huan T., Zhang Y., Takaki S., Titze J., Levy D., Harrison D.G., Madhur M.S. Lymphocyte adaptor protein LNK deficiency exacerbates hypertension and end-organ inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2015, Vol. 125, no. 3, pp. 1189-1202.
53. Selvaraj U.M., Poinssat K., Torres V. Heterogeneity of B cell functions in stroke-related risk, prevention, injury, and repair. *Neurotherapeutics*, 2016, Vol. 13, Iss. 4, pp. 729-747.
54. Singh M.V., Chappleau M.W., Harwani S.C., Abboud F.M. The immune system and hypertension. *Immunol. Res.*, 2014, Vol. 59, no. 1-3, pp. 243-253.
55. Slarma S., Ghalaut V.S., Dixit R., Kumar S., George P.J. Microalbuminuria and C-reactive protein as a predictor of coronary artery disease in patient of acute chest pain. *J. Cardiovasc. Dis. Res.*, 2013, Vol. 4, no. 1, pp. 37-39.
56. Vargas K.G., Kassem M., Mueller C., Wojta J., Huber K. Copeptin for the early rule-out of non-ST-elevation myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.*, 2016, no. 23, Vol. 223, pp. 797-804.
57. Winer D.A., Winer S., Chng M.H., Shen L., Engleman E.G. B Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014, Vol. 71, no. 6, pp. 1033-1043.

**Авторы:**

**Полозова Э.И.** — д.м.н., доцент, профессор кафедры госпитальной терапии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

**Пузанова Е.В.** — аспирант кафедры госпитальной терапии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

**Сескина А.А.** — аспирант кафедры госпитальной терапии, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия

**Authors:**

**Polozova E.I.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Hospital Therapy, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

**Puzanova E.V.**, Postgraduate Student, Department of Hospital Therapy, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

**Seskina A.A.**, Postgraduate Student, Department of Hospital Therapy, Ogarev Mordovia State University, Saransk, Republic of Mordovia, Russian Federation

Поступила 04.11.2019  
Отправлена на доработку 04.01.2020  
Принята к печати 29.01.2020

Received 04.11.2019  
Revision received 04.01.2020  
Accepted 29.01.2020

## ВЛИЯНИЕ ДЕПРИВАЦИИ VEGF НА ОБРАЗОВАНИЕ СОСУДОВ ЭНДОТЕЛИЕМ В ПРИСУТСТВИИ МАКРОФАГОВ

Козырева А.Р.<sup>1</sup>, Львова Т.Ю.<sup>1</sup>, Маркова К.Л.<sup>1</sup>, Симбирцев А.С.<sup>2,3</sup>,  
Ищенко А.М.<sup>3</sup>, Сельков С.А.<sup>1,2</sup>, Соколов Д.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Развитие ангиогенеза зависит от функционального состояния эндотелиальных клеток, а также от сбалансированной секреции цитокинов, факторов роста и хемокинов эндотелиальными клетками и клетками микроокружения. Макрофаги являются важнейшим компонентом микроокружения и принимают участие в формировании сосудов как за счет продукции цитокинов, так и за счет контактных взаимодействий с эндотелиальными клетками. Одним из важнейших цитокинов, осуществляющих контроль ангиогенеза на всех его этапах, является VEGF. В настоящее время недостаточно изучена роль VEGF в межклеточных взаимодействиях эндотелиальных клеток и макрофагов.

Целью исследования явилось изучение влияния депривации VEGF при помощи моноклональных антител на ангиогенез в условиях совместного культивирования эндотелия и макрофагов.

Для депривации VEGF использовали моноклональные антитела к VEGF-A в монокультуре эндотелиальных клеток и в сокультуре эндотелиальных клеток с макрофагами. В качестве индукторов использовали цитокины IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$ . При удалении VEGF-A из среды эндотелиальные клетки проявляют пластичность и формируют более длинные сосуды, изменяют экспрессию рецепторов к VEGF. Макрофаги играют роль регулятора активности эндотелиальных клеток за счет секреции цитокинов, в том числе VEGF, а также благодаря контактным взаимодействиям с эндотелиальными клетками. Клетки линии THP-1 повышают чувствительность эндотелиальных клеток к VEGF за счет стимуляции экспрессии VEGFR1 и VEGFR3, данный эффект является VEGF-A-независимым. Цитокины IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  самостоятельно стимулируют неразветвляющийся ангиогенез, увеличивая длину сосудов. Параллельно IL-1 $\beta$  увеличивает экспрессию VEGFR1 на поверхности эндотелиальных клеток, а IL-6 и TNF $\alpha$ , наоборот, снижают ее, тем самым регулируя чувствительность эндотелиальных клеток к VEGF. При этом эффекты данных цитокинов не зависят от VEGF-A. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  способствуют приобретению клетками линии THP-1 антиангиогенных свойств, что не зависит от VEGF-A, а также от экспрессии его рецепторов эндотелиальными клетками. Таким образом, VEGF-A является важным, но не единственным фактором, контролирующим ангиогенез. В условиях

### 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 (812) 323-75-45, 328-98-50.  
Факс: 8 (812) 323-75-45.  
E-mail: falcojugger@yandex.ru

### Address for correspondence:

Sokolov Dmitry I.  
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology  
199034, Russian Federation, St. Petersburg,  
Mendeleevskaya line, 3.  
Phone: 7 (812) 323-75-45, 328-98-50.  
Fax: 7 (812) 323-75-45.  
E-mail: falcojugger@yandex.ru

### Образец цитирования:

А.Р. Козырева, Т.Ю. Львова, К.Л. Маркова, А.С. Симбирцев, А.М. Ищенко, С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Влияние депривации VEGF на образование сосудов эндотелием в присутствии макрофагов» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 231-248. doi: 10.15789/1563-0625-IOV-1894  
© Козырева А.Р. и соавт., 2020

### For citation:

A.R. Kozyreva, T.Yu. Lvova, K.L. Markova, A.S. Simbirtsev, A.M. Ischenko, S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Influence of VEGF deprivation upon vascular formation by endothelium in the presence of macrophages", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 231-248. doi: 10.15789/1563-0625-IOV-1894  
DOI: 10.15789/1563-0625-IOV-1894

недостатка VEGF-A либо сами эндотелиальные клетки, либо клетки микроокружения способны компенсировать его функциональную нагрузку за счет продукции других ростовых факторов.

*Ключевые слова:* эндотелиальные клетки, ангиогенез, цитокины, VEGF, макрофаги, моноциты

## INFLUENCE OF VEGF DEPRIVATION UPON VASCULAR FORMATION BY ENDOTHELIUM IN THE PRESENCE OF MACROPHAGES

Kozyreva A.R.<sup>a</sup>, Lvova T.Yu.<sup>a</sup>, Markova K.L.<sup>a</sup>, Simbirtsev A.S.<sup>b, c</sup>,  
Ischenko A.M.<sup>c</sup>, Selkov S.A.<sup>a, b</sup>, Sokolov D.I.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Development of angiogenesis depends on the functional state of endothelial cells, as well as on the balanced secretion of cytokines, growth factors and chemokines by endothelial cells and cells of microenvironment. Macrophages represent an essential component of the microenvironment and take part in the formation of blood vessels both due to the production of cytokines and due to contact interactions with endothelial cells. VEGF is among the most important cytokines that control angiogenesis at all its stages. Currently, the role of VEGF in the intercellular interactions of endothelial cells and macrophages is not well described. The aim of our study was to investigate the effect of VEGF deprivation using monoclonal antibodies on angiogenesis under conditions of co-cultivation of endothelium and macrophages. Materials and methods: monoclonal antibodies to VEGF-A were used for VEGF deprivation in monoculture of endothelial cells and in co-culture of endothelial cells with macrophages. The IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  cytokines were used as inducers. When VEGF-A was removed from the medium, endothelial cells show plasticity and form longer vessels, they modify the expression of VEGF receptors. Macrophages regulate endothelial cell activity through the secretion of cytokines, including VEGF, and through contact interactions with endothelial cells. THP-1 cells increase the sensitivity of endothelial cells to VEGF by stimulating the VEGFR1 and VEGFR3 expression, this effect is VEGF-A-independent. The IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  cytokines independently stimulate non-branching angiogenesis, increasing the length of the vessels. At the same time, IL-1 $\beta$  increases the VEGFR1 expression on the surface of endothelial cells. In contrast, IL-6 and TNF $\alpha$  decrease it, thereby regulating the sensitivity of endothelial cells to VEGF. The effects of these cytokines are not dependent on VEGF-A. The IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  cytokines promote acquisition of anti-angiogenic properties by THP-1 cells that is independent on VEGF-A, as well as on expression of its receptors by endothelial cells. Thus, VEGF is an important, but not the sole factor controlling angiogenesis. Under conditions of VEGF-A deficiency, either endothelial cells or microenvironment cells are able to compensate for its functional load due to the production of other growth factors.

*Keywords:* endothelial cells, angiogenesis, cytokines, VEGF, macrophages, monocytes

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-15-01230 «Молекулярно-генетические механизмы регуляции ангиогенеза» и бюджетного финансирования по теме НИР № АААА-А19-119021290116-1.

### Введение

Ключевым процессом, необходимым для физиологического формирования и адекватного функционирования тканей и органов, является

ангиогенез. Ангиогенез — многоэтапный процесс образования новых кровеносных сосудов из уже существующих. Выделяют следующие этапы ангиогенеза: разрушение внеклеточного матрикса, миграция эндотелиальных клеток (ЭК), пролиферация ЭК, формирование ЭК новой капиллярной трубки, восстановление базальной мембраны [1, 10, 36]. В физиологических условиях ангиогенез встречается во время эмбриогенеза, а также в постнатальном периоде — при заживлении ран и при циклических изменениях в ре-

продуктивной системе женщин. Существенный вклад процессы ангиогенеза вносят в развитие различных патологических состояний, таких как канцерогенез, эндометриоз, атеросклероз, заболевания с выраженным хроническим воспалением [36]. Как при физиологическом состоянии, так и в условиях воспалительного процесса ключевую роль в ангиогенезе отводят макрофагам (Мф) [31, 38, 40, 49]. Контроль ангиогенеза Мф основан на продукции клетками провоспалительных (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$ ) и противовоспалительных цитокинов (IL-10), а также факторов роста (VEGF, TGF- $\beta$ , G-CSF, GM-CSF), которые влияют на функции ЭК (миграция, пролиферация, дифференцировка) и их жизнеспособность, а также на клетки микроокружения, опосредованно влияющие на эндотелий [49]. Преимущественная секреция провоспалительных или противовоспалительных цитокинов Мф зависит от того, какой функциональный тип (M1 или M2) приобретет нативный Мф в зависимости от стимулов микроокружения. Так, липополисахарид в сочетании с IFN $\gamma$  индуцирует макрофаг M1-типа, характеризуется преимущественной продукцией провоспалительных цитокинов Th1-типа и отвечает за реализацию воспаления. Активация клеток IL-4/IL-13 индуцирует альтернативно активированные макрофаги M2-типа, секретирующие цитокины Th2-типа и участвующие в регуляции ангиогенеза, репарации и ремоделировании ткани, удалении апоптотических телец [28, 54]. Ангиогенный фенотип Мф не до конца охарактеризован, однако показано, что ангиогенную активность проявляют только активированные моноциты и Мф [49]. Наряду с секрецией цитокинов Мф секретируют ряд металлопротеаз, разрушающих внеклеточный матрикс и высвобождающих фрагменты экстрацеллюлярного матрикса и ростовые факторы, способные влиять на ангиогенез [49]. Макрофаги контролируют ветвление сосудов при ангиогенезе за счет взаимодействия с ЭК, выступая в роли мостика, связывающего соседние ЭК [42]. Таким образом, Мф могут влиять на все стадии ангиогенеза, при этом характер влияния макрофагов на процессы ангиогенеза в значительной степени определяется действием цитокинов микроокружения.

Наиболее важным фактором развития сосудистой сети и ее поддержания является VEGF. Хотя многие молекулы участвуют в ангиогенезе, VEGF занимает особое положение, поскольку оказывает прямое митогенное действие на ЭК и является ключевым регулятором как физиологического, так и патологического ангиогенеза [53]. Семейство ростовых факторов VEGF включает в себя изоформы VEGF-A, VEGF-B,

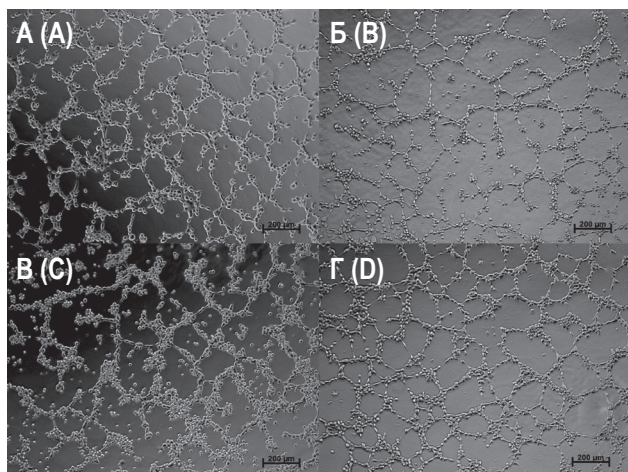
VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и PLGF. Данные изоформы фактора роста эндотелия сосудов являются лигандами для соответствующих рецепторов: VEGF-A, VEGF-B и PLGF взаимодействуют с VEGF-R1, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E — с VEGF-R2, VEGF-C, VEGF-D — с VEGF-R3. VEGF играет важнейшую роль в таких процессах, как деградация базальной мембраны ЭК и внеклеточного матрикса, пролиферация ЭК, формирование капилляров, синтез новой базальной мембраны. Таким образом, VEGF оказывается вовлечен во все этапы ангиогенеза [39, 46]. Изоформа VEGF-A существует в виде 4 различных подтипов: VEGF121, VEGF165, VEGF189 и VEGF206 [51] и считается первым ростовым фактором, характерным именно для ЭК, который появляется в ходе эмбрионального развития. Некоторые авторы выделяют формы VEGF145 и VEGF183 [1]. Именно VEGF-A является ключевой молекулой, индуцирующей васкулогенез и ангиогенез [39]. VEGF-A был открыт как фактор проницаемости сосудов, затем была показана его роль в пролиферации, миграции, прорастании сосудов и формировании трубок сосудов [13, 39]. Сильнейшим стимулом, вызывающим секрецию VEGF, является гипоксия. В условиях гипоксии HIF-1 связывается с промоторным участком гена VEGF и усиливает транскрипцию с данного участка, обеспечивая повышение синтеза VEGF [39]. Индукторами продукции VEGF также могут служить некоторые гормоны, факторы роста и оксид азота. Кроме ЭК, VEGF экспрессируется другими типами клеток, такими как ГМК сосудов, нейтрофилы, моноциты и макрофаги, кератиноциты, фибробласты и остеобласты, а также синтезируется желтым телом, тканями плаценты и фетальными тканями [39].

В настоящее время недостаточно изучена роль VEGF-A в межклеточных взаимодействиях интактных и активированных цитокинами ЭК и макрофагов. В связи с этим **целью исследования** явилось изучение влияния депривации VEGF при помощи моноклональных антител на ангиогенез в условиях совместного культивирования эндотелия и макрофагов.

## Материалы и методы

### Клетки

Использовали эндотелиальные клетки линии EA.Hy926, любезно предоставленные Dr. C.J. Edgel (Университет Северной Каролины, США). Они воспроизводят все основные характеристики ЭК [23]. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина, 8 ммоль/л L-глутамин, НАТ (Sigma, США). Пересев производили 1 раз в 3-4 дня, вызывая дезинтеграцию



**Рисунок 1. Формирование сосудов ЭК линии EA.Hy926**

**Примечание.** А – сосуды, образованные интактными ЭК при монокультивировании в среде, 2,5% ЭТС. Б – при монокультивировании в среде, 2,5% ЭТС, в присутствии bFGF (20 нг/мл). В – в среде, 2,5% ЭТС, в присутствии клеток линии ТНР-1. Г – при монокультивировании в среде, 2,5% ЭТС, в присутствии препарата «Авастин». Увеличение  $\times 100$ , фазовый контраст.

Figure 1. Formation of Tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line

Note. A, tube-like structures formed by intact EC in the presence of 2.5% FBS. B, monoculture, in the presence of 2.5% FBS and bFGF (20 ng/ml). C, in the presence of 2.5% FBS and THP-1 cells. D, monoculture, in the presence of 2.5% FBS and the drug Avastin. Phase contrast,  $\times 100$ .

монослоя 5-минутной экспозицией в растворе версена (Биолот, Россия). В работе использовали клетки линии ТНР-1, полученные из периферической крови человека с острой моноцитарной лейкемией. Клетки линии ТНР-1 культивировали в среде RPMI-1640, 10% ЭТС, 50 мкг/мл пенициллина, 2 мМ L-глутамин (Sigma, США). Культивирование клеток линии ТНР-1 на различных компонентах экстрацеллюлярного матрикса (коллаген I и IV типа, фибронектин) приводит к изменению их фенотипических и функциональных характеристик, ассоциированных с дифференцировкой в Мф (продукции матриксных металлопротеиназ (ММР), снижению экспрессии CD14 и повышению экспрессии CD71, изменению фагоцитирующей способности, изменению в активности миелопероксидазы (МРО) и  $\beta$ -D-глюкуронидазы) [21, 55]. Наличие в трехмерном матриксе «Матригель» коллагена IV типа предполагает сходные изменения фенотипических и функциональных характеристик клеток линии ТНР-1. Все клеточные линии и эксперименты с ними проводили в инкубаторе во влажной атмосфере при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи рас-

твора трипанового синего, при этом она составляла не менее 96%.

#### Цитокины и препараты

Для активации клеток использовали препараты рекомбинантных человеческих цитокинов: 10 ед/мл TNF $\alpha$  («Рефнолин», 1 ед = 0,06 нг; «Фермент», Sanitas, Литва), 10 ед/мл IL-1 $\beta$  (рекомбинантный IL-1 $\beta$ , 1 ед = 0,01 нг; производства ФГУП Гос. НИИОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия), 4 нг/мл IL-6 (RD, США). Приведенные концентрации были выбраны на основании данных, полученных ранее [24, 26]. В работе использовали препарат «Авастин» («Бевацизумаб», Roche, Швейцария) — гуманизированные рекомбинантные гиперхимерные моноклональные антитела к VEGF, ингибирующие его связывание с VEGFR1 и VEGFR2 на поверхности ЭК. Предварительные эксперименты показали, что культивирование ЭК на матриксе «Матригель» (BD, США) в присутствии препарата «Авастин» в концентрациях 5 нМ, 500 нМ, 5000 нМ приводило к увеличению длины капилляроподобных структур (далее в тексте статьи — сосудов), образуемых ЭК. Для проведения всех дальнейших экспериментов была выбрана концентрация препарата «Авастин» 5000 нМ, поскольку в монокультуре ЭК в этой концентрации были выявлены наибольшие изменения длины сосудов по сравнению с монокультурой интактных ЭК.

Для оценки влияния цитокинов на формирование сосудов ЭК в присутствии моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 и препарата «Авастин» лунки 24-луночного планшета предварительно обрабатывали матриксом Matrigel Growth Factors Reduced («Матригель») (Becton Dickinson, США) с пониженным содержанием ростовых факторов. Данный матрикс представляет собой смесь белков внеклеточного матрикса, таких как ламинин и коллаген IV типа, а также содержит TGF- $\beta$ , EGF, IGF, bFGF, PA в минорных количествах. «Матригель» является продуктом секреции клеток саркомы мыши линии Engelbreth-Holm-Swarm [20]. В лунки с матриксом вносили ЭК линии EA.Hy926 в концентрации 150 000 клеток в лунку в 1 мл. В часть лунок добавляли клетки линии ТНР-1 в концентрации 250 000 клеток в лунку в 1 мл, цитокины и препарат «Авастин». Затем культивировали в полной культуральной среде с 2,5% ЭТС без добавления НАТ в течение 24 часов при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе. В качестве контроля инкубировали клетки в среде с 2,5% ЭТС, в качестве положительного контроля — в среде с 2,5% ЭТС и 20 нг/мл bFGF. Установлено, что bFGF увеличивал длину

( $76,06 \pm 0,61$  мкм) сосудов, образованных ЭК линии EA.Hy926, по сравнению с интактными ЭК при их монокультивировании ( $63,13 \pm 0,34$  мкм,  $p < 0,001$ ) (рис. 1). Все эксперименты проводили трижды, для каждого индуктора внутри эксперимента использовали по три лунки. При помощи микроскопа AxioObserver.Z1 (Zeiss, Германия) и компьютерной системы анализа изображений ImagePro 6.0 измеряли длину сосудов, образованных ЭК (рис. 1), а также подсчитывали их количество. В каждой лунке производили учет 5 полей зрения.

Для оценки экспрессии рецепторов VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 на эндотелиальных клетках в условиях их совместного культивирования с макрофагами на матриксе «Матригель» в присутствии цитокинов и препарата «Авастин» проводили совместное культивирование ЭК и THP-1 согласно методу, описанному выше. Затем дезинтегрировали матрикс «Матригель» при помощи Cell Recovery Solution (Corning, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для блокировки Fc-рецепторов использовали Fc-blocking reagent (Miltenyi Biotec, США) в соответствии с указаниями производителя. Клетки обрабатывали антителами против CD45 (PerCP) (BD, США), VEGFR1 (PE), VEGFR2 (FITC), VEGFR3 (APC) (RD, США) в соответствии с рекомендациями производителя. В работе использованы соответствующие изотипические контроли. Затем измеряли интенсивность флуоресценции на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки).

Статистический анализ проводили при помощи программы STATISTICA 10. Для оценки влияния цитокинов на формирование сосудов ЭК в присутствии клеток линии THP-1 и препарата «Авастин», а также для оценки уровня экспрессии рецепторов VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 на ЭК в условиях их совместного культивирования с Мф на трехмерном матриксе «Матригель» использовали t-критерий Стьюдента. Проверку нормальности распределения проводили при помощи теста Шапиро–Уилка. Данные выражали в виде  $M \pm m$ .

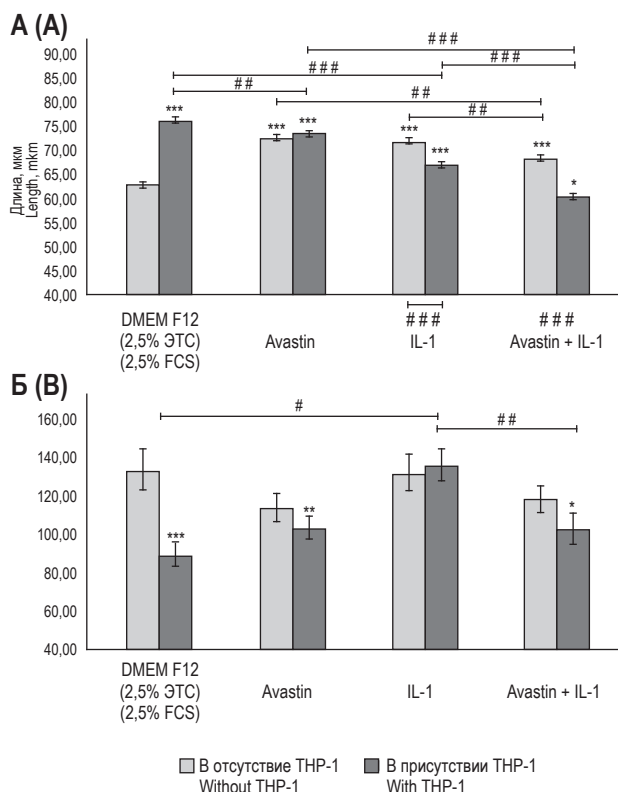
## Результаты

При совместном культивировании клеток линии THP-1 с ЭК линии EA.Hy926 длина сосудов, образованных ЭК, была больше, а их количество — меньше, по сравнению с таковыми в отсутствие клеток линии THP-1 (рис. 3). Установлено, что после культивирования на матриксе «Матригель» ЭК экспрессировали VEGFR1 и VEGFR3, но не VEGFR2. Установлено, что bFGF не влиял

на экспрессию VEGFR1 и VEGFR3 на поверхности ЭК (рис. 4). В сокультуре ЭК и THP-1 экспрессия VEGFR1 и VEGFR3 ЭК линии EA.Hy926 была выше, чем в монокультуре. Длина сосудов, образованных в монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин», была больше по сравнению с таковой у интактных ЭК. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» наблюдали увеличение длины сосудов по сравнению с монокультурой интактных ЭК. При этом препарат «Авастин» уменьшал длину сосудов в присутствии THP-1 по сравнению с культивированием в тех же условиях, но в отсутствие препарата «Авастин». Количество образованных сосудов было меньше в сокультуре ЭК и THP-1 как в отсутствие, так и в присутствии препарата «Авастин» по сравнению с интактной монокультурой ЭК (рис. 3).

В сокультуре ЭК и THP-1 количество VEGFR1<sup>+</sup> и VEGFR3<sup>+</sup> ЭК, а также интенсивность экспрессии ими VEGFR1 и VEGFR3 были больше по сравнению с монокультурой интактных ЭК. Эти изменения не зависели от присутствия или отсутствия препарата «Авастин» (рис. 5). В монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» наблюдали снижение интенсивности экспрессии VEGFR3 по сравнению с таковой в монокультуре интактных ЭК. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» относительное количество VEGFR3<sup>+</sup> ЭК, а также интенсивность экспрессии ими VEGFR3 были выше по сравнению с монокультурой интактных ЭК и по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии препарата «Авастин» (рис. 5).

В монокультуре ЭК в присутствии IL-1 $\beta$  отмечено увеличение длины сосудов по сравнению с интактными клетками. При одновременном добавлении к монокультуре препарата «Авастин» и IL-1 $\beta$  длина сосудов также была больше по сравнению со спонтанным уровнем, но меньше по сравнению с длиной сосудов в присутствии только препарата «Авастин» или по сравнению с культивированием ЭК в присутствии только IL-1 $\beta$  (рис. 3). Относительное количество VEGFR1<sup>+</sup> ЭК, а также интенсивность экспрессии VEGFR1 в монокультуре ЭК в присутствии IL-1 $\beta$  были выше по сравнению с интактными клетками. Относительное количество VEGFR1<sup>+</sup> ЭК и интенсивность экспрессии VEGFR1 в монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и IL-1 $\beta$  также были выше по сравнению с таковыми в монокультуре интактных ЭК; но при этом интенсивность экспрессии VEGFR1 на ЭК была выше, чем в присутствии только препарата «Авастин» (рис. 5).



**Рисунок 3. Влияние IL-1β на формирование сосудов ЭК линии EA.Hy926 в присутствии клеток линии THP-1 и препарата «Авастин»**

**Примечание.** А – влияние на длину сосудов. Б – влияние на количество сосудов. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТС, спонтанный уровень, n = 45; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин», n = 45; IL-1 – культивирование в присутствии IL-1β, n = 15; Avastin + IL-1 – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β, n = 15. Достоверность различий: \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01; \*\*\* – p < 0,001 (отличается от уровня при монокультивировании интактных ЭК); # – p < 0,05; ## – p < 0,01; ### – p < 0,001.

Figure 3. Effect of IL-1β on the formation of tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the presence of THP-1 cells and the drug Avastin

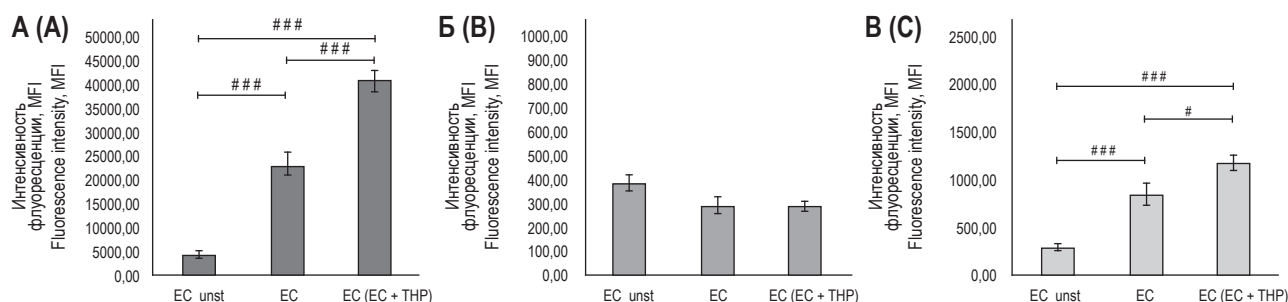
Note. A, the effect on the length of tube-like structures. B, the effect on the number of tube-like structures. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level), n = 45; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin, n = 45; IL-1, cultivation in the presence of IL-1β, n = 15; Avastin + IL-1, cultivation in the presence of the drug Avastin and IL-1β, n = 15. The significance of differences between groups: \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001 (differs from the spontaneous level); #, p < 0.05; ##, p < 0.01; ###, p < 0.001.

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β отмечено увеличение длины сосудов по сравнению с таковой в монокультуре интактных ЭК и в то же время снижение длины сосудов по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в отсутствие индукторов. Длина сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β была ниже по срав-

нению с монокультурой ЭК в присутствии IL-1β. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β наблюдали уменьшение длины сосудов по сравнению с таковой в монокультуре интактных ЭК, а также по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» или по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 с добавлением IL-1β. Отмечено уменьшение длины сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β, по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии тех же индукторов (рис. 3). Количество сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β было больше по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в отсутствие индукторов. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β количество сосудов было меньше по сравнению с монокультурой интактных ЭК и по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β (рис. 3).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β количество VEGFR1<sup>+</sup> ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR1 были выше по сравнению с монокультурой интактных или активированных IL-1β ЭК. При этом в данных условиях количество VEGFR1<sup>+</sup> ЭК было больше по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в отсутствие индукторов. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β количество VEGFR1<sup>+</sup> ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR1 были выше по сравнению с монокультурой интактных ЭК, а также по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии тех же индукторов, по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в отсутствие индукторов, по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» (рис. 5).

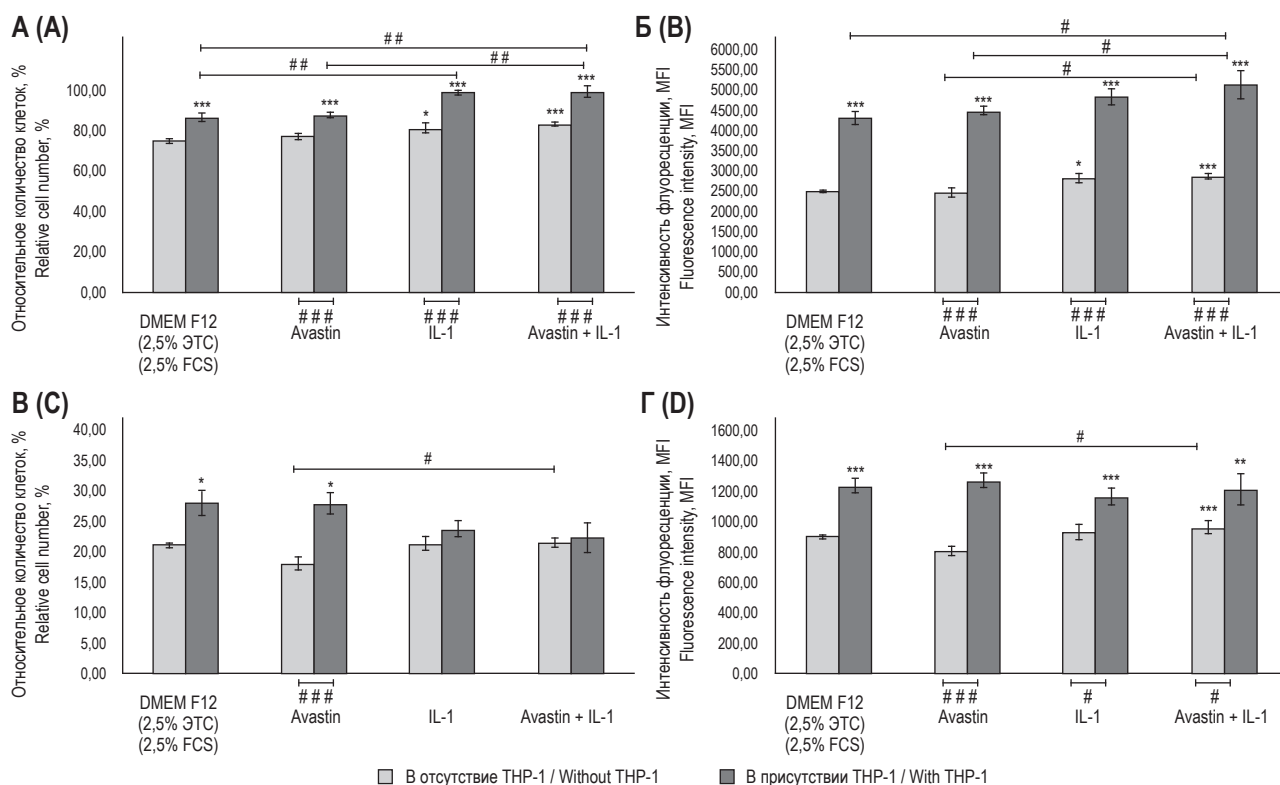
В монокультуре ЭК в присутствии IL-1β количество VEGFR3<sup>+</sup> ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 не изменялись по сравнению с интактной монокультурой. Однако количество VEGFR3<sup>+</sup> ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 в монокультуре в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β оказались больше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии только препарата «Авастин» (рис. 5). В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β интенсивность экспрессии VEGFR3 на ЭК была выше по сравнению с монокультурой интактных ЭК, а также по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии IL-1β. При добавлении препарата «Авастин» и IL-1β в сокультуру ЭК и THP-1 интенсивность экспрессии VEGFR3 на ЭК была выше по сравнению с монокультивированием интактных ЭК,



**Рисунок 4. Экспрессия рецепторов фактора роста эндотелия сосудов на эндотелиальных клетках линии EA.Hy926**

**Примечание.** А – экспрессия VEGFR1. Б – VEGFR2. В – VEGFR3. EC\_unst – неокрашенные ЭК, n = 8; EC – ЭК, меченные антителами с флуоресцентной меткой к соответствующему рецептору, n = 8; EC (EC + THP) – ЭК после совместного культивирования с клетками линии THP-1, меченные антителами с флуоресцентной меткой к соответствующему рецептору, n = 16. Достоверность различий: # – p < 0,05; ### – p < 0,001.

Figure 4. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on the surface of endothelial cells of the EA.Hy926 cell line  
Note. A, the expression of VEGFR1. B, VEGFR2. C, VEGFR3. EC\_unst, untreated EC, n = 8; EC, EC treated with antibodies with a fluorescent label to the corresponding receptor, n = 8; EC (EC + THP), EC after co-culture with THP-1 cells, treated with antibodies with a fluorescent label to the corresponding receptor, n = 16. The significance of differences: #, p < 0.05; ###, p < 0.001.

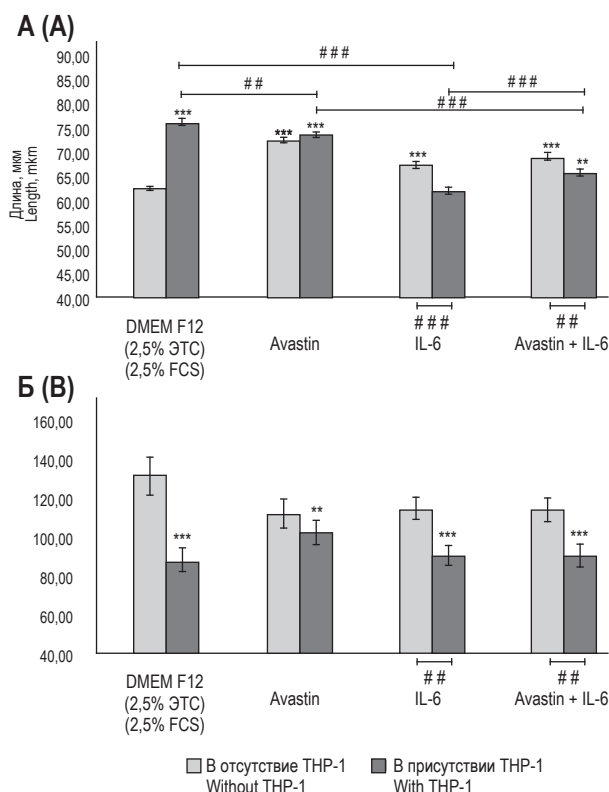


**Рисунок 5. Влияние IL-1β на экспрессию VEGFR1 и VEGFR3 эндотелиальными клетками в условиях их совместного культивирования с клетками линии THP-1**

**Примечание.** А, Б – экспрессия VEGFR1. В, Г – экспрессия VEGFR3. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТС, спонтанный уровень, n = 16; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин», n = 24; IL-1 – культивирование в присутствии IL-1β, n = 6; Avastin + IL-1 – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β, n = 6. Достоверность различий: \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01, \*\*\* – p < 0,001 (отличается от уровня при монокультивировании интактных ЭК); # – p < 0,05; ## – p < 0,01; ### – p < 0,001.

Figure 5. Effect of IL-1β on the expression of VEGFR1 and VEGFR3 by endothelial cells under conditions of their co-cultivation with THP-1 cells

Note. A, B, the expression of VEGFR1. C, D, the expression of VEGFR3. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level), n = 16; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin, n = 24; IL-1, cultivation in the presence of IL-1β, n = 6; Avastin + IL-1, cultivation in the presence of the drug Avastin and IL-1β, n = 6. The significance of differences between groups: \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001 (differs from the spontaneous level); #, p < 0.05; ##, p < 0.01; ###, p < 0.001.



**Рисунок 6. Влияние IL-6 на формирование сосудов ЭК линии EA.Hy926 в присутствии клеток линии THP-1 и препарата «Авастин»**

**Примечание.** А – влияние на длину сосудов. Б – влияние на количество сосудов. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТС, спонтанный уровень, n = 45; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин», n = 30 (в отсутствие клеток линии THP-1), n = 45 (в присутствии клеток линии THP-1); IL-6 – культивирование в присутствии IL-6, n = 15; Avastin + IL-6 – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и IL-6, n = 15. Достоверность различий: \*\* – p < 0,01; \*\*\* – p < 0,001 (отличается от уровня при монокультивировании интактных ЭК); ## – p < 0,01; ### – p < 0,001.

Figure 6. Effect of IL-6 on the formation of tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the presence of THP-1 cells and the drug Avastin

Note. A, the effect on the length of tube-like structures. B, the effect on the number of tube-like structures. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level), n = 45; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin, n = 30 (in the absence of THP-1 cells), n = 45 (in the presence of THP-1 cells); IL-6, cultivation in the presence of IL-6, n = 15; Avastin + IL-6, cultivation in the presence of the drug Avastin and IL-6, n = 15. The significance of differences between groups: \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001 (differs from the spontaneous level); ##, p < 0.01; ###, p < 0.001.

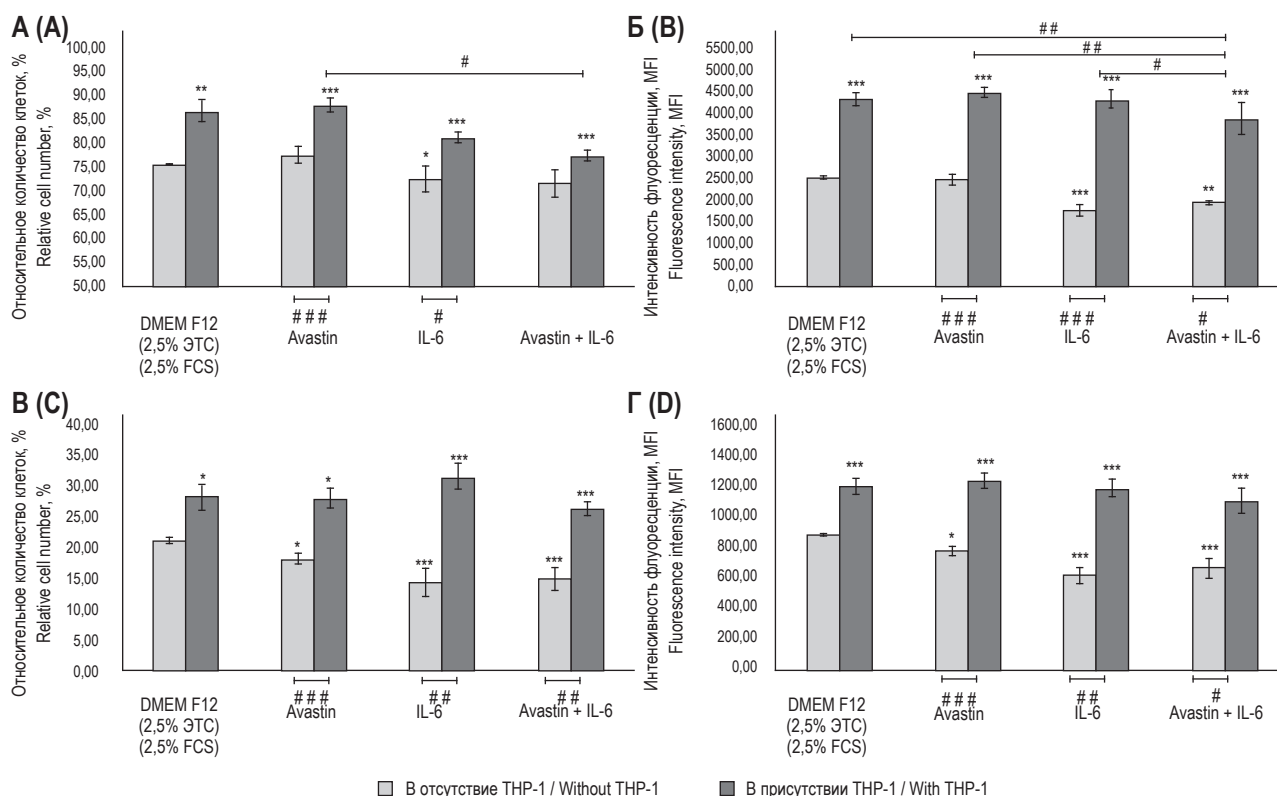
а также по сравнению с монокультивированием ЭК в присутствии тех же индукторов (рис. 5).

В монокультуре ЭК в присутствии IL-6 было отмечено увеличение длины сосудов по сравнению с монокультурой интактных ЭК. Длина сосудов в монокультуре ЭК в присутствии препара-

та «Авастин» и IL-6 была больше по сравнению с таковой в монокультуре интактных ЭК (рис. 6). В монокультуре ЭК в присутствии IL-6, а также в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 интенсивность экспрессии VEGFR1 ЭК была ниже по сравнению с монокультурой интактных ЭК (рис. 7). Количество VEGFR3<sup>+</sup> ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 в монокультуре ЭК в присутствии IL-6, а также в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 были меньше по сравнению с таковыми в монокультуре интактных ЭК (рис. 7).

Длина сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-6 была меньше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии IL-6 и по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в отсутствие индукторов. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 было отмечено увеличение длины сосудов по сравнению со спонтанным уровнем без индукторов. В этих условиях длина сосудов была меньше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии препарата «Авастин» и IL-6. Длина сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 была больше по сравнению с сокультурой в присутствии только IL-6 и меньше по сравнению с сокультурой в присутствии только препарата «Авастин» (рис. 6). Количество сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-6 было меньше по сравнению с таковым в монокультуре интактных ЭК или активированных IL-6 ЭК. Снижение количества сосудов по сравнению с таковым в монокультуре интактных ЭК также было отмечено в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-6. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 количество сосудов было меньше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии тех же индукторов (рис. 6).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-6 количество VEGFR1<sup>+</sup> ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR1 были больше по сравнению с монокультурой интактных или активированных IL-6 ЭК. При добавлении препарата «Авастин» и IL-6 в сокультуру ЭК и THP-1 количество VEGFR1<sup>+</sup> ЭК было больше по сравнению с монокультурой интактных ЭК и меньше по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в присутствии только препарата «Авастин». В сокультуре интенсивность экспрессии VEGFR1 на ЭК была выше по сравнению с таковой в монокультуре интактных ЭК и по сравнению с монокультурой в присутствии тех же индукторов. В сокультуре интенсивность экспрессии VEGFR1 на ЭК была ниже по сравнению с таковой в сокультуре



**Рисунок 7. Влияние IL-6 на экспрессию VEGFR1 и VEGFR3 эндотелиальными клетками в условиях их совместного культивирования с клетками линии THP-1**

**Примечание.** А, Б – экспрессия VEGFR1. В, Г – экспрессия VEGFR3. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТС, спонтанный уровень, n = 16; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин», n = 24; IL-6 – культивирование в присутствии IL-6, n = 3; Avastin + IL-6 – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и IL-6, n = 3. Достоверность различий: \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01, \*\*\* – p < 0,001 (отличается от уровня при монокультивировании интактных ЭК); # – p < 0,05; ## – p < 0,01; ### – p < 0,001.

Figure 7. Effect of IL-6 on the expression of VEGFR1 and VEGFR3 by endothelial cells under conditions of co-cultivation with THP-1 cells

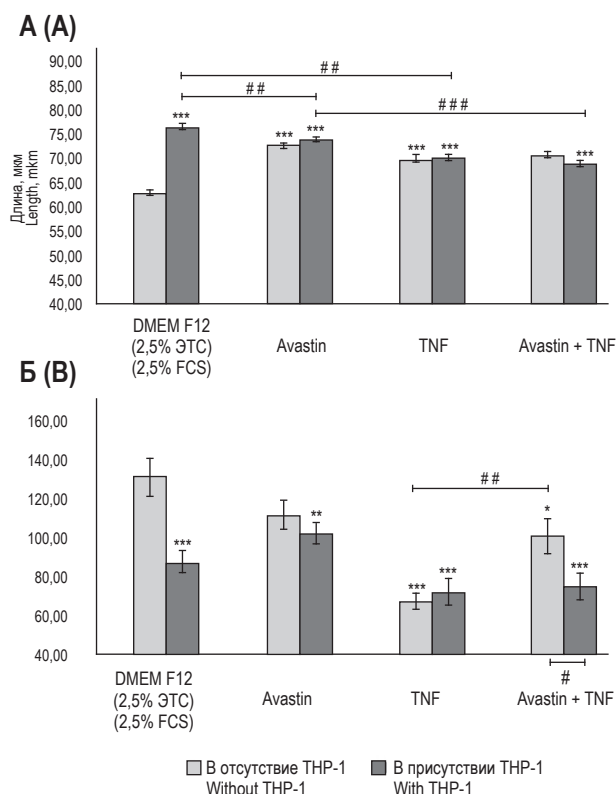
Note. A, B, the expression of VEGFR1. C, D, the expression of VEGFR3. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level), n = 16; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin, n = 24; IL-6, cultivation in the presence of IL-6, n = 3; Avastin + IL-6, cultivation in the presence of the drug Avastin and IL-6, n = 3. The significance of differences between groups: \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001 (differs from the spontaneous level); #, p < 0.05; ##, p < 0.01; ###, p < 0.001.

в отсутствие индукторов, в присутствии только препарата «Авастин» или в присутствии только IL-6 (рис. 7).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-6 количество VEGFR3<sup>+</sup> ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 были выше по сравнению с монокультурой интактных или активированных IL-6 ЭК. Также в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 количество VEGFR3<sup>+</sup> ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 были выше по сравнению с монокультурой интактных или активированных теми же индукторами ЭК (рис. 7).

Длина сосудов в монокультуре ЭК в присутствии TNFα была больше по сравнению с интактной монокультурой ЭК. В монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и TNFα от-

мечено увеличение длины сосудов по сравнению с монокультурой интактных ЭК (рис. 8). В монокультуре ЭК в присутствии TNFα количество VEGFR1<sup>+</sup> ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR1 были меньше по сравнению с монокультурой интактных ЭК. Этот эффект сохранялся в монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и TNFα. При этом в монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и TNFα количество VEGFR1<sup>+</sup> ЭК было меньше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии только препарата «Авастин» (рис. 9). В сокультуре ЭК и THP-1 интенсивность экспрессии VEGFR3 была ниже по сравнению с монокультурой интактных ЭК. В монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и TNFα количество VEGFR3<sup>+</sup> ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 были



**Рисунок 8. Влияние  $TNF\alpha$  на формирование сосудов ЭК линии EA.Hy926 в присутствии клеток линии THP-1 и препарата «Авастин»**

**Примечание.** А – влияние на длину сосудов. Б – влияние на количество сосудов. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТС, спонтанный уровень,  $n = 45$ ; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин»,  $n = 45$ ;  $TNF\alpha$  – культивирование в присутствии  $TNF\alpha$ ,  $n = 15$ ; Avastin +  $TNF\alpha$  – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и  $TNF\alpha$ ,  $n = 15$ . Достоверность различий: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  (отличается от уровня при монокультивировании intactных ЭК); # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ .

Figure 8. Effect of  $TNF\alpha$  on the formation of tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the presence of THP-1 cells and the drug Avastin

Note. A, the effect on the length of tube-like structures. B, the effect on the number of tube-like structures. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level),  $n = 45$ ; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin,  $n = 45$ ;  $TNF\alpha$ , cultivation in the presence of  $TNF\alpha$ ,  $n = 15$ ; Avastin +  $TNF\alpha$ , cultivation in the presence of the drug Avastin and  $TNF\alpha$ ,  $n = 15$ . The significance of differences between groups: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (differs from the spontaneous level); #,  $p < 0.05$ ; ##,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$ .

ниже по сравнению с монокультурой intactных ЭК. При этом количество  $VEGFR3^+$  ЭК было меньше по сравнению с монокультурой в присутствии препарата «Авастин» (рис. 9).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии  $TNF\alpha$  длина сосудов была больше по сравнению с мо-

нокulturой intactных ЭК, но меньше по сравнению с длиной сосудов в intactной сокультуре. Длина сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и  $TNF\alpha$  была больше по сравнению с монокультурой intactных ЭК, но меньше по сравнению с сокультурой в присутствии препарата «Авастин» (рис. 8). Количество сосудов в монокультуре в присутствии  $TNF\alpha$  было меньше по сравнению с intactной монокультурой ЭК. В монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и  $TNF\alpha$  количество сосудов по сравнению с монокультурой intactных ЭК было меньше, но больше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии  $TNF\alpha$  (рис. 8).

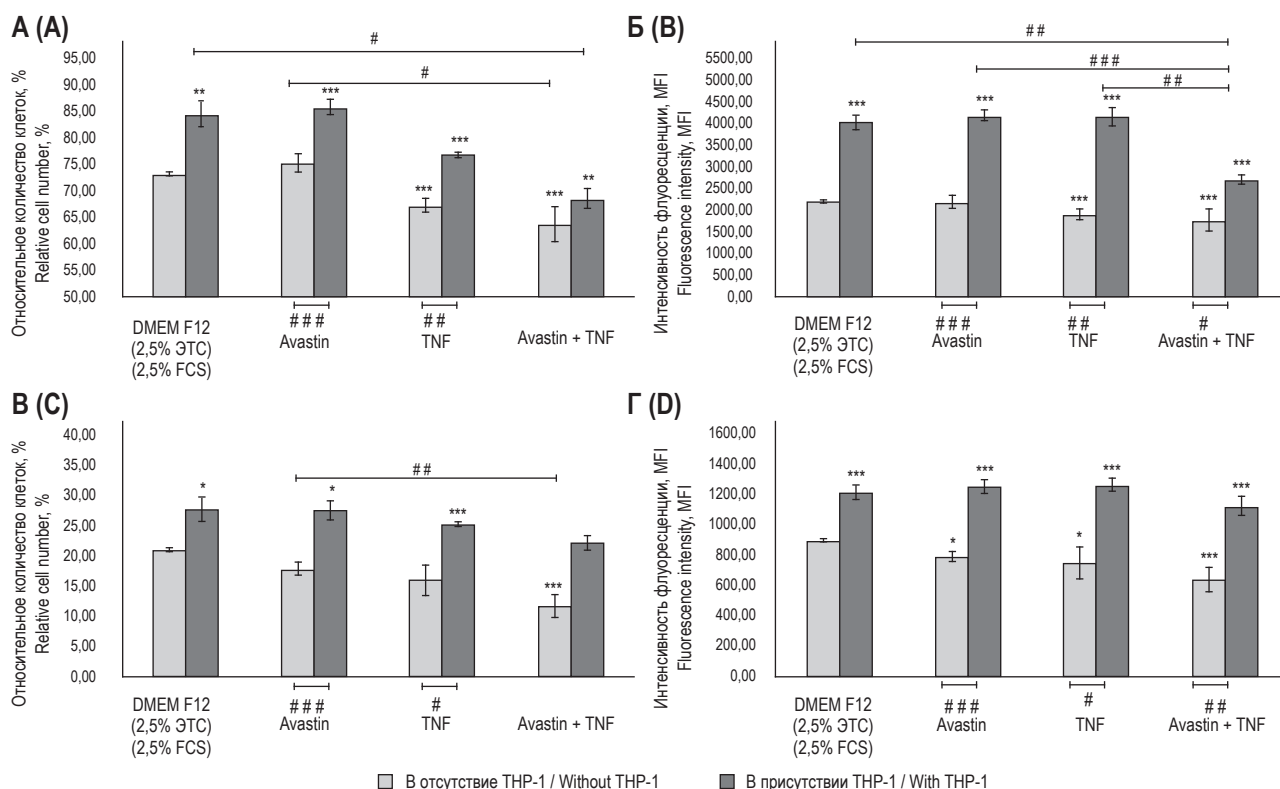
В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии  $TNF\alpha$  количество сосудов было меньше по сравнению с intactной сокультурой. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и  $TNF\alpha$  количество сосудов было меньше по сравнению с монокультурой intactных ЭК, а также по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии препарата «Авастин» и  $TNF\alpha$  (рис. 8).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии  $TNF\alpha$  относительное количество  $VEGFR1^+$  ЭК и интенсивность экспрессии ими  $VEGFR1$  были больше по сравнению с таковыми в монокультуре intactных или активированных  $TNF\alpha$  ЭК. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и  $TNF\alpha$  количество  $VEGFR1^+$  ЭК было меньше по сравнению с монокультурой intactных ЭК, а интенсивность экспрессии  $VEGFR1$  ЭК была выше по сравнению с intactной или активированной теми же индукторами монокультурой ЭК. Количество  $VEGFR1^+$  ЭК и интенсивность экспрессии ими  $VEGFR1$  в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и  $TNF\alpha$  были ниже по сравнению с intactной сокультурой. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и  $TNF\alpha$  интенсивность экспрессии  $VEGFR1$  ЭК была ниже по сравнению с сокультурой в присутствии только  $TNF\alpha$  или в присутствии только препарата «Авастин» (рис. 9).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии  $TNF\alpha$  количество  $VEGFR3^+$  ЭК и интенсивность экспрессии ими  $VEGFR3$  ЭК были выше по сравнению с монокультурой intactных или активированных  $TNF\alpha$  ЭК. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и  $TNF\alpha$  интенсивность экспрессии  $VEGFR3$  ЭК была выше по сравнению с intactной или активированной теми же индукторами монокультурой ЭК (рис. 9).

## Обсуждение

Ангиогенез регулируется множеством факторов, зависит от функционального состояния ЭК



**Рисунок 9. Влияние  $TNF\alpha$  на экспрессию VEGFR1 и VEGFR3 эндотелиальными клетками в условиях их совместного культивирования с клетками линии THP-1**

**Примечание.** А, Б – экспрессия VEGFR1. В, Г – экспрессия VEGFR3. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТC, спонтанный уровень,  $n = 16$ ; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин»,  $n = 24$ ;  $TNF\alpha$  – культивирование в присутствии  $TNF\alpha$ ,  $n = 3$ ; Avastin +  $TNF\alpha$  – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и  $TNF\alpha$ ,  $n = 3$ . Достоверность различий: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  (отличается от уровня при монокультивировании интактных ЭК); # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,01$ ; ### –  $p < 0,001$ .

Figure 9. Effect of  $TNF\alpha$  on the expression of VEGFR1 and VEGFR3 by endothelial cells under conditions of their co-cultivation with THP-1 cells

Note. A, B, the expression of VEGFR1. B, D, the expression of VEGFR3. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level),  $n = 16$ ; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin,  $n = 24$ ;  $TNF\alpha$ , cultivation in the presence of  $TNF\alpha$ ,  $n = 3$ ; Avastin +  $TNF\alpha$ , cultivation in the presence of the drug Avastin and  $TNF\alpha$ ,  $n = 3$ . The significance of differences between groups: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (differs from the spontaneous level); #,  $p < 0.05$ ; ##,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$ .

и клеток микроокружения. Макрофаги – активные участники ангиогенеза, они регулируют его благодаря секреции цитокинов и контактными взаимодействиями с ЭК [12, 22, 42]. Для оценки вклада в регуляцию ангиогенеза VEGF, а также изучения изменения экспрессии рецепторов для VEGF на ЭК мы культивировали клетки линии EA.Hy926 на матриксе «Матригель» в присутствии цитокинов и препарата «Авастин». Для оценки вклада Мф в регуляцию ангиогенеза мы сокультивировали ЭК с клетками линии THP-1 в присутствии цитокинов и препарата «Авастин». Препарат «Авастин», представляющий собой моноклональные антитела, связывающие VEGF-A, ингибирует его взаимодействие с рецепторами на поверхности клеток [33, 58].

Нами установлено, что клетки линии THP-1 способствовали увеличению длины сосудов, образованных ЭК, но при этом снижали их количество, то есть стимулировали неразветвляющийся ангиогенез. Ранее установлено, что некоторые компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген I и IV типа, а также фибронектин, вызывают изменения фенотипа и функций моноцитов, выделенных из периферической крови, ассоциированные с их дифференцировкой в Мф [21]. Таким образом, коллаген IV типа, входящий в состав матрикса «Матригель», может способствовать проявлению у клеток линии THP-1 свойств Мф. Ранее в нашей лаборатории было показано, что клетки линии THP-1 при культивировании на матриксе «Матригель» приобретают схожий фенотип с Мф [27]. Макрофаги явля-

ются источниками  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF-A, VEGF-C, bFGF, PDGF, MMPs [3, 43]. IL-8, bFGF, VEGF оказывают митогенное воздействие на ЭК, способствуют их выживаемости, стимулируют миграцию ЭК. Установлено, что IL-8 стимулирует продукцию MMP-2, обеспечивающей деградацию и ремоделирование внеклеточного матрикса [1]. VEGF-A контролирует ангиогенез на всех стадиях, включая стабилизацию сосудов. Подобным действием обладает Ang1, секретируемый моноцитами в результате их совместного культивирования с ЭК [16, 25, 26, 44]. В связи с этим можно предположить, что увеличение длины сосудов может быть вызвано продукцией этих цитокинов клетками линии THP-1. С другой стороны, в исследованиях на мышах показано взаимодействие Мф с филоподиями tip-клеток растущего сосуда и их участие в образовании анастомозов сосудами, причем этот процесс не зависит от VEGF [12]. Такой механизм взаимодействия ЭК и Мф может обеспечивать формирование более длинных сосудов; тем не менее молекулярные причины указанного явления остаются не до конца изученными [18]. Мф участвуют в создании градиента гепарин-связанного VEGF в матриксе, обеспечивая тем самым хемотаксис ЭК и направленный рост сосудов [12]. В нашей модели клетки линии THP-1, дифференцируясь в Мф, могут стимулировать образование более длинных сосудов как за счет секреции цитокинов, так и за счет контактных взаимодействий с ЭК и направлять рост сосудов, создавая градиент VEGF.

В сокультуре ЭК с клетками линии THP-1 нами отмечено повышение экспрессии VEGFR1 и VEGFR3 ЭК. В литературе описана колокализация и повышенная экспрессия VEGF-A и VEGFR1, что может служить доказательством положительной регуляции VEGFR1, опосредованной этой изоформой VEGF [6, 47, 57]. В связи с этим можно предположить, что отмеченный нами эффект может быть вызван VEGF-A, секретируемым Мф и являющимся лигандом для VEGFR1. Ранее отмечено, что на ЭК увеличивается экспрессия VEGFR3 при воздействии на них VEGF-A [8], что также согласуется с полученными нами данными. Некоторые авторы утверждают, что сигналинг VEGFR1 необходим для выживания ЭК, в то время как VEGFR2-сигналинг обуславливает формирование сосудов ЭК [57]. Однако в нашем исследовании не было обнаружено экспрессии VEGFR2 на ЭК, в то время как сосуды формировались. Вероятно, существуют иные механизмы регуляции формирования сосудов либо сигнальные пути этих двух

рецепторов имеют общие компоненты и пересекаются, компенсируя друг друга.

Отмеченное нами увеличение длины сосудов в монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» можно объяснить компенсаторной продукцией ЭК таких проангиогенных факторов, как bFGF [1, 9, 14]. При этом препарат «Авастин», уменьшающий концентрацию свободного VEGF-A в культуральной среде, вызывал снижение экспрессии VEGFR3, что согласуется с данными о способности VEGF-A повышать экспрессию этого рецептора [8]. Несмотря на то, что в литературе описана прямая корреляция между экспрессией VEGF-A и VEGFR1, в связи с чем можно судить о существовании аутокринной петли VEGF-A/VEGFR1, поддерживающей экспрессию VEGFR1 [47, 57], в настоящем исследовании препарат «Авастин» не оказывал влияния на экспрессию VEGFR1, что может говорить о наличии других VEGF-A-независимых механизмов его регуляции.

При совместном культивировании ЭК с клетками линии THP-1 препарат «Авастин» отменял стимулирующий эффект клеток линии THP-1 в отношении длины сосудов, что может быть вызвано снижением концентрации VEGF-A, продуцируемого как ЭК, так и клетками линии THP-1 [3]. Тем не менее препарат «Авастин» не отменял стимулирующего эффекта клеток линии THP-1 в отношении экспрессии VEGFR1 и VEGFR3, что может свидетельствовать о повышенной продукции VEGF-A ЭК и клетками линии THP-1 в условиях совместного культивирования и недостаточной концентрации препарата для полного связывания и ингибирования продукции VEGF-A либо указывать на наличие VEGF-A-независимых механизмов регуляции экспрессии VEGFR1 и VEGFR3.

В монокультуре ЭК IL-1 $\beta$  оказывал проангиогенное действие на ЭК, увеличивая длину сосудов и повышая экспрессию ими VEGFR1, что согласуется с данными, описанными в литературе [53]. Действие IL-1 $\beta$  на ангиогенез во многом определяется его способностью повышать секрецию VEGF-A ЭК и экспрессию рецепторов к нему на ЭК [5]. Этот эффект подтверждается данными, полученными в настоящем исследовании, поскольку при добавлении препарата «Авастин» в монокультуру ЭК отмечено снижение стимулирующего эффекта IL-1 $\beta$  в отношении длины сосудов. При этом препарат «Авастин» не изменял экспрессию VEGFR1 на ЭК в присутствии IL-1 $\beta$ , что подтверждает прямое действие IL-1 $\beta$  на экспрессию VEGFR1.

Однако в условиях сокультуры ЭК с клетками линии THP-1 IL-1 $\beta$  снижал стимулирующее влияние THP-1 на длину сосудов и отменял ингибирующий эффект THP-1 на их количество. Активация Мф IL-1 $\beta$  способствует приобретению макрофагами M2b-фенотипа; данная субпопуляция альтернативно активированных Мф характеризуется продукцией IL-10 и TNF $\alpha$  [2, 29, 41, 50]. IL-10 является антиангиогенным цитокином, который оказывает ингибирующее действие на ангиогенез за счет негативной регуляции синтеза проангиогенных цитокинов макрофагами, таких как IL-1 $\beta$ , IL-6, а также MMP-9 и оксида азота [7, 15, 19, 32]. Таким образом, IL-1 $\beta$  в сокультуре может снижать длину сосудов за счет стимуляции продукции антиангиогенных факторов макрофагами. Продукция IL-1 $\beta$  макрофагами также находится под влиянием отрицательной обратной связи. Этим можно объяснить противоположный эффект IL-1 $\beta$  в монокультуре ЭК и в сокультуре ЭК с клетками линии THP-1. При этом препарат «Авастин» в сокультуре ЭК с клетками линии THP-1 в присутствии IL-1 $\beta$  еще больше снижал длину сосудов, образованных ЭК, что можно объяснить снижением концентрации VEGF-A в культуральной среде.

При совместном культивировании ЭК с клетками линии THP-1 IL-1 $\beta$  повышал экспрессию ЭК VEGFR1, усиливая при этом влияние клеток линии THP-1 на экспрессию этого рецептора. Вероятно, в данных условиях IL-1 $\beta$  сохраняет способность повышать экспрессию VEGFR1 на ЭК, обладая однонаправленным эффектом с Мф. Данный эффект IL-1 $\beta$  можно также объяснить его способностью повышать продукцию ЭК VEGF-A [5]. При этом IL-1 $\beta$  не влиял на экспрессию VEGFR3 на ЭК в сокультуре. Добавление препарата «Авастин» в сокультуру ЭК и THP-1 не отменяло стимулирующего эффекта IL-1 $\beta$  в отношении экспрессии VEGFR1 ЭК, что может свидетельствовать о VEGF-A-независимом механизме регуляции экспрессии ЭК этого рецептора в условиях совместного культивирования ЭК и THP-1 в присутствии IL-1 $\beta$ . Таким образом, IL-1 $\beta$  оказывает стимулирующий эффект на экспрессию VEGFR1. Этот эффект IL-1 $\beta$  не зависит от VEGF-A и, по-видимому, обусловлен прямым действием данного IL-1 $\beta$ , не опосредованным секрецией VEGF-A.

IL-6 увеличивал длину сосудов в монокультуре ЭК, не изменяя при этом их количество. Полученные результаты согласуются с данными, описанными в литературе, согласно которым IL-6 является проангиогенным фактором, стимулирующим миграцию и пролиферацию ЭК, а также

регулирует секрецию ЭК bFGF, PDGF, VEGF [11, 19, 30]. В настоящем исследовании IL-6 снижал экспрессию VEGFR1 и VEGFR3 ЭК, в то время как данные литературы касательно влияния IL-6 на экспрессию VEGFR1 ЭК противоречивы: отмечено как увеличение его экспрессии [35], так и отсутствие влияния IL-6 на уровень экспрессии ЭК VEGFR1 [57]. При этом действие IL-6 не было опосредовано VEGF-A, поскольку добавление препарата «Авастин» в монокультуру ЭК не влияло на эффект, вызванный IL-6, как в отношении длины сосудов, так и в отношении экспрессии ЭК VEGFR1 и VEGFR3.

IL-6 полностью ингибировал вызванный THP-1 стимулирующий эффект в отношении длины сосудов, не влияя при этом на уровень экспрессии ЭК VEGFR1 и VEGFR3. Ранее установлено, что альтернативно активированные макрофаги в ответ на стимуляцию IL-6 продуцируют IL-10, обладающий антиангиогенным эффектом [23]. Таким образом, IL-6 в условиях сокультуры ЭК и THP-1 обладает сходным эффектом с IL-1 $\beta$  на ангиогенез, вероятно, за счет стимуляции продукции антиангиогенных цитокинов макрофагами; одним из таких цитокинов может являться IL-10.

Препарат «Авастин» отменял ингибирующий эффект IL-6 на длину сосудов в сокультуре ЭК и THP-1. Возможно, данный эффект связан с компенсаторной продукцией проангиогенных факторов в условиях сниженной концентрации VEGF-A ЭК и клетками линии THP-1. В качестве таких факторов могут выступать сам VEGF-A, секретируемый в повышенном количестве, PDGF или bFGF, продукция которых поддерживается IL-6 [11, 17, 30]. Также при одновременном добавлении в систему совместного культивирования ЭК и клеток линии THP-1 IL-6 и препарата «Авастин» снижался уровень экспрессии VEGFR1 на ЭК; данный эффект был отмечен только в сокультуре ЭК и THP-1. При использовании каждого из этих индукторов по отдельности в сокультуре ЭК и THP-1 такой эффект не был отмечен. Таким образом, IL-6 и препарат «Авастин» лишь в комплексе способны ингибировать повышение экспрессии VEGFR1, вызванное клетками линии THP-1.

В монокультуре ЭК в присутствии TNF $\alpha$  длина сосудов увеличивалась, но их количество снижалось; это может быть связано со способностью TNF $\alpha$  вызывать продукцию проангиогенных факторов – IL-8, PDGF, VEGF, bFGF [1]. Снижение количества сосудов вероятно обусловлено продукцией Ang-1, участвующего в стабилизации новообразованных сосудов и обеспечивающего

неразветвляющийся ангиогенез. Ранее установлено, что TNF $\alpha$  способен стимулировать продукцию Ang-1 через NF- $\kappa$ B-сигнальный путь [45]. Параллельно нами установлено, что TNF $\alpha$  снижал экспрессию VEGFR1 на ЭК в монокультуре ЭК, что согласуется с данными, описанными в литературе [37, 56]. В литературе сходный эффект TNF $\alpha$  отмечен в отношении экспрессии VEGFR2 и VEGFR3 [56]. В настоящем исследовании отмечено снижение экспрессии VEGFR3 ЭК в присутствии TNF $\alpha$ . Однако в присутствии препарата «Авастин» TNF $\alpha$  ингибировал экспрессию VEGFR3. В связи с этим можно предположить, что необходимым условием для снижения экспрессии VEGFR3 является недостаток свободного VEGF-A. Стоит отметить, что TNF $\alpha$  усиливает продукцию VEGF, в связи с чем ЭК, возможно, способны продуцировать секреторный вариант рецептора — sVEGFR1 — для удаления избытка VEGF, что может объяснить снижение уровня экспрессии VEGFR1 на поверхности ЭК.

Препарат «Авастин» не изменял эффект TNF $\alpha$  в отношении длины сосудов в монокультуре ЭК. Вероятно, увеличение длины сосудов в монокультуре ЭК в присутствии TNF $\alpha$  может быть связано со стимуляцией секреции ЭК, кроме VEGF, других проангиогенных факторов, таких как IL-8, PDGF, bFGF, Ang-1 [45]. В литературе описано противоположное действие VEGF и Ang-1: VEGF увеличивает проницаемость сосудов, участвуя в разборке межклеточных контактов, и дестабилизирует сосуды, в то время как Ang-1 обеспечивает их стабильность [34]. Таким образом, VEGF способствует формированию высокоразветвленной сети сосудов, а Ang-1 вызывает формирование более длинных сосудов с невысокой степенью ветвления [4]. По-видимому, эффект TNF $\alpha$  в монокультуре ЭК связан с Ang-1. При этом препарат «Авастин» отменял ингибирующее действие TNF $\alpha$  в отношении количества сосудов, что может свидетельствовать о роли VEGF, секрецию которого также стимулирует TNF $\alpha$ , в обеспечении разветвляющегося ангиогенеза.

В сокультуре ЭК и THP-1 TNF $\alpha$  снижал стимулирующий эффект THP-1 на длину сосудов. Возможно, в сокультуре TNF $\alpha$  снижает продукцию VEGF-A, а также стимулирует продукцию антиангиогенного TGF- $\beta$  клетками линии THP-1 [48, 52]. При этом в сокультуре

ЭК и THP-1 TNF $\alpha$  не изменял экспрессию ЭК VEGFR1 и VEGFR3. Препарат «Авастин» не отменял эффект TNF $\alpha$  в сокультуре ЭК и THP-1 в отношении длины сосудов, что может быть также связано со стимуляцией продукции TGF- $\beta$  клетками линии THP-1 и не зависит от VEGF-A. При одновременном добавлении в сокультуру ЭК и THP-1 TNF $\alpha$  и препарата «Авастин» снижалась экспрессия VEGFR1, чего, однако, не было отмечено при культивировании с каждым из индукторов по отдельности. Таким образом, в условиях совместного культивирования ЭК и клеток линии THP-1 IL-6 и TNF $\alpha$  сходным образом влияют на экспрессию VEGFR1, снижая ее лишь в условиях сниженной концентрации VEGF-A, вызванной добавлением препарата «Авастин».

Таким образом, использование препарата «Авастин» помогло установить, что при удалении VEGF-A из среды ЭК проявляют пластичность и изменяют свое поведение, вероятно, за счет продукции других цитокинов. Клетки линии THP-1 играют роль регулятора активности ЭК за счет секреции цитокинов, в том числе VEGF, а также благодаря контактными взаимодействиям с ЭК. Клетки линии THP-1 способны повышать чувствительность ЭК к VEGF за счет стимуляции экспрессии рецепторов для VEGF (VEGFR1 и VEGFR3), однако данный эффект является VEGF-A-независимым. Цитокины IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  самостоятельно стимулируют неразветвляющийся ангиогенез, увеличивая длину сосудов. Параллельно IL-1 $\beta$  увеличивает экспрессию VEGFR1 на поверхности ЭК, а IL-6 и TNF $\alpha$ , наоборот, снижают ее, тем самым регулируя чувствительность ЭК к VEGF. При этом эффекты данных цитокинов не зависят от VEGF-A. Действие клеток линии THP-1 на ангиогенез также может быть различным в зависимости от цитокинового окружения. В частности, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  способствуют приобретению клетками линии THP-1 антиангиогенных свойств, что, вероятно, не зависит от VEGF-A, а также от экспрессии его рецепторов эндотелиальными клетками. Таким образом, VEGF является важным, но не единственным фактором, контролирующим ангиогенез. В условиях недостатка VEGF либо сами ЭК, либо клетки микроокружения способны компенсировать его функциональную нагрузку за счет продукции других ростовых факторов.

## Список литературы / References

1. Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Старикова Э.А., Фрейдлин И.С. Цитокиновый контроль ангиогенеза // Медицинская иммунология, 2003. Т. 5, № 5-6. С. 493-506. [Amtchislavsky E.I., Sokolov D.I., Starikova E.A., Freidlin I.S. Cytokine control of angiogenesis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2003, Vol. 5, no. 5-6, pp. 493-506. (In Russ.)]

2. Anderson C.F., Mosser D.M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, Vol. 72, no. 1, pp. 101-106.
3. Arango Duque G., Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 491.
4. Benest A.V., Salmon A.H., Wang W., Glover C.P., Uney J., Harper S.J., Bates D.O. VEGF and angiopoietin-1 stimulate different angiogenic phenotypes that combine to enhance functional neovascularization in adult tissue. *Microcirculation*, 2006, Vol. 13, no. 6, pp. 423-437.
5. Berse B., Hunt J.A., Diegel R.J., Morganelli P., Yeo K., Brown F., Fava R.A. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.*, 1999, Vol. 115, no. 1, pp. 176-182.
6. Boiocchi L., Vener C., Savi F., Bonoldi E., Moro A., Fracchiolla N.S., Iurlo A., Deliliers G.L., Coggi G., Bosari S., Gianelli U. Increased expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 correlates with VEGF and microvessel density in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J. Clin. Pathol.*, 2011, Vol. 64, no. 3, pp. 226-231.
7. Chatterjee P., Chiasson V.L., Bounds K.R., Mitchell B.M. Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 253. doi: 10.3389/fimmu.2014.00253.
8. Chu L.H., Lee E., Bader J.S., Popel A.S. Angiogenesis interactome and time course microarray data reveal the distinct activation patterns in endothelial cells. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 10, e110871. doi: 10.1371/journal.pone.0110871.
9. Desai S.B., Libutti S.K. Tumor angiogenesis and endothelial cell modulatory factors. *J. Immunother.*, 1999, Vol. 22, no. 3, pp. 186-211.
10. Dimmeler S., Zeiher A.M. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ. Res.*, 2000, Vol. 87, no. 6, pp. 434-439.
11. Fan Y., Ye J., Shen F., Zhu Y., Yeghiazarians Y., Zhu W., Chen Y., Lawton M.T., Young W.L., Yang G.Y. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis *in vitro*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2008, Vol. 28, no. 1, pp. 90-98.
12. Fantin A., Vieira J.M., Gestri G., Denti L., Schwarz Q., Prykhodzhiy S., Peri F., Wilson S.W., Ruhrberg C. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 5, pp. 829-840.
13. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, no. 6, pp. 669-676.
14. Freidlin I.S., Sheikine Y.A. Endothelial cells as targets and producers of cytokines. *Med. Immunol.*, 2001, Vol. 3, no. 4, pp. 499-514.
15. Gazzinelli R.T., Oswald I.P., James S.L., Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J. Immunol.*, 1992, Vol. 148, no. 6, pp. 1792-1796.
16. Geva E., Ginzinger D.G., Zaloudek C.J., Moore D.H., Byrne A., Jaffe R.B. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, Vol. 87, no. 9, pp. 4213-4224.
17. Holzinger C., Weissinger E., Zuckermann A., Imhof M., Kink F., Schollhammer A., Kopp C., Wolner E. Effects of interleukin-1, -2, -4, -6, interferon-gamma and granulocyte/macrophage colony stimulating factor on human vascular endothelial cells. *Immunol. Lett.*, 1993, Vol. 35, no. 2, pp. 109-117.
18. Hsu C.W., Poche R.A., Saik J.E., Ali S., Wang S., Yosef N., Calderon G.A., Scott L., Jr., Vadakkan T.J., Larina I.V., West J.L., Dickinson M.E. Improved angiogenesis in response to localized delivery of macrophage-recruiting molecules. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0131643. doi: 10.1371/journal.pone.0131643.
19. Huang S., Xie K., Bucana C.D., Ullrich S.E., Bar-Eli M. Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 1996, Vol. 2, no. 12, pp. 1969-1979.
20. Hughes C.S., Postovit L.M., Lajoie G.A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 2010, Vol. 10, no. 9, pp. 1886-1890.
21. Jacob S.S., Shastri P., Sudhakaran P.R. Monocyte-macrophage differentiation *in vitro*: modulation by extracellular matrix protein substratum. *Mol. Cell Biochem.*, 2002, Vol. 233, no. 1-2, pp. 9-17.
22. Kalucka J., Bierhansl L., Wielockx B., Carmeliet P., Eelen G. Interaction of endothelial cells with macrophages-linking molecular and metabolic signaling. *Pflugers Arch.*, 2017, Vol. 469, no. 3-4, pp. 473-483.
23. Krakauer T., Oppenheim J.J. IL-1 and tumor necrosis factor-alpha each up-regulate both the expression of IFN-gamma receptors and enhance IFN-gamma-induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *J. Immunol.*, 1993, Vol. 150, no. 4, pp. 1205-1211.

24. Lvova T.Y., Stepanova O.I., Okorokova L.S., Semenov V.A., Rebezova E.A., Sel'kov S.A., Sokolov D.I. Effect of monocyte-like THP-1 cells on the formation of vascular tubes by EA.Hy926s endothelial cells in the presence of cytokines. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2015, Vol. 159, no. 1, pp. 146-151.
25. Lukacs N.W., Strieter R.M., Elner V., Evanoff H.L., Burdick M.D., Kunkel S.L. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood*, 1995, Vol. 86, no. 7, pp. 2767-2773.
26. Lvova T.Y., Belyakova K.L., Sel'kov S.A., Sokolov D.I. Effect of THP-1 Cells on the formation of vascular tubes by endothelial EA.hy926 cells in the presence of placenta secretory products. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, Vol. 162, no. 4, pp. 545-551.
27. Lvova T.Y., Stepanova O.I., Viazmina L.P., Okorokova L.S., Belyakova K.L., Belikova M.E., Selkov S.A., Sokolov D.I. Effect of factors secreted by the placenta on phenotype of THP-1 cells cultured on a 3D scaffold. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, Vol. 161, no. 1, pp. 162-167.
28. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 2004, Vol. 25, no. 12, pp. 677-686.
29. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.*, 2008, Vol. 13, pp. 453-461.
30. Middleton K., Jones J., Lwin Z., Coward J.I. Interleukin-6: an angiogenic target in solid tumours. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2014, Vol. 89, no. 1, pp. 129-139.
31. Moldovan L., Moldovan N.I. Role of monocytes and macrophages in angiogenesis. *EXS*, 2005, no. 94, pp. 127-146.
32. Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, Vol. 19, pp. 683-765.
33. Nagpal M., Nagpal K., Nagpal P.N. A comparative debate on the various anti-vascular endothelial growth factor drugs: pegaptanib sodium (Macugen), ranibizumab (Lucentis) and bevacizumab (Avastin). *Indian J. Ophthalmol.*, 2007, Vol. 55, no. 6, pp. 437-439.
34. Ngok S.P., Geyer R., Liu M., Kourtidis A., Agrawal S., Wu C., Seerapu H.R., Lewis-Tuffin L.J., Moodie K.L., Huvelde D., Marx R., Baraban J.M., Storz P., Horowitz A., Anastasiadis P.Z. VEGF and Angiopoietin-1 exert opposing effects on cell junctions by regulating the Rho GEF Syx. *J. Cell Biol.*, 2012, Vol. 199, no. 7, pp. 1103-1115.
35. Nilsson M.B., Langley R.R., Fidler I.J. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine. *Cancer Res.*, 2005, Vol. 65, no. 23, pp. 10794-10800.
36. Papetti M., Herman I.M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002, Vol. 282, no. 5, pp. C947-C970.
37. Patterson C., Perrella M.A., Endege W.O., Yoshizumi M., Lee M.E., Haber E. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 1996, Vol. 98, no. 2, pp. 490-496.
38. Pavlov O.V., Niauri D.A., Selutin A.V., Selkov S.A. Coordinated expression of TNFalpha- and VEGF-mediated signaling components by placental macrophages in early and late pregnancy. *Placenta*, 2016, Vol. 42, pp. 28-36.
39. Rakocovic J., Orlic D., Mitrovic-Ajtic O., Tomasevic M., Dobric M., Zlatic N., Milasinovic D., Stankovic G., Ostojic M., Labudovic-Borovic M. Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Exp. Mol. Pathol.*, 2017, Vol. 102, no. 2, pp. 303-313.
40. Ribatti D., Nico B., Crivellato E., Vacca A. Macrophages and tumor angiogenesis. *Leukemia*, 2007, Vol. 21, no. 10, pp. 2085-2089.
41. Sato A., Ohtaki H., Tsumuraya T., Song D., Ohara K., Asano M., Iwakura Y., Atsumi T., Shioda S. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *J. Neuroinflammation*, 2012, Vol. 9, p. 65.
42. Schmidt T., Carmeliet P. Blood-vessel formation: Bridges that guide and unite. *Nature*, 2010, Vol. 465, no. 7299, pp. 697-699.
43. Schoppmann S.F., Birner P., Stockl J., Kalt R., Ullrich R., Caucig C., Kriehuber E., Nagy K., Alitalo K., Kerjaschki D. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2002, Vol. 161, no. 3, pp. 947-956.
44. Schubert S.Y., Benarroch A., Monter-Solans J., Edelman E.R. Primary monocytes regulate endothelial cell survival through secretion of angiopoietin-1 and activation of endothelial Tie2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011, Vol. 31, no. 4, pp. 870-875.
45. Scott B.B., Zaratian P.F., Gilmartin A.G., Hansbury M.J., Colombo A., Belpasso C., Winkler J.D., Jackson J.R. TNF-alpha modulates angiopoietin-1 expression in rheumatoid synovial fibroblasts via the NF-kappa B signalling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, Vol. 328, no. 2, pp. 409-414.
46. Sokolov D.I., Kolobov A.V., Pecherina L.V., Kramareva N.L., Mozgovaya E.V., Kvetnoi I.M., Selkov S.A. Expression of VEGF and VEGF-R3 receptor by placental endothelial cells in health and gestosis. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2008, Vol. 145, no. 3, pp. 348-351.

47. Srabovic N., Mujagic Z., Mujanovic-Mustedanagic J., Softic A., Muminovic Z., Rifatbegovic A., Begic L. Vascular endothelial growth factor receptor-1 expression in breast cancer and its correlation to vascular endothelial growth factor  $\alpha$ . *Int. J. Breast Cancer*, 2013, Vol. 2013, 746749. doi: 10.1155/2013/746749.
48. Sullivan D.E., Ferris M., Nguyen H., Abboud E., Brody A.R. TNF-alpha induces TGF-beta1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation. *J. Cell. Mol. Med.*, 2009, Vol. 13, no. 8B, pp. 1866-1876.
49. Sunderkotter C., Steinbrink K., Goebeler M., Bhardwaj R., Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, 1994, Vol. 55, no. 3, pp. 410-422.
50. Sutterwala F.S., Noel G.J., Salgame P., Mosser D.M. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcgamma receptor type I. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 188, no. 1, pp. 217-222.
51. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol. Pharm. Bull.*, 2011, Vol. 34, no. 12, pp. 1785-1788.
52. Terasaki H., Kase S., Shirasawa M., Otsuka H., Hisatomi T., Sonoda S., Ishida S., Ishibashi T., Sakamoto T. TNF-alpha decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF-kappaB pathways. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 7, e69994. doi: 10.1371/journal.pone.0069994.
53. Voronov E., Carmi Y., Apte R.N. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front. Physiol.*, 2014, Vol. 5, 114. doi: 10.3389/fphys.2014.00114.
54. Weisser S.B., McLarren K.W., Kuroda E., Sly L.M. Generation and characterization of murine alternatively activated macrophages. *Methods Mol. Biol.*, 2013, Vol. 946, pp. 225-239.
55. Wesley R.B., 2<sup>nd</sup>, Meng X., Godin D., Galis Z.S. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes *in vitro*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998, Vol. 18, no. 3, pp. 432-440.
56. Yang H., Li M., Chai H., Yan S., Zhang R., Yao Q., Chen C. Expression and regulation of neuropilins and VEGF receptors by TNF-alpha in human endothelial cells. *J. Surg. Res.*, 2004, Vol. 122, no. 2, pp. 249-255.
57. Zhang Z., Neiva K.G., Lingen M.W., Ellis L.M., Nor J.E. VEGF-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of VEGFR1 and VEGFR2. *Cell Death Differ.*, 2010, Vol. 17, no. 3, pp. 499-512.
58. Zhao Y., Adjei A.A. Targeting angiogenesis in cancer therapy: moving beyond vascular endothelial growth factor. *Oncologist*, 2015, Vol. 20, no. 6, pp. 660-673.

---

**Авторы:**

**Козырева А.Р.** — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Львова Т.Ю.** — 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

**Маркова К.Л.** — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

---

**Authors:**

**Kozyreva A.R.**, Researcher, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Lvova T.Yu.**, Research Associate, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Markova K.L.**, Junior Research Associate, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Симбирцев А.С.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, научный руководитель ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Ищенко А.М.** — к.б.н., руководитель лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Сельков С.А.** — д.м.н., профессор, руководитель 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

**Соколов Д.И.** — д.б.н., заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Simbirtsev A.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Ischenko A.M.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

**Selkov S.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology and Cell 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

**Sokolov D.I.**, PhD, MD (Biology), Head, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 06.11.2019  
Принята к печати 28.11.2019

Received 06.11.2019  
Accepted 28.11.2019

## МИКРОВЕЗИКУЛЫ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ ЛИНИИ NK-92 ВЛИЯЮТ НА ФЕНОТИП И ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ EA.Hy926

Маркова К.Л.<sup>1</sup>, Михайлова В.А.<sup>1,3</sup>, Корневский А.В.<sup>1</sup>,  
Милютин Ю.П.<sup>1</sup>, Родыгина В.В.<sup>1</sup>, Александрова Е.П.<sup>1</sup>, Марков А.С.<sup>1</sup>,  
Балабас О.А.<sup>2</sup>, Сельков С.А.<sup>1,3</sup>, Соколов Д.И.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Микровезикулы (МВ) — субклеточные структуры размером от 100 до 1000 нм, продуцируемые клетками в состоянии покоя и активации. МВ могут передавать молекулы клеткам-мишеням, регулировать физиологические процессы, участвовать в патологиях. Микровезикулы лейкоцитарного происхождения, в частности МВ NK-клеток, остаются наименее изученной популяцией МВ. NK-клетки способны изменять функциональную активность эндотелиальных клеток (ЭК), участвуют в регуляции ангиогенеза. Недостаточно изучена способность МВ NK-клеток влиять на функциональное состояние ЭК. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния МВ, образуемых естественными киллерами линии NK-92, на фенотип, активность каспаз, пролиферацию и миграцию ЭК линии EA.Hy926. ЭК культивировали в присутствии МВ клеток линии NK-92. При помощи проточной цитофлуориметрии оценивали изменение фенотипа ЭК, передачу внутриклеточного белка из МВ в ЭК, относительную гибель ЭК. При помощи Western blot analysis оценивали экспрессию гранзима В в NK-клетках и их МВ, появление гранзима В в ЭК, экспрессию каспаз, Erk, АКТ в ЭК. Также оценивали пролиферацию и миграцию ЭК в присутствии МВ клеток линии NK-92. Установлено значимое различие протеомных профилей клеток линии NK-92 и образуемых ими МВ. Контакт ЭК с МВ клеток линии NK-92 сопровождается развитием следующих событий: 1) экспрессией в ЭК гранзима В; 2) активацией каспазы-9, каспазы-3 и частичной гибелью ЭК; 3) появлением на ЭК панлейкоцитарного маркера CD45; 4) снижением экспрессии CD105 и повышением экспрессии CD34 и CD54; 5) ингибированием миграции ЭК. Передача эндотелиальным клеткам Erk, но не АКТ, в составе МВ клеток линии NK-92 в концентрации в 10 раз ниже концентрации, вызывающей гибель ЭК, способствует повышению пролиферации ЭК.

**Ключевые слова:** NK-клетки, эндотелий, микровезикулы, гранзим В, каспазы, пролиферация, миграция

### 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 (812) 328-98-50.  
Факс: 8 (812) 323-75-45.  
E-mail: falcojugger@yandex.ru

### Address for correspondence:

Sokolov Dmitry I.  
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology  
199034, Russian Federation, St. Petersburg,  
Mendeleevskaya line, 3.  
Phone: 7 (812) 328-98-50.  
Fax: 7 (812) 323-75-45.  
E-mail: falcojugger@yandex.ru

### Образец цитирования:

К.Л. Маркова, В.А. Михайлова, А.В. Корневский, Ю.П. Милютин, В.В. Родыгина, Е.П. Александрова, А.С. Марков, О.А. Балабас, С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Микровезикулы естественных киллеров линии NK-92 влияют на фенотип и функции эндотелиальных клеток линии EA.Hy926» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 249-268.  
doi: 10.15789/1563-0625-MPB-1877  
© Маркова К.Л. и соавт., 2020

### For citation:

K.L. Markova, V.A. Mikhailova, A.V. Korenevsky, Yu.P. Milyutina, V.V. Rodygina, E.P. Aleksandrova, A.S. Markov, O.A. Balabas, S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Microvesicles produced by natural killer cells of the NK-92 cell line affect the phenotype and functions of endothelial cells of the EA.Hy926 cell line", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 249-268. doi: 10.15789/1563-0625-MPB-1877  
DOI: 10.15789/1563-0625-MPB-1877

# MICROVESICLES PRODUCED BY NATURAL KILLER CELLS OF THE NK-92 CELL LINE AFFECT THE PHENOTYPE AND FUNCTIONS OF ENDOTHELIAL CELLS OF THE EA.Hy926 CELL LINE

Markova K.L.<sup>a</sup>, Mikhailova V.A.<sup>a,c</sup>, Korenevsky A.V.<sup>a</sup>, Milyutina Yu.P.<sup>a</sup>, Rodygina V.V.<sup>a</sup>, Aleksandrova E.P.<sup>a</sup>, Markov A.S.<sup>a</sup>, Balabas O.A.<sup>b</sup>, Selkov S.A.<sup>a,c</sup>, Sokolov D.I.<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Microvesicles (MVs) are small (100-1000 nm) subcellular structures produced by both motionless and activated cells that can transfer molecules to target cells, and regulate physiological and pathological processes. MVs of leukocyte origin, in particular those produced by natural killer cells (NK cells), remain the least studied population of MVs. NK cells can change the functional activity of endothelial cells (ECs) and are involved in regulating angiogenesis. The ability of NK cell-derived MVs to influence the functionality of ECs is understudied currently. We aimed to study the effect of MVs produced by NK cells of the NK-92 cell line on the phenotype, caspase activity, proliferation and migration of ECs of the EA.Hy926 cell line. We cultured ECs in the presence of MVs derived from the NK-92 cell line, and then used flow cytometry to assess changes in EC phenotype, intracellular protein transfer from MVs to ECs, and the relative death of ECs. We used western blot analysis to evaluate the expression of granzyme B in NK cells and in the MVs that they produced, as well as the expression of granzyme B, caspases, extracellular-regulated kinase (*ERK*) and protein kinase B (*AKT*) in ECs. We also assessed the proliferation and migration of ECs in the presence of MVs derived from cells of the NK-92 cell line. The results revealed significant differences in the proteomic profiles of cells of the NK-92 cell line and their MV product. Contact between ECs and MVs derived from cells of the NK-92 cell line is accompanied by the following events: a) expression of granzyme B in ECs, b) activation of caspase-9 and caspase-3, with partial EC death, c) appearance of the panleukocyte marker CD45 on ECs, d) decrease in CD105 expression, and increase in CD34 and CD54 expression, and e) inhibition of EC migration. Transfer of *ERK* (but not *AKT*) from MVs derived from cells of the NK-92 cell line to ECs, at a concentration 10 times lower than that which causes EC death, leads to an increase in EC proliferation.

**Keywords:** natural killer cells, endothelium, microvesicles, granzyme B, caspases, proliferation, migration

The EC proliferation and migration study was supported by the Russian Foundation for Basic Research grant No. 17-04-00679. Laser correlation analysis, flow cytometry and western blot analysis were supported by the Russian Science Foundation grant No. 17-15-01230. One-dimensional microchip gel electrophoresis and lysate preparation for mass spectrometry analysis were supported by the Russian Foundation for Basic Research grant No. 19-015-00218. Cell culture management was supported by AAAA-A19-119021290116-1. The funders did not participate in the design, data collection or analysis of this research, or preparation or publication of this manuscript. Mass spectrometry analysis was performed in the Compositional Analysis Methods Resource Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education: St. Petersburg

State University, Compositional Analysis Methods Resource Center, St. Petersburg, Russia.

## Introduction

Natural killer cells (NK cells) are CD3 negative lymphocytes that constitute 10-15% of all circulating lymphocytes in human blood [12, 49]. The major function of NK cells is to protect against pathogens in infected and transformed cells. This function is implemented by exocytosis of lytic granules, ligand-mediated interaction with death receptors on target cells, and peptide and cytokine secretion. The first two mechanisms of target cell cytotoxicity act directly to cause cell apoptosis [51]. Exocytosis of lytic granules on contact with a target cell is the most common mechanism for cytotoxicity induced by NK cells. NK cell granules contain amines, proteoglycans, catecholamines, enzymes and hormones. The

main components are perforin, granzymes and granulysin [51, 58]. The second most important cytolytic process is the start of target cell apoptosis by the receptor mechanism. This is mediated through the interaction between molecules of the Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) family (FasL (CD95L) and TRAIL) that are expressed on the NK cell surface and death receptors on target cells, being Fas (CD95) and TRAIL-R1/TRAIL-R2, respectively [51]. The third mechanism for cytotoxicity is associated with production of TNF $\alpha$ , interferon gamma (IFN $\gamma$ ) dependent differentiation of Th1 lymphocytes, and stimulation of the cellular immune response accompanied by potent antibacterial, antiviral and proliferation inhibiting effects [55]. NK cells also carry the Fc receptor (CD16) on their surface, which enables them to perform antibody-dependent cellular cytotoxicity [55].

In addition to innate immunity reactions, NK cells participate in various physiological and pathological processes due to production of a wide range of cytokines. In previous work, we showed that NK cells are involved in all processes of the uteroplacental bed in pregnancy, including blastocyst implantation into the endometrium, regulation of trophoblast invasion, remodeling of uterine arteries and decidua vessels, and formation of placenta vasculature [10, 19, 48]. Human NK cells in the uteroplacental bed are sources of various cytokines and other proteins including IL-15, IFN $\gamma$ , VEGF-A, VEGF-C, IL-8, TGF- $\beta$ , PlGF, Ang1, Ang2 [33], uPA, uPAR, MMP [56], MIP1 $\alpha$ , GM-CSF, and CSF1 [57]. These cytokines can affect ECs and their microenvironment by controlling angiogenesis. NK cells help prepare uterine spiral arteries for remodeling [39], which causes Fas-dependent apoptosis of smooth muscle cells and ECs [4, 63, 69, 77]. Conflicting findings on the role of NK cells in angiogenesis have been seen in various model experiments conducted *in vitro*. There is evidence that they stimulate vessel EC migration and formation [25, 29], and that they inhibit angiogenesis processes [16, 21]. It has been established that IL-15 increases production of VEGF and PlGF by NK cells [26, 40]. In contrast, NK cells activated by IL-12 inhibit vascular growth through production of IFN $\gamma$ , IP-10, perforin and granzyme [81]. Thus, depending on the model or characteristics of NK cells derived from different sources, researchers have obtained conflicting data on the effect of NK cells on ECs.

The regulatory and cytotoxic functions of NK cells can be performed not only by cytokines or contact interactions but also by the MVs that they produce. MVs are subcellular structures that range in size from 100 to 1000 nm and are found in almost all human biological fluids [13, 65, 71]. MVs can transfer molecules to target cells, and regulate inflammation, coagulation, antigen presentation, and apoptosis,

as well as participate in the pathogenesis of diseases and inflammatory processes [2, 8, 15, 24, 54]. MVs of leukocyte origin are the least studied population of MVs. This may be because they constitute only a minor fraction of the MVs in the bloodstream under normal physiological conditions [13]. In pathological processes, the level of leukocyte-derived MVs in blood increases dramatically, so that they are considered to be markers for development of various diseases [7, 65]. The phenotype, composition and functions of MVs produced by NK cells are inadequately defined. It has been established that NK cell exosomes possess cytotoxic properties [47]. NK cell-derived MVs probably have similar properties. We have shown previously that MVs isolated from peripheral blood expressed the NK cell markers, CD45, CD16 and CD56. We showed that the level of MVs produced by NK cells was lower in the peripheral blood of women with preeclampsia compared with healthy pregnant controls [54]. A study of MVs derived from cell line cultures used flow cytometry to show that NK cells of the NK-92 cell line formed MVs ranging in size from 200 to 1000 nm. Some of these MVs expressed CD95. Expression intensity increased with preliminary culturing of NK cells with TNF $\alpha$  [53]. The role of MVs, including those produced by NK cells, in angiogenesis, inflammation and the immune response remains understudied.

In this research, we studied the effect of MVs produced by NK cells of the NK-92 cell line on the phenotype, caspase activity, proliferation and migration of ECs of the EA.Hy926 cell line.

## Materials and methods

### Cell cultures

ECs of the Ea.Hy926 cell line (American Type Culture Collection (ATCC), USA) were used as they reproduce the main morphological, phenotypic and functional characteristics of the endothelium [18, 62, 74]. ECs were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) that was free of MVs, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, 2 mM L-glutamine and HAT (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA). The cell monolayer intended for subcultivation was disintegrated using Versene solution (Biolot, Russia). Cells of the NK-92 cell line (ATCC, USA) that reproduce the phenotypic and functional characteristics of activated NK cells were used as the source of MVs [23, 34]. Cells were cultured in complete minimum Eagle's medium ( $\alpha$ -MEM) (Biolot, Russia) that was free of MVs and contained 12.5% heat-inactivated FCS, 12.5% inactivated donor horse serum, 0.2 mM myo-inositol, 0.02 mM folic acid, 2 mM L-glutamine, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 U/mL penicillin, 10 mM HEPES buffer solution, 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-

Aldrich Chem. Co., USA), and 500 U/ml recombinant IL-2 (Roncoleukinum, Biotech LLC, Russia). Cell viability was assessed using Trypan blue solution and was at least 94%. Cells were cultured in an incubator in a humid environment at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>. All experiments involving cell culturing were performed under the same incubation conditions.

#### **Isolation of NK cell MVs**

Cells of the NK-92 cell line were cultured in 75 cm<sup>2</sup> flasks (BD, USA) in complete  $\alpha$ -MEM (changed once on the day prior to MV separation). The volume was adjusted to 40 mL with a cell concentration of  $4 \times 10^5$  per ml. Unstimulated cells of the NK-92 cell line served as controls. Cell viability was assessed the day after culture initiation. As there is no single standard for isolation and characterization of MVs, various methodological approaches are used that allow MV fractions to be obtained that differ in purity and enrichment level [41, 80]. We used the modified differential centrifugation method, using Hanks' solution without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA), to isolate MVs from cells of the NK-92 cell line [67, 71]. The obtained supernatants were centrifuged consecutively at 200 g (room temperature, 10 minutes) and at 9900 g (4 °C, 10 minutes). After the second centrifugation, the sediment was discarded and the supernatant was centrifuged several times at 19800 g (4 °C, 20 minutes), sedimenting and concentrating the MVs each time. This procedure allows MVs of 100–1000 nm diameter to be isolated with sufficient purity and minimal loss of biomaterial; the MVs are successively separated from coarse particles of cellular debris and apoptotic bodies, as well as from exosomes [17, 36].

#### **Laser correlation analysis**

To control the size of the isolated MVs, granulometric analysis was carried out using the dynamic light scattering method and the Zetasizer NanoZS laser correlation spectrometer (Malvern Instruments, UK). The particles ranged from 0.3 nm to 10  $\mu$ m. MV diameter was calculated using Zetasizer 7.11 software (Malvern Instruments, UK). The size of the MVs produced by NK cells of the NK-92 cell line ranged from 210–490 nm, and the peak of the MV quantity distribution was 315 nm. These data complied with our previous work [35] and that of other research groups that ascertained the size of MVs produced by various cells [20, 71, 75]. The reproducibility of the MV granulometric analysis results obtained in our laboratory at different times has led us to recommend laser correlation analysis as a standard for assessing the isolation purity of these extracellular objects.

#### **Evaluation of the protein profiles of cells of the NK-92 cell line and their MV products**

The sediment containing MVs obtained above was resuspended in deionised MilliQ water with addition of a protease inhibitor mixture (cOmplete,

EDTA-free; Roche Diagnostics GmbH, Germany) at the concentration specified by the manufacturer, and then stored at -80 °C until assay. The cell and MV membranes were disrupted with five freeze-thaw cycles and mechanical disruption in a glass homogenizer, and the obtained lysates were then centrifuged at 16 000 g (4 °C, 10 minutes). The sediment was discarded, and the proteins in the obtained supernatants were sedimented with a triple volume of icy acetone (OSTsch; Himmed, Russia), incubated at -20 °C for 30 minutes and centrifuged at 16 000 g (4 °C, 10 minutes). The obtained supernatants were discarded, and the sediment dried at room temperature. Next, the dry residue was dissolved in a minimal amount of 0.1 M sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA). The total protein content was determined and concentrations of the obtained protein solutions were aligned by adding the required volume of 0.1 M sodium bicarbonate, focusing on the lowest value of the measured protein. Purified proteins in the obtained solutions were separated by molecular weight using electrophoresis on microchips under non-denaturing conditions and commercial High Sensitivity Protein Chip kits (Agilent Technologies, USA) with an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) as per the manufacturer's instructions. The intensity of the bands obtained by electrophoresis was assessed using Agilent 2100 Expert software (Agilent Technologies, USA). All experiments were repeated six times independently.

#### **Analysis of total protein content**

The protein content of the cell and MV lysates was determined by the Bradford method [6] using a NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). After culturing for 24 h (as described above), the total protein content in NK cells of the NK-92 cell line and in their MVs was  $60.2 \pm 6.1 \mu\text{g}/10^6$  cells and  $2.5 \pm 0.3 \mu\text{g}/10^6$  source cells, respectively. The obtained data allowed us to calculate the protein load of the microchips and to align it between the cells and their MVs.

Isoelectric focusing of proteins in the liquid phase was used to separate proteins from the cells and from the MVs derived from these cells. The analysis was performed on OFFGEL High Resolution IPG strips (24 cm) with an immobilised pH gradient of 3–10 in a 3100 OFFGEL Fractionator under denaturing conditions. This was conducted as per the manufacturer's protocol (Agilent Technologies, USA) in the active rehydration and subsequent separation mode at a voltage of 200–3400 V (20 °C, 24 hours). Loading of test strips with lysates of the cells and their MVs was performed so that the protein content on all of the strips was equal and sufficient for obtaining valid results (4.5–5.0 mg). With isoelectric protein

separation, 24 fractions were obtained each from cell lysate and from MV lysate. The pH step between fractions was ~0.3.

#### **MALDI mass spectrometry analysis of tryptic peptide mixtures**

After isoelectric focusing, protein fractions were mixed with icy acetone (3:1, v/v) and incubated at -20 °C for 30 minutes. Sedimented proteins were centrifuged at 15 000 g (4 °C, 10 minutes). The supernatant was discarded, and the sediment was washed with a cooled acetone:water mixture (4:1, v/v), centrifuged again and dried at room temperature. Modified bovine trypsin solution 10 µL (20 ng/mL, Promega, USA) was added to the samples and incubated on ice for 1 hour and then at 37 °C for 18 hours. Tryptic peptide mixtures in the resultant solutions were air dried at 4 °C, then dissolved in 50 µL of an acetonitrile solution (50%) containing trifluoroacetic acid (0.1%, Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) and stirred until complete dissolution. The solutions were next applied to metal plates for MALDI analysis at a ratio of 2 × 0.5 µL of matrix solution and 5 × 0.5 µL of protein sample solution. A 2,5-dihydroxybenzoic acid (10 mg/mL) in sodium chloride solution (10 mM, Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) was used as the matrix. The resultant mixtures were air dried. Mass spectra of the tryptic peptides were obtained using the Axima Resonance MALDI mass spectrometer (Shimadzu/Kratos Analytical Ltd., UK). Measurements were carried out under positive ion shooting. Spectra were obtained in the 200–3000 m/z (mass-to-charge ratio) mass range by choosing the laser power optimal for resolution. Protein identification was undertaken relative to the SwissProt databases using taxonomic constraints for the *Homo sapiens* species and Mascot software (www.matrixscience.com), and the peptide fingerprinting method. A parallel search was performed using a database of inverted and random (decoy) amino acid sequences. After peptide identification, the correspondence between an identified protein and its actual position on a strip was checked.

#### **Evaluation of the effect of MVs derived from cells of the NK-92 cell line on the migration of ECs of the EA.Hy92 and Ea.Hy926 cell lines**

The day before the experiment, ECs were added to wells of a 96-well flat bottom plate ( $3.5 \times 10^4$  cells per well in 0.1 mL of medium, 10% FCS) and cultured for 24 hours. The monolayer was then disrupted by partial cell scraping. For this purpose, we used a 200 µL pipette tip to draw a vertical straight line in the middle of each well from edge to edge and then washed the line with warm Hanks' solution. The width of the obtained line of the disrupted monolayer was photographed (Supplementary Figure 1, see 2<sup>nd</sup> page of cover).

Next, the medium was replaced with dilutions of MVs derived from cells of the NK-92 cell line that were prepared using the EC medium i.e. 2.5% FCS. The cells were then cultured for 24 hours. ECs were incubated with 100 µL of crystal violet solution (0.2%, Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) containing 5% methanol for 10 minutes. After that, the plate was washed with distilled water and dried. Three fields of view were photographed in each well. Analysis of the obtained data was carried out using MarkMigration (Russia) software [50], which automatically considers the residual area of the disrupted monolayer line after migration. In each photograph, two parallel lines of the disrupted monolayer (mm<sup>2</sup>) were run and the number of cells that migrated to the zone of the disrupted monolayer line was specified. Change in cell migratory activity was assessed by evaluating the change in the number of cells that migrated during the experiment, compared with controls; it was also assessed by evaluating the change in area of the disrupted monolayer line after cell migration in a well, compared with controls. Experiments determining EC migratory activity in the presence of MVs were performed three times. Each MV concentration was analysed four times. Culture medium containing 2.5% FCS was used as the control, while that containing 10% FCS was used as the positive control. The area of the initial line after monolayer scraping was a median (interquartile range) of 0.53 (0.48, 0.53) mm<sup>2</sup>. No cells in the zone of the disrupted monolayer were revealed. We noted an increase in the number (470.5 (438.3, 522.3),  $p < 0.001$ ) of migrated ECs and a decrease in the area (0.21 (0.18, 0.24),  $p < 0.001$ ) mm<sup>2</sup> of the disrupted monolayer line after cell migration in the presence of 2.5% FCS. An increase in the FCS concentration of the culture medium to 10% (positive control) caused an increase in the number of migrated ECs (521.3 (470.8, 592.3),  $p < 0.01$ ) and a decrease in the residual area of the disrupted monolayer line after cell migration (0.16 (0.14, 0.22),  $p < 0.05$ ) mm<sup>2</sup>. Thus, within the framework of the model used, cells of the EA.Hy926 cell line responded to a higher FCS concentration with increased migratory activity, which is consistent with results described previously [22, 66]. This allows evaluation of changes in cell migratory activity in the presence of MVs derived from cells of the NK-92 cell line.

#### **Evaluation of the fluorescent tag transfer from MVs derived from cells of the NK-92 cell line to ECs of the Ea.Hy926 cell line**

The day before the experiment, ECs were added to a 96-well plate ( $3.5 \times 10^4$  cells per well in 100 µL of medium) and cultured for 24 hours. To stain intracellular protein, cells of the NK-92 cell line were treated with a 5(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ether (CFSE) solution at concentrations of 5 and 50 µM (three repetitions for

each concentration) according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) for use as positive controls. Some of the cells of the NK-92 cell line were left unstimulated. Unstimulated stained cells of the NK-92 cell line were then cultured in 75 cm<sup>2</sup> flasks (BD, USA) in 40 mL of complete  $\alpha$ -MEM for 24 hours. The cell concentration was  $4 \times 10^5$  per mL. MVs were then isolated (as described above), added to ECs (20  $\mu$ g of total protein in 100  $\mu$ L of medium) and incubated for 24 hours. The ECs were washed three times with Versene solution and then removed from the plate surface. The ECs were then resuspended twice in Hanks' solution without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, and centrifuged at 200 g for 10 minutes to discard the supernatant. Fluorescent CFSE inclusions into ECs were evaluated using the FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA) (Supplementary Figure 5, p.263). The experiments were repeated three times.

#### **Evaluation of the effect of MVs derived from cells of the NK-92 cell line on the phenotype of ECs of the Ea.Hy926 cell line**

The day before the experiment, ECs were added to wells of a 96-well flat bottom plate ( $3.5 \times 10^4$  cells per well in 100  $\mu$ L of medium) and cultured for 24 hours. Next, the medium was removed from the plate along with the EC monolayer. MVs derived from cells of the NK-92 cell line were then added at a concentration of 20  $\mu$ g of total protein in 100  $\mu$ L of medium (in three repetitions). Unstimulated ECs were used as controls. ECs incubated with phorbol-12-myristate 13-acetate (10 ng/mL, Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) were used as positive controls. One day later, ECs were washed three times with warm Hanks' solution and removed from the plate with Versene solution. Hanks' solution was again used to wash the Versene solution from the cells. To control survivability, the ECs were stained with 7-AAD dye (Biolegend, USA), and the cell death rate was assessed using the FACS Canto II flow cytometer by 7-AAD inclusion, as described above [59, 79]. The pool of nonviable ECs after culturing with MVs from cells of the NK-92 cell line was a median (interquartile range) of 29.9% (26.3, 54.5). Viability experiments were repeated four times. After incubation with MVs, ECs were treated with monoclonal antibodies to CD31, CD119, CD54, CD34 (Becton Dickinson, USA), VEGFR1, VEGFR2 and CD105 (R&D Systems, USA), as well as with isotypic antibodies according to the manufacturer's instructions. The fluorescence was analysed using the FACS Canto II flow cytometer (Supplementary Figure 2, 3, see 3<sup>rd</sup> page of cover). Analysis of the receptor expression by ECs was repeated four times.

#### **Evaluation of the effect of MVs derived from cells of the NK-92 cell line on the proliferative activity of ECs of the Ea.Hy92 cell line**

The day before the experiment, ECs were added to wells of a 96-well flat bottom plate ( $2.5 \times 10^3$  cells per

well in 0.1 mL of medium, 10% FCS) and cultured for 24 hours. After that, the medium was replaced with dilutions of MVs derived from unstimulated cells of the NK-92 cell line that were prepared using the EC medium of 2.5% FCS. The cells were then cultured for 24 hours. Medium containing 2.5% FCS was used as the control, while medium containing 10% FCS was the positive control. ECs were next stained with 0.2% crystal violet solution containing 5% methanol, which was added (100  $\mu$ L) to each well and incubated for 10 minutes. After staining, wells were washed with distilled water four times. The plate was dried and the dye was extracted with 50% acetic acid solution. Optical density was calculated using a Labsystems Microplate Reader at a wavelength of 540 nm (cutoff 620 nm), and converted to the cell number using a titration curve. Optical density results are presented as the cell number. Change in proliferation level was assessed by comparing the change in sample optical density and cell number with that of the ECs incubated in culture medium with added 2.5% FCS that was free of MVs. When culturing ECs in the presence of 10% FCS (positive control), stimulation of EC proliferative activity [11169.1 (10612.69, 11362.76) cells per well] was observed, compared with EC cultured with 2.5% FCS (38577.2 (16583.2, 39818.4) cells per well,  $p < 0.001$ ). Experiments were carried out three times. MV concentrations were analysed four times.

#### **Evaluation of the effect of MVs derived from cells of the NK-92 cell line on caspase expression in ECs of the Ea.Hy926 cell line using the western blot method**

The day before the experiment, ECs were added to wells of a 6-well plate ( $17.5 \times 10^4$  cells in 5 mL of medium) and cultured for 24 hours. The next day, MVs in the medium (200  $\mu$ g/mL of total protein) were added to a portion of cells and cultured for 24 hours. The cells were then washed three times with Versene solution and removed from the plate surface before resuspending twice in Hanks' solution without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>, and centrifuging at 200 g (10 minutes) to discard the supernatant. Caspase content and activity were assessed in the obtained cells via western blot analysis.

#### **Western blot analysis**

Cells of the NK-92 cell line, the sediment containing MVs derived from cells of the NK-92 cell line (obtained as described above), and unstimulated ECs or ECs treated with MVs derived from cells of the NK-92 cell line were washed three times with a cooled phosphate buffer (0.01 M PBS, pH 7.4) and lysed in RIPA buffer (50 mM, Tris-HCl, pH 8.1, Triton X-100 (1%), sodium dodecyl sulfate (0.1%), sodium deoxycholate (0.5%), EDTA (1 mM), sodium chloride (150 mM)) containing a protease inhibitor mixture (Roche, Switzerland) with intermittent shaking for 30 minutes. Cellular debris was removed by centrifugation at 16 000 g (4 °C, 10 minutes). Proteins

from the obtained supernatant were separated by their molecular weight through electrophoresis in 10% polyacrylamide gel under denaturing Laemmli conditions using commercial Mini-Protein TGX™ Stain-Free Precast Gels (Bio-Rad Laboratories, USA) in a Mini-Protein Tetra System, which is a chamber for vertical electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, USA). Proteins were separated in a TGS alkaline buffer solution containing 25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% sodium dodecyl sulfate (Bio-Rad Laboratories, USA), at a voltage of 200 V. Gel separated proteins were transferred onto polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad Laboratories, USA), which were then blocked with 2% albumin (Sigma-Aldrich Chem. Co., USA) in a TBST buffer solution containing 50 mM Tris-HCl (Bio-Rad Laboratories, USA), 150 mM sodium chloride (analytical grade reagent; Vekton, Russia) and 0.1% Tween 20 (Bio-Rad Laboratories, USA). The proteins were then incubated with primary monoclonal antibodies to granzyme B (Purified anti-Granzyme B, mouse Ab, 1:1000; Biolegend, USA), caspase-8 (Caspase-8 (1C12), mouse Ab, 1:1000; Cell Signaling, USA), caspase-3 (Caspase-3, rabbit Ab, 1:1000; Cell Signaling, USA), ERK1/2 (p44/42 MAPK (ERK1/2), rabbit Ab, 1:1000; Cell Signaling, USA) or AKT (AKT (pan) (C67E7), rabbit Ab, 1:1000; Cell Signaling, USA) at 4°C for one night on a MR-12 Rocker-Shaker (BioSan, Latvia). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:1000; Cell Signaling Technology, USA) was used as a load control for cell lysates. MVs were normalised to total protein content. After reaction with an appropriate secondary antibody (1:1000; Cell Signaling Technology, USA), signals were visualised on a ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System (Bio-Rad Laboratories, USA) using enhanced chemiluminescence (ECL) with ECL reagents (GE Healthcare, Sweden). The intensity of bands obtained by immunoblotting was assessed using ImageLab software (Bio-Rad Laboratories, USA). Caspase activation in ECs of the EA.Hy926 cell line was assessed as per a method described previously. Caspase-3 activation was assessed as the ratio of its active fragment (p17) detected and obtained from cleavage to the endogenous level of caspase-3 inactive proenzyme (p35). Caspase-8 activation was assessed as the ratio of its active (p18) and intermediate (p43/p41) fragments to procaspase-8 (p57). The results are presented in conditional units. All experiments were repeated independently three times.

Caspase-3 and caspase-9 activity were assessed using the synthetic peptides, Ac-DEVD-pNA and Ac-LEHD-pNA, respectively, as substrates. The reaction mixture consisted of reaction buffer (20 mM HEPES, 0.1% CHAPS, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7.4), 0.2 mM substrate and cell lysate. The total content of added protein was 60 µg. The increase in

the pNA reaction product was assessed by colorimetric analysis at a wavelength of 405 nm for 150 minutes. Caspase activity was then assessed using the formula  $(OD_t - OD_0)/(t \cdot \epsilon \cdot c)$ , where  $t$  is reaction time in minutes;  $OD_0$  is absorption measured before adding the substrate;  $OD_t$  is absorption measured  $t$  minutes after adding the substrate;  $\epsilon$  is the molar extinction of the product ( $\epsilon^{pNA} = 10.5$ );  $c$  is the protein content in the sample (µg). Caspase activity was expressed in µmol pNA/min/mg of protein.

Statistical analysis was performed in Statistica 10 software (www.statsoft.com) using the nonparametric Mann–Whitney U test. Data are presented as median (upper quartile, lower quartile). Results of western blot analysis and enzyme activity assessment are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments. Experimental results were analysed using a t-test for independent samples. The value  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Evaluation of the protein profiles of cells of the NK-92 cell line and their MVs

Protein extraction from lysates with microelectrophoresis revealed that 12 and 5 major (> 3% of the total intensity) protein groups were released in cells of the NK-92 cell line and in their MVs, respectively, during constitutive culturing. Proteins with molecular weights of 10.5–78.0 kDa were detected in cells of the NK-92 cell line, while the range was 59.9–141.7 kDa in MVs derived from these cells. The total content of minor (< 3% of the total intensity) components was 18.3% in cells and 6.0% in MVs (Table 1, Supplementary Figure 4, p. 263).

MALDI mass spectrometry analysis of tryptic peptide mixtures showed that cells of the NK-92 cell line and their MVs contained proteins from MAP kinase group. MEKKK 1 (MAPK/ERK kinase kinase 1 encoded by the MAP4K1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 isoform 1) gene) was detected in cells (SwissProt entry Q92918, molecular weight 91.2 kDa, pI 8.65, 8 tryptic peptides overlapping 2% of amino acid sequence of protein). Mnk1 (encoded by the MKNK1 (MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1 isoform 1) gene) was detected in MVs (SwissProt entry Q9BUB5, molecular weight 51.3 kDa, pI 6.26, 6 tryptic peptides overlapping 4% of amino acid sequence).

### Migratory activity of ECs of the EA.Hy926 cell line in the presence of MVs derived from unstimulated and activated NK cells of the NK-92 cell line

ECs cultured with MVs derived from cells of the NK-92 cell line (total protein content 20 µg/100 µL) had decreased migratory activity due to a lower

**TABLE 1. PROTEIN PROFILE (BY MOLECULAR WEIGHT) OF CELLS OF THE NK-92 CELL LINE AND THEIR MVs DETERMINED BY CONSTITUTIVE CULTURING ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )**

Cells of the NK-92 cell line, $n = 6$			MVs derived from cells of the NK-92 cell line, $n = 4$		
No.	Weight, kDa	Pool, %	No.	Weight, kDa	Pool, %
1	10.50 $\pm$ 0.09	4.60 $\pm$ 0.60	1	59.90 $\pm$ 0.49	62.20 $\pm$ 6.17
2	12.40 $\pm$ 0.05	6.20 $\pm$ 2.23	2	85.00 $\pm$ 0.90	7.30 $\pm$ 1.12
3	13.60 $\pm$ 0.08	6.00 $\pm$ 1.48	3	95.00 $\pm$ 0.79	6.2 $\pm$ 0.7
4	16.40 $\pm$ 0.38	7.00 $\pm$ 0.89	4	118.10 $\pm$ 4.28	4.50 $\pm$ 0.73
5	21.20 $\pm$ 0.33	10.10 $\pm$ 0.92	5	141.70 $\pm$ 1.53	13.80 $\pm$ 2.11
6	27.90 $\pm$ 0.27	4.80 $\pm$ 0.59	6	minor components (from 0 to 250)	6.0 (total)
7	32.20 $\pm$ 0.31	4.10 $\pm$ 0.51			
8	37.90 $\pm$ 0.35	6.00 $\pm$ 0.47			
9	46.40 $\pm$ 0.51	15.90 $\pm$ 1.09			
10	55.40 $\pm$ 0.46	3.50 $\pm$ 0.80			
11	61.70 $\pm$ 1.24	6.00 $\pm$ 1.44			
12	78.00 $\pm$ 1.39	7.50 $\pm$ 0.64			
13	minor components (from 0 to 250)	18.3 (total)			

number of migrated ECs compared with ECs cultured without MVs (Figure 1A, B). Given these results, we selected MVs derived from cells of the NK-92 cell line with a total protein concentration of 20  $\mu$ g per 100  $\mu$ L of medium for further experiments.

**Proliferative activity of ECs of the Ea.Hy926 cell line in the presence of MVs produced by unstimulated and activated NK cells of the NK-92 cell line**

Culturing EC with MVs derived from cells of the NK-92 cell line (total protein content 2  $\mu$ g/100  $\mu$ L) resulted in increased EC proliferative activity compared with ECs cultured in a medium without MVs. Culture of ECs in the presence of MVs with a total protein content of 10 and 20  $\mu$ g/100  $\mu$ L showed a dose-dependent decrease in EC proliferation compared with ECs cultured in a medium without MVs (Figure 1C).

**Effect of MVs derived from cells of the NK-92 cell line on the phenotype of ECs of the Ea.Hy926 cell line**

After EC incubation with MVs derived from cells of the NK-92 cell line, the number of ECs expressing VEGFR1, CD34, CD31 and CD119 receptors was reduced (Figure 2). However, the intensity of VEGFR1, CD31 and CD119 expression by cells of the Ea.Hy926 cell line did not change in the presence of MVs derived from cells of the NK-92 cell line, compared with the expression shown by unstimulated ECs of the Ea.Hy926 cell line (Figure 2). The decrease in number of CD34<sup>+</sup> ECs after incubation with MVs derived from cells of the NK-92 cell line was characterised by increased expression intensity

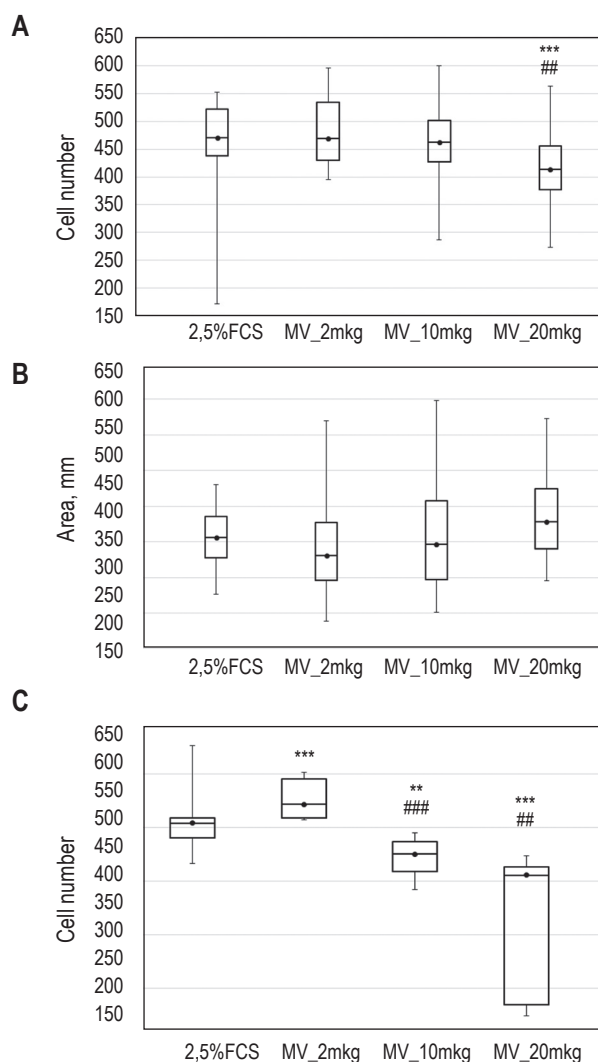
of the receptor by ECs, compared with unstimulated ECs of the Ea.Hy926 cell line (Figure 2). While the number of CD105<sup>+</sup> cells of the Ea.Hy926 cell line did not change after incubation with MVs derived from cells of the NK-92 cell line, the intensity of CD105 expression by cells of the Ea.Hy926 cell line reduced (Figure 2). Despite the absence of differences in the number of CD54<sup>+</sup> ECs, the intensity of CD54 expression by ECs was greater after incubation with MVs derived from cells of the NK-92 cell line, compared with unstimulated ECs (Figure 2).

After incubation of ECs of the Ea.Hy926 cell line with MVs derived from cells of the NK-92 cell line, the presence of ECs of the Ea.Hy926 cell line with the CD45<sup>+</sup> phenotype was revealed (Figure 3). The intensity of CD45 expression by ECs of the Ea.Hy926 cell line was also increased after EC incubation with MVs derived from cells of the NK-92 cell line as compared with unstimulated ECs of the Ea.Hy926 cell line (Figure 3).

**Evaluation of the fluorescent tag transfer from MVs derived from cells of the NK-92 cell line to ECs of the Ea.Hy926 cell line**

We established that ECs of the Ea.Hy926 cell line that were incubated with MVs derived from cells of the NK-92 cell line and pretreated with CFSE solution, dose-dependently included fluorescent CFSE (Supplementary Figure 5, p. 263).

Western blot analysis of granzyme B content showed that MVs derived from unstimulated cells of the NK-92 cell line contained granzyme B (Figure 4).



**Figure 1. Effect of MVs derived from cells of the NK-92 cell line on migratory activity and proliferation of ECs of the EA.Hy926 cell line**

Note. (A) Number of cells that migrated to the disrupted monolayer zone. (B) Residual area after migration of cells to the disrupted monolayer zone. (C) Number of cells that proliferated. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  – difference compared with cells incubated without MVs (2.5% FCS); ##,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$  – difference compared with a lower concentration under the same conditions.

We established that granzyme B transferred from MVs to ECs after ECs of the EA.Hy926 cell line were incubated in the medium containing MVs derived from cells of the NK-92 cell line (Figure 4).

#### Evaluation of the effect of MVs derived from cells of the NK-92 cell line on caspase expression and activity in ECs of the Ea.Hy926 cell line

We observed a significant decrease in procaspase-8 ( $p < 0.001$ ) and an increase in p43/41 fragment ( $p < 0.001$ ) after EC incubation with MVs derived from cells of the NK-92 cell line, compared with unstimulated ECs. The ratio of this fragment to procaspase-8 in EC lysates after culture with MVs derived from cells of the NK-92 cell line was

$6.86 \pm 3.41$ , which was significantly higher than with constitutively cultured ECs ( $0.06 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ ). In parallel, we did not identify an increase in formation of the p18 fragment, which is the final subunit of caspase-8 cleavage and activation (Figure 5). Thus, caspase-8 activation up to the p43/41 fragment level occurs only in cells of the EA.Hy926 cell line after culture with MVs. No further activation of the p43/41 fragment up to the p18 fragment occurs. At the same time, caspase-3 activation, expressed as a ratio of active caspase-3 fragment to procaspase-3, was higher in the same ECs obtained after culture with MVs compared with unstimulated cells of the EA.Hy926 cell line ( $p < 0.001$ ). There was also a decrease in procaspase-3 ( $p < 0.01$ ) and an increase in active caspase-3 ( $p < 0.05$ ) in ECs treated with MVs compared with unstimulated ECs (Figure 6).

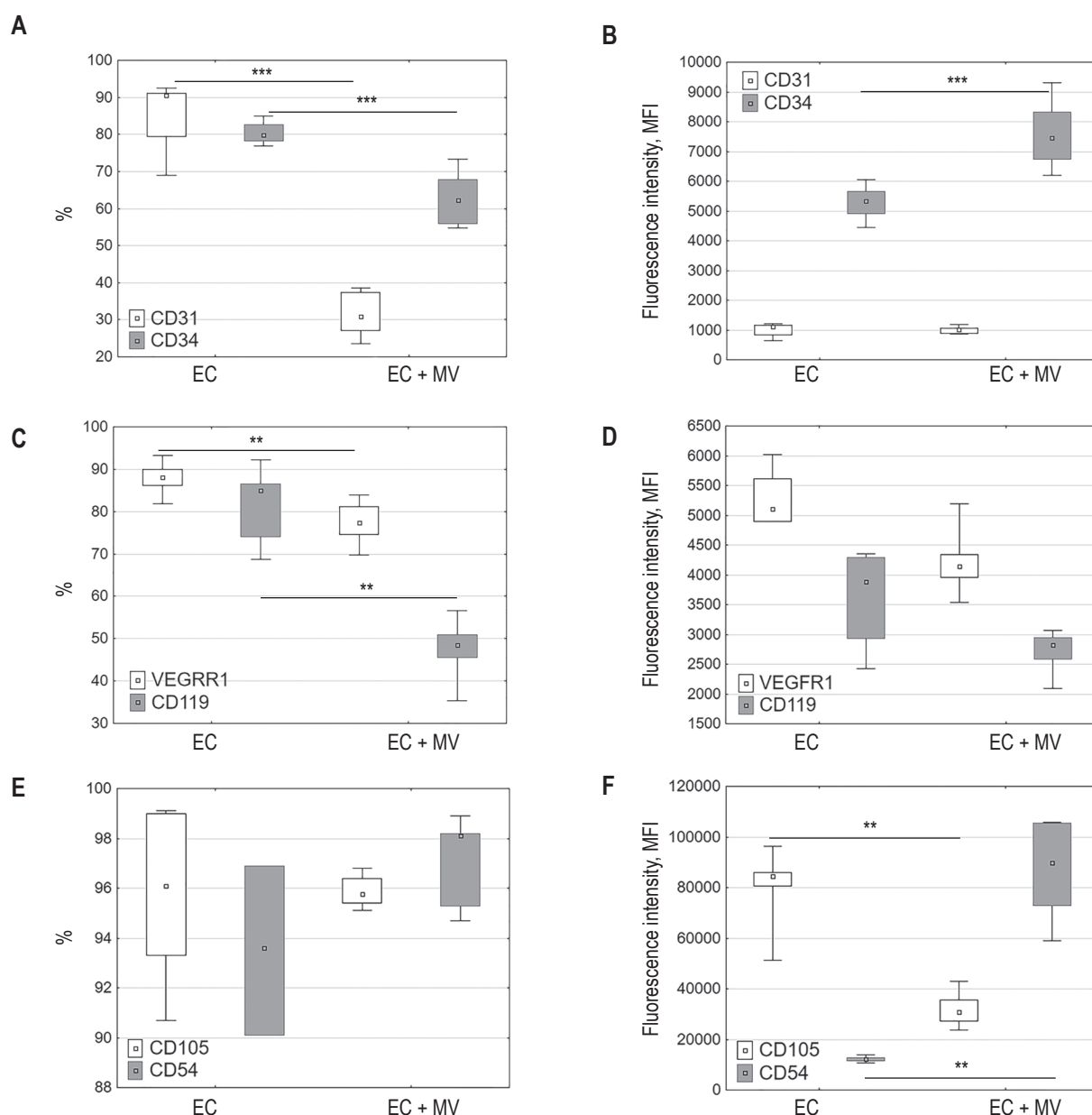
Using the spectrophotometric method and specific substrates, we revealed increased activity of caspase-3 and caspase-9 enzymes in cells of the EA.Hy926 cell line obtained after culture with MVs derived from cells of the NK-92 cell line as compared with unstimulated ECs (Figure 7).

#### Western blot analysis of granzyme B content

MVs derived from cells of the NK-92 cell line contain MAP kinase of ERK1/2 protein. However, a phosphorylated form was not detected. AKT kinase was not detected in MVs derived from cells of the NK-92 cell line (Supplementary Figure 6).

## Discussion

The protein profile of cells of the NK-92 cell line is represented by protein groups with fairly uniform percentage-weight compositions that do not allow isolation of any dominant groups. Protein groups with molecular weights of 21.2 kDa (10.1%) and 46.4 kDa (15.9%) can be distinguished as conditionally dominant ( $> 10\%$  of the total intensity). Unlike source cells, MVs have a less representative set of protein groups by molecular weight. Further, light and medium weight fractions are not detected at all up to 59 kDa, which is the dominant fraction (62.2%). The remaining few fractions, with a pool comprising  $> 3\%$  of the total intensity, aggregate to 31.8%, which is half the pool of the dominant protein group. In previous work, we used quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometry to establish that MVs from cells of the NK-92 cell line contain granzyme A, heat shock proteins, components of the ubiquitin-proteasome system, protein biosynthesis and energy metabolism enzymes, nuclear and serum proteins, and cytoskeletal proteins [35]. Our findings showed a significant difference between the proteomic profiles of cells of the NK-92 cell line and of their MVs. This indicates the need for further specification of these differences, determination of the biochemical



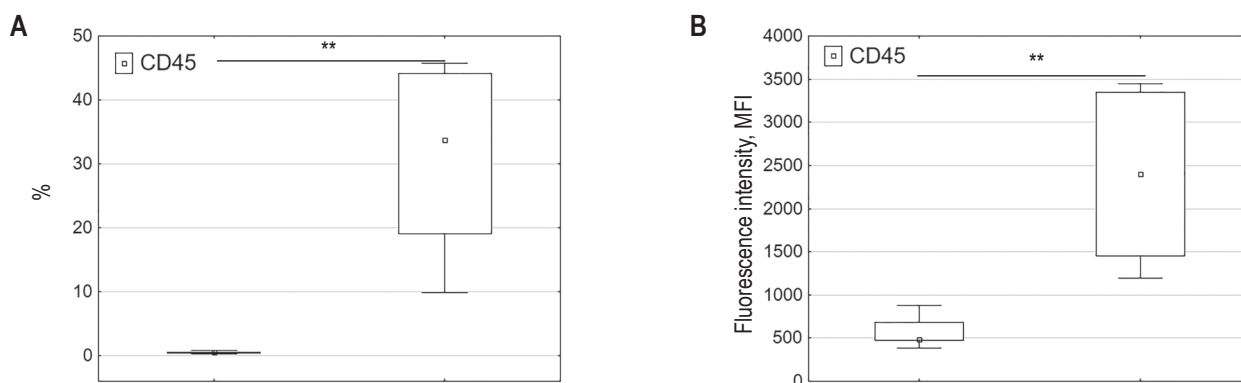
**Figure 2. Expression of surface receptors by ECs after culturing with (ECs + MVs) and without (ECs) MVs derived from cells of the NK-92 cell line (Me,  $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ )**

Note. Data are presented as the relative number of ECs expressing (a) CD31, CD34, (c) VEGFR1, CD119, and (e) CD105, CD54, and on the intensity of (b) CD31, CD34, (d) VEGFR1, CD119, and (f) CD105, CD54 expression by ECs. Significance of differences compared with unstimulated ECs: \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

nature and functional role of proteins that are MV components, and identification of target components involved in signal transmissions in the course of cell interaction.

MV membranes contain proteins that provide contact between vesicles and target cells, as well as signal transmission to target cells [11, 30]. The set of MV membrane proteins, in particular adhesion molecules and glycoproteins, as well as the degree of phosphatidylserine externalization determine the target cell pool with which these vesicles will

interact [1, 11, 27]. After extracellular vesicles establish contact with a target cell, signal transmission takes place and can occur by surface protein and lipid ligand-receptor interactions, by ejecting extracellular vesicle contents into the extracellular space in the immediate vicinity of a target cell, or by fusion of extracellular vesicles with the target cell plasma membrane and release of its contents into the cytosol, and by extracellular vesicle endocytosis and subsequent fusion with endosome [61, 73]. We used flow cytometry to establish that, after incubation



**Figure 3. ECs carrying the CD45 receptor after culturing with (ECs + MVs) and without (MV) MVs**

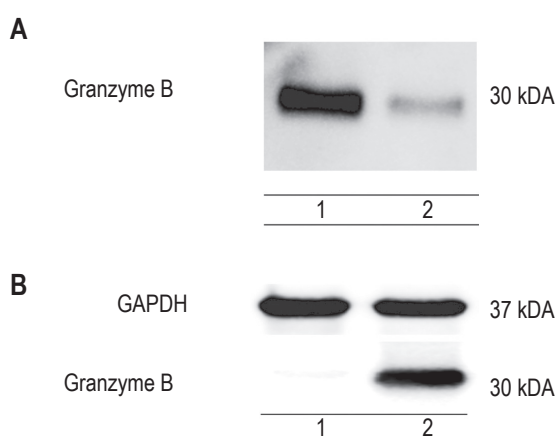
Note. Data on the relative number of ECs with the CD45<sup>+</sup> (a) phenotype and on the intensity of fluorescence of ECs with the CD45<sup>+</sup> (b) phenotype are presented. Significance of differences compared with unstimulated ECs: \*\*,  $p < 0.01$ .

of ECs of the EA.Hy926 cell line in the medium containing MVs derived from cells of the NK-92 cell line, CD45 membrane protein was transferred to ECs (Figure 3). CD45 protein is a panleukocyte marker that is not usually expressed by other cell types. Leukocyte marker transfer by MVs derived from NK cells onto the cytoplasmic membrane of ECs supports the fundamental possibility that of appearance of markers on cells that are not characteristic of this cell type. The appearance of membrane receptors that are unusual for this cell type can change cell behavior and cell response to external signals (if the cell has signal transmission paths from such receptors). We further established with flow cytometry that, after incubation of ECs of the EA.Hy926 cell line in the medium containing MVs derived from cells of the NK-92 cell line, transfer of intracellular protein labelled with fluorescent dye occurred (Supplementary Figure 5). In parallel, western blot analysis revealed the transfer of granzyme B to ECs (Figure 4). Our findings support the transfer of MV contents to ECs as occurring via fusion of the MV membrane with the EC cytoplasmic membrane. In this case, the MV membrane becomes a part of the EC membrane, and MV contents appear in EC cytoplasm. To determine the mechanisms for MV uptake by target cells, and in particular, the uptake of MVs produced by unstimulated NK cells of the NK-92 cell line by ECs of the EA.Hy926 cell line, further study of the specific MV formation is required. Also needed, is additional understanding of the functionally significant molecules contained in MVs that ensure signal transfer to target cells.

Granzyme B transmission by MVs derived from cells of the NK-92 cell line was accompanied by increased EC death. Thus, using flow cytometry and 7-AAD dye, we established that the pool of nonviable ECs was 29.9% (constitutive EC death was 6%) in the presence of MVs derived from cells of the NK-92 cell line. Being an active process, apoptosis can be triggered by external (exogenous pathway) or internal (endogenous pathway) factors. The exogenous

pathway is accomplished by ligand binding to a receptor on the cell surface. These receptors include the TNF $\alpha$  superfamily of Fas (CD95), TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 [70], TNF-R1 (CD120a) [76], DR5 (death receptor 5), and DR6 (death receptor 6) [3]. Ligand-receptor interactions lead to activation of an intracellular reaction cascade involving caspase-8 activating effector caspase-3, caspase-6 and caspase-7, which ensures cell death [3, 78]. The endogenous (mitochondrial, BCL-2-regulated) pathway is initiated in response to stressful situations such as DNA damage or lack of growth factors. The mitochondrial pathway of apoptosis activation is initiated by transcriptional and/or post-transcriptional upregulation of proapoptotic BH3-only members of the BCL-2 protein family. These proteins bind and inhibit BCL-2 pro-survival proteins, thereby promoting activation of BAX and BAK cell death effectors. BAX/BAK activation causes permeabilisation of the outer mitochondrial membrane followed by caspase-9 activation [5]. Caspase-9 activates effector caspase-3, caspase-6 and caspase-7, which causes cell death. We also described the involvement of mitochondrial p53 protein [68] in apoptosis induction. Protein p53 suppresses Bcl-2 and activates BAX factor. It should be pointed out that the exogenous and endogenous pathways are not always autonomous, as p53 can regulate the expression of some death receptors and the mitochondrial pathway can amplify signals associated with death receptors [3, 64].

Analysis of caspase activity in ECs after incubation with MVs derived from cells of the NK-92 cell line showed that caspase-8 activation up to the level of the p43/41 fragment occurs. No further proteolytic processing of the p43/41 fragment up to the p18 fragment occurs. Thus, contact-dependent apoptosis through Fas or TRAIL receptors remains activated and stopped at the level of the p43/41 fragment of caspase-8. The mature active caspase-8 p18 responsible for activation of subsequent effector caspases is not



**Figure 4. ECs of the EA.Hy926 cell line cultured with MVs derived from cells of the NK-92 cell line leads to granzyme B transfer from MVs to ECs**

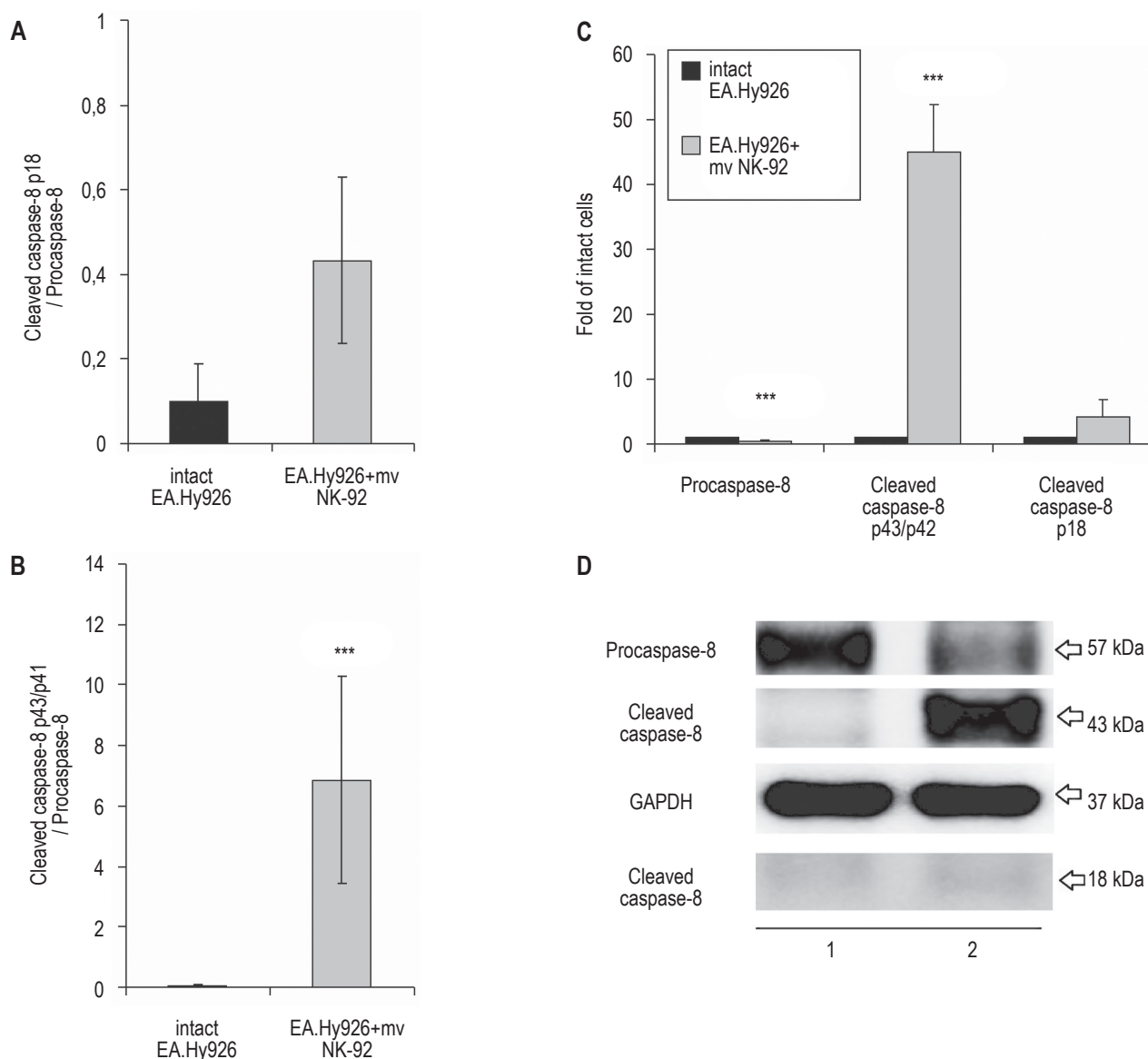
Note. (A) Representative immunoblot for granzyme B in cells of the NK-92 cell line (1) and in their MVs (2). (B) Representative immunoblot for granzyme B in unstimulated cells of the EA.Hy926 cell line (1) and after culture with MVs derived from cells of the NK-92 cell line (2).

formed. Absence of the second proteolytic stage in cleavage of the intermediate p43/41 fragment of caspase-8 may be due to increased c-FLIP<sub>L</sub> activity (cell caspase-8(FLICE)-like inhibitory protein). Caspase-8 activity in ECs depends on c-FLIP<sub>L</sub> [9]. This isoform contains a functionally inactive caspase-like domain that is sufficient to implement the first autocatalytic stage of procaspase-8 cleavage. However, FLIP<sub>L</sub> inhibits the second stage of caspase-8 activation (cleavage of the p43/41 fragment to form the p18 fragment), since it requires the presence of a catalytically active domain [37, 52]. EC treatment with sFasL can lead to increased FLIP expression and VEGF secretion, as well as promoting EC proliferation and migration [82]. A similar effect was shown with TRAIL, which at low concentrations increased c-FLIP<sub>L</sub> expression, and stimulated HUVEC proliferation and migration through implementation of the non-apoptotic functions of caspase-8 [9]. Despite this, we have established the fact of caspase-9 and effector caspase-3 activation. Our findings support the activation of caspase-3 by granzyme B via the mitochondrial pathway of apoptosis activation [44]. Earlier, we described the direct activation of caspase-3 by granzyme B [72] and established the transfer of granzyme B to ECs by MVs. This way of activation should not be ruled out.

Partial death was accompanied expectedly by a decrease in the number of ECs expressing VEGFR1, CD34, CD31, and CD119 receptors, while the intensity of the expression of these molecules remained unchanged. It should be pointed out that incubation with MVs derived from cells of the NK-92 cell line resulted not only in partial EC death, but also

in a change in phenotype of the ECs that remained viable. A decrease in the expression of CD105 by ECs indicates both shedding of this protein from the cell surface and a decrease in EC sensitivity to the inhibitory effect of TGF- $\beta$  [38]. Change in the intensity of CD34 and CD54 expression by ECs argues for EC activation [14, 31].

During EC culturing with MVs derived from cells of the NK-92 cell line, a dose-dependent decrease in EC proliferation compared with ECs cultured in a medium without MVs was shown. Concurrently, inhibition of EC migration due to the reduced number of cells that migrated to the zone of the disrupted monolayer was established only for the maximum MV concentration (20  $\mu$ g/100  $\mu$ L of medium). These findings can be explained by increased EC death in the presence of MVs derived from cells of the NK-92 cell line. Despite this, as a result of culturing ECs with MVs derived from cells of the NK-92 cell line (total protein content 2  $\mu$ g/100  $\mu$ L of medium), an increased proliferative activity of ECs occurred compared with EC culturing in a medium without MVs. Cells of the NK-92 cell line were cultured with IL-2. IL-2R signaling involved Lck, Jak, Fyn, Lyn, Syk, Ras, MAPK and PI3K in T cells. The MAPK and PI3K pathways participated in cell growth, differentiation and survival. ERK, a major member of the MAPK family, transduced mitogenic signals from the Ras/Raf/MEK pathway to the nucleus by activating transcription factors such as Elk-1 [32]. PI3K, which plays an important role in cell survival, induced activation of phosphatidylinositol-dependent kinase 1/2 and then activated AKT kinase [32]. AKT prevented apoptosis by disrupting the interaction between Bad and Bcl-2 or by activating the mammalian target of rapamycin (mTOR), which then phosphorylated p70 S6 kinase (S6K) leading to progression of the cell cycle. Using western blot analysis, we found ERK1/2 protein in cells of the NK-92 cell line and their MVs, which was consistent with the literature [32, 42]. We detected the presence of AKT in cells of the NK-92 cell line, which also corresponds with published works [32, 42], but we did not find it in the MVs produced by them. Extracellular signal regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) is involved in EC proliferation and angiogenesis [46]. Using mass spectrometry, we detected MEKKK 1 (MAPK/ERK kinase kinase kinase 1 encoded by the MAP4K1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 isoform 1) gene) in cells of the NK-92 cell line; we also found Mnk1 (MKNK1, MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1) in MVs derived from cells of the NK-92 cell line. However, the data obtained by mass spectrometry indicated possible candidates only and requires additional verification using enzyme linked immunosorbent assay or immunoblotting. Obviously, the proteins detected in MVs are also contained in the source cells



**Figure 5. Caspase-8 activation (defined as the ratio of caspase-8 fragment intensity to procaspase-8) in ECs of the EA.Hy926 cell line after culture with MVs derived from cells of the NK-92 cell line**

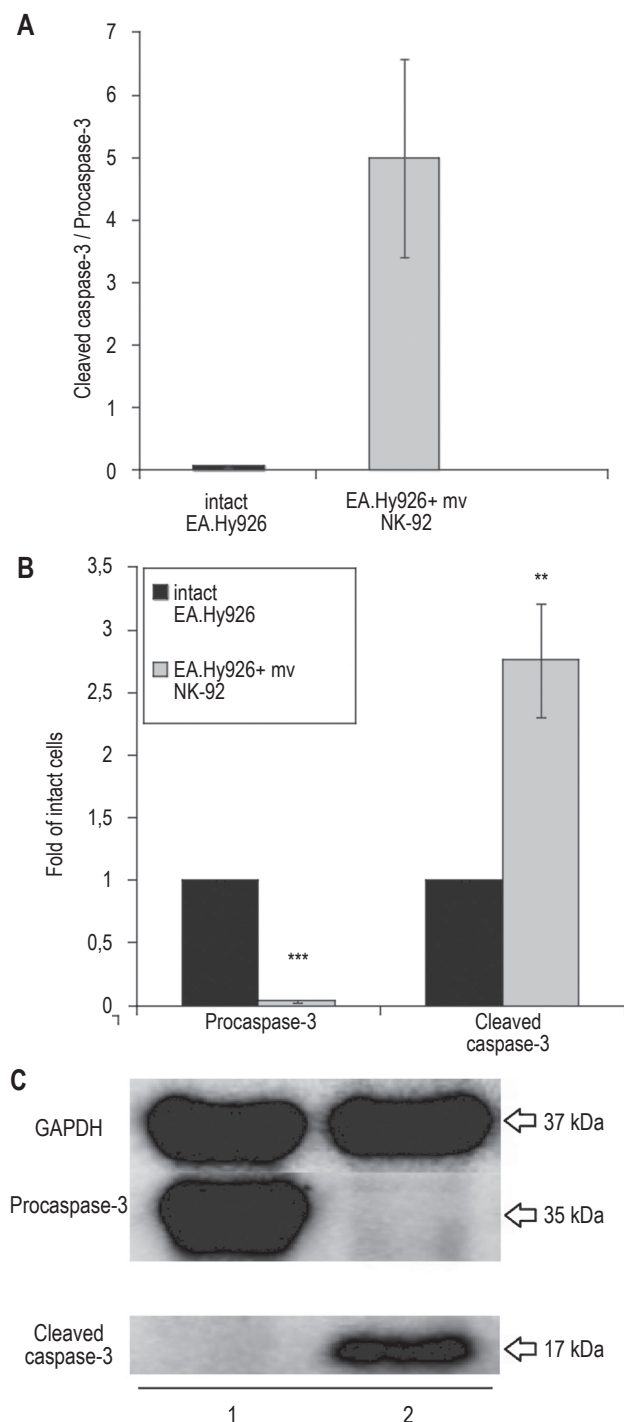
Note. (A) No difference in caspase-8 activation or procaspase-8 cleavage up to the p18 fragment of active caspase-8 was observed between the ECs after culture with MVs and unstimulated ECs. (B) EC treatment with MVs resulted in activation of caspase-8 and cleavage of procaspase-8 up to the p43/p41 fragment compared with unstimulated cells. (C) Quantitative assessment of procaspase-8, p43/p41 fragment and p18 fragment levels in ECs after culture with MVs. (D) Representative immunoblot demonstrating the effect of MVs derived from cells of the NK-92 cell line on the intensity of caspase-8 fragments (p43/p41 and p18) and procaspase-8 in ECs (1 – unstimulated ECs, 2 – ECs after culture with MVs). \*\*\*,  $p < 0.001$  – difference between the indicator in ECs after their culture with MVs and the indicator in unstimulated ECs.

themselves, although our mass spectrometric analysis did not detect these. This indicated that the mass spectrometric data we obtained were selective and thus did not reflect the general pool of MAP kinase pathway enzymes in MVs derived from cells of the NK-92 cell line. It has previously been shown that MEKKK 1 and Mnk1 are involved in regulation of proliferation [28, 43, 45, 60]. Thus, transfer of ERK and possibly MNK1 (but not AKT) from MVs derived from cells of the NK-92 cell line at a concentration

2  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  (i.e. 10 times lower than that which causes increased EC death) to ECs could lead to increased EC proliferation in our experiments.

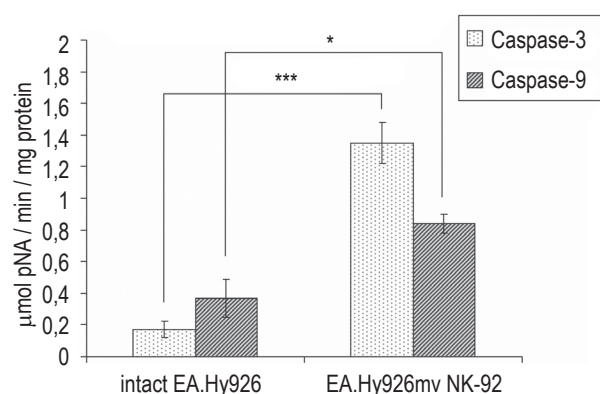
## Conclusion

Our findings indicate a significant difference in proteomic profiles of cells of the NK-92 cell line and the MVs produced by them. After contact between the MVs derived from cells of the NK-92 cell line and ECs, signal transmission takes place by means



**Figure 6. Caspase-3 activation (defined as the ratio of active caspase-3 to procaspase-3 fragment intensity) in ECs of the EA.Hy926 cell line after culture with MVs derived from cells of the NK-92 cell line**

Note. (A) EC treatment with MVs results in activation of caspase-3 as compared with unstimulated ECs. (B) Quantitative assessment of procaspase-3 and active caspase-3 fragment levels in ECs after culture with MVs. (C) Representative immunoblot demonstrating the effect of MVs on the intensity of cleaved caspase-3 fragments and on procaspase-3 in ECs (1 – unstimulated ECs, 2 – ECs after culture with MVs). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  – difference between the indicator in ECs after culture with MVs and the indicator in unstimulated ECs.



**Figure 7. Effect of MVs derived from cells of the NK-92 cell line on caspase-3 and caspase-9 activity in ECs of the EA.Hy926 cell line**

Note. Caspase-3 activity was assessed by spectrophotometric determination of p-nitroaniline (pNA) cleaved by caspase-3 and caspase-9 from the caspase-specific substrates, DEVD-pNA and Ac-LEHD-pNA, respectively. Activity was measured in  $\mu\text{mol}$  of released pNA/min/mg of total cell lysate protein. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  – difference between the indicator in ECs after culture with MVs and the indicator in unstimulated ECs.

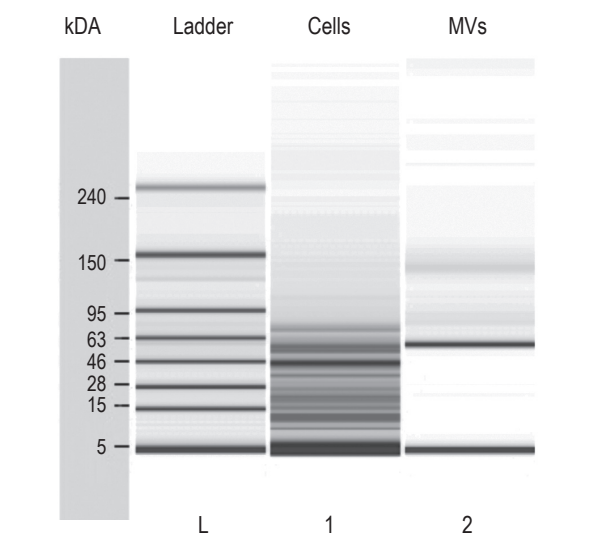
of MV fusion with the cytoplasmic membrane and content release into the cytosol. This was shown by the appearance of the panleukocyte marker CD45 on the EC membrane, as well as by the transfer of granzyme B and intracellular protein labelled with CFSE dye. Leukocyte marker transfer by NK cell-derived MVs onto the cytoplasmic membrane of ECs indicated the fundamental possibility of appearance of receptors on cells that are not characteristic of the cell type. The appearance of such receptors on ECs can change cell behavior and its response to external signals. Incubation with MVs derived from cells of the NK-92 cell line was accompanied not only by partial death of ECs, but also by a phenotype change in the ECs that remained viable. That is, the expression of CD105 decreased, while the expression of both CD34 and CD54 increased. MVs derived from cells of the NK-92 cell line contain proteins that can decrease migration or death of a target cell (granzyme B, for example), and are also able to transmit a proliferation stimulating signal to ECs. Further study is needed to clarify whether the factors activating apoptosis, inhibiting migration, affecting phenotype and stimulating proliferation are located in the same or different MVs. Our results suggest that regulation of EC behavior (including during angiogenesis) by NK cells can also be performed by the MVs that they produce.

## Acknowledgement

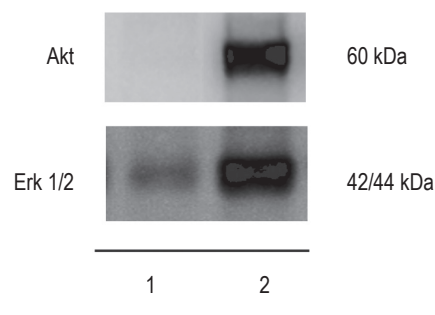
The authors thank V.A. Semyonov for assistance in managing cell cultures.

Supplementary Figure 1 – see 2<sup>nd</sup> page of cover.

Supplementary Figure 2, Supplementary Figure 3 – see 3<sup>rd</sup> page of cover.



**Supplementary Figure 4. Electrophoregrams of lysates of cells of the NK-92 cell line (cells) and their MVs (MVs)**

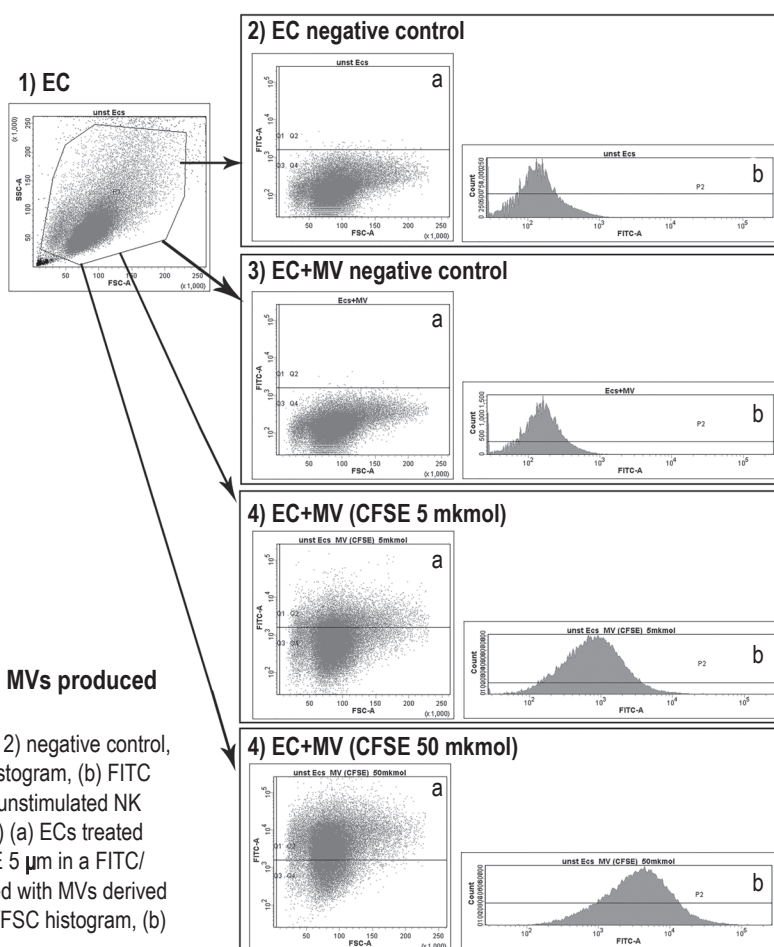


**Supplementary Figure 6. Representative immunoblots showing the content of ERK1/2, AKT in cells of the NK-92 cell line and their MVs**

Note. 1, MVs derived from cells of the NK-92 cell line; 2, cells of the NK-92 cell line.

**Supplementary Figure 5. ECs incubated with MVs produced by NK cells of the NK-92 cell line**

Note. 1) distribution of ECs in a FSC/SSC histogram; 2) negative control, (a) distribution of unstimulated ECs in a FITC/FSC histogram, (b) FITC histogram; 3) (a) ECs treated with MVs derived from unstimulated NK cells in a FITC/FSC histogram, (b) FITC histogram; 4) (a) ECs treated with MVs derived from NK cells pretreated with CFSE 5  $\mu$ m in a FITC/FSC histogram, (b) FITC histogram; 5) (a) ECs treated with MVs derived from NK cells pretreated with CFSE 50  $\mu$ m in a FITC/FSC histogram, (b) FITC histogram.



## Список литературы / References

1. Andreu Z., Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 442. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442.
2. Ardoin S.P., Shanahan J.C., Pisetsky D.S. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand. J. Immunol.*, 2007, Vol. 66, no. 2-3, pp. 159-165.
3. Ashkenazi A., Salvesen G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2014, Vol. 30, pp. 337-356.
4. Ashton S.V., Whitley G.S., Dash P.R., Wareing M., Crocker I.P., Baker P.N., Cartwright J.E. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, Vol. 25, no. 1, pp. 102-108.
5. Aubrey B.J., Kelly G.L., Janic A., Herold M.J., Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.*, 2018, Vol. 25, no. 1, pp. 104-113.
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, Vol. 72, pp. 248-254.
7. Budaj M., Poljak Z., Duris I., Kasko M., Imrich R., Kopani M., Maruscakova L., Hulin I. Microparticles: a component of various diseases. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2012, Vol. 122, Suppl. 1, pp. 24-29.
8. Burger D., Schock S., Thompson C.S., Montezano A.C., Hakim A.M., Touyz R.M. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2013, Vol. 124, no. 7, pp. 423-441.
9. Cantarella G., di Benedetto G., Ribatti D., Saccani-Jotti G., Bernardini R. Involvement of caspase 8 and c-FLIPL in the proangiogenic effects of the tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *FEBS J.*, 2014, Vol. 281, no. 5, pp. 1505-1513.
10. Chazara O., Xiong S., Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, Vol. 90, no. 4, pp. 703-716.
11. Colombo M., Raposo G., Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2014, Vol. 30, pp. 255-289.
12. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, 2001, Vol. 22, no. 11, pp. 633-640.
13. Dasgupta S.K., Abdel-Monem H., Niravath P., Le A., Bellera R.V., Langlois K., Nagata S., Rumbaut R.E., Thiagarajan P. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 6, pp. 1332-1339.
14. Delia D., Lampugnani M.G., Resnati M., Dejana E., Aiello A., Fontanella E., Soligo D., Pierotti M.A., Greaves M.F. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells *in vitro*. *Blood*, 1993, Vol. 81, no. 4, pp. 1001-1008.
15. Distler J.H., Huber L.C., Gay S., Distler O., Pisetsky D.S. Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. *Autoimmunity*, 2006, Vol. 39, no. 8, pp. 683-690.
16. Dondero A., Casu B., Bellora F., Vacca A., de Luisi A., Frassanito M.A., Cantoni C., Gaggero S., Olive D., Moretta A., Bottino C., Castriconi R. NK cells and multiple myeloma-associated endothelial cells: molecular interactions and influence of IL-27. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 21, pp. 35088-35102.
17. Dragovic R.A., Collett G.P., Hole P., Ferguson D.J., Redman C.W., Sargent I.L., Tannetta D.S. Isolation of syncytiotrophoblast microvesicles and exosomes and their characterisation by multicolour flow cytometry and fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis. *Methods*, 2015, Vol. 87, pp. 64-74.
18. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, Vol. 80, no. 12, pp. 3734-3737.
19. el Costa H., Tabiasco J., Berrebi A., Parant O., Aguerre-Girr M., Piccinni M.P., le Bouteiller P. Effector functions of human decidual NK cells in healthy early pregnancy are dependent on the specific engagement of natural cytotoxicity receptors. *J. Reprod. Immunol.*, 2009, Vol. 82, no. 2, pp. 142-147.
20. Evans-Osses I., Reichembach L.H., Ramirez M.I. Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction. *Parasitol. Res.*, 2015, Vol. 114, no. 10, pp. 3567-3575.
21. Fraser R., Whitley G.S., Thilaganathan B., Cartwright J.E. Decidual natural killer cells regulate vessel stability: implications for impaired spiral artery remodelling. *J. Reprod. Immunol.*, 2015, Vol. 110, pp. 54-60.
22. Gojova A., Barakat A.I. Vascular endothelial wound closure under shear stress: role of membrane fluidity and flow-sensitive ion channels. *J. Appl. Physiol.* (1985), 2005, Vol. 98, no. 6, pp. 2355-2362.
23. 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.
24. Halim A.T., Ariffin N.A., Azlan M. Review: the Multiple roles of monocytic microparticles. *Inflammation*, 2016, Vol. 39, no. 4, pp. 1277-1284.
25. Hanna J., Goldman-Wohl D., Hamani Y., Avraham I., Greenfield C., Natanson-Yaron S., Prus D., Cohen-Daniel L., Arnon T.I., Manaster I., Gazit R., Yutkin V., Benharroch D., Porgador A., Keshet E., Yagel S., Mandelboim O.

Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.*, 2006, Vol. 12, no. 9, pp. 1065-1074.

26. Hanna J., Wald O., Goldman-Wohl D., Prus D., Markel G., Gazit R., Katz G., Haimov-Kochman R., Fujii N., Yagel S., Peled A., Mandelboim O. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16<sup>+</sup> human natural killer cells. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 5, pp. 1569-1577.

27. Hemler M.E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2003, Vol. 19, pp. 397-422.

28. Imam J.S., Buddavarapu K., Lee-Chang J.S., Ganapathy S., Camosy C., Chen Y., Rao M.K. MicroRNA-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers. *Oncogene*, 2010, Vol. 29, no. 35, pp. 4971-4979.

29. Kalkunte S.S., Mselle T.F., Norris W.E., Wira C.R., Sentman C.L., Sharma S. Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 7, pp. 4085-4092.

30. Kalra H., Drummen G.P., Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 2, 170. doi: 10.3390/ijms17020170.

31. Kawakami A., Hida A., Yamasaki S., Miyashita T., Nakashima K., Tanaka F., Ida H., Furuyama M., Migita K., Origuchi T., Eguchi K. Modulation of the expression of membrane-bound CD54 (mCD54) and soluble form of CD54 (sCD54) in endothelial cells by glucosyl transferase inhibitor: possible role of ceramide for the shedding of mCD54. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, Vol. 296, no. 1, pp. 26-31.

32. Kawauchi K., Ihjima K., Yamada O. IL-2 increases human telomerase reverse transcriptase activity transcriptionally and posttranslationally through phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt, heat shock protein 90, and mammalian target of rapamycin in transformed NK cells. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 9, pp. 5261-5269.

33. Kim M., Park H.J., Seol J.W., Jang J.Y., Cho Y.S., Kim K.R., Choi Y., Lydon J.P., Demayo F.J., Shibuya M., Ferrara N., Sung H.K., Nagy A., Alitalo K., Koh G.Y. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. *EMBO Mol. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 9, pp. 1415-1430.

34. Komatsu F., Kajiwaru M. Relation of natural killer cell line NK-92-mediated cytotoxicity (NK-92-lysis) with the surface markers of major histocompatibility complex class I antigens, adhesion molecules, and Fas of target cells. *Oncol. Res.*, 1998, Vol. 10, no. 10, pp. 483-489.

35. Korenevskii A.V., Milyutina Y.P., Zhdanova A.A., Pyatygina K.M., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Mass-Spectrometric analysis of proteome of microvesicles produced by NK-92 natural killer cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, Vol. 165, no. 4, pp. 564-571.

36. Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primdal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Thery C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, Vol. 113, no. 8, pp. E968-E977.

37. Krueger A., Schmitz I., Baumann S., Krammer P.H., Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, no. 23, pp. 20633-20640.

38. Kumar S., Pan C.C., Bloodworth J.C., Nixon A.B., Theuer C., Hoyt D.G., Lee N.Y. Antibody-directed coupling of endoglin and MMP-14 is a key mechanism for endoglin shedding and deregulation of TGF-beta signaling. *Oncogene*, 2014, Vol. 33, no. 30, pp. 3970-3979.

39. Lash G.E., Robson S.C., Bulmer J.N. Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta*, 2010, Vol. 31 Suppl., pp. S87-S92.

40. Leonard S., Murrant C., Tayade C., van den Heuvel M., Watering R., Croy B.A. Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification – facts and hypotheses – a review. *Placenta*, 2006, Vol. 27, Suppl A, pp. S40-S46.

41. Li P., Kaslan M., Lee S.H., Yao J., Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 789-804.

42. Liang S., Zhang J., Wei H., Sun R., Tian Z. Differential roles of constitutively activated ERK1/2 and NF-kappa B in cytotoxicity and proliferation by human NK cell lines. *Int. Immunopharmacol.*, 2005, Vol. 5, no. 5, pp. 839-848.

43. Liang Y.J., Yang W.X. Kinesins in MAPK cascade: How kinesin motors are involved in the MAPK pathway? *Gene*, 2019, Vol. 684, pp. 1-9.

44. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, no. 5, pp. 361-370.

45. Liu K., He B., Xu J., Li Y., Guo C., Cai Q., Wang S. miR-483-5p targets MKNK1 to suppress Wilms' tumor cell proliferation and apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Med. Sci. Monit.*, 2019, Vol. 25, pp. 1459-1468.

46. Liu S., Yu D., Xu Z.P., Riordan J.F., Hu G.F. Angiogenin activates Erk1/2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, Vol. 287, no. 1, pp. 305-310.

47. Lugini L., Cecchetti S., Huber V., Luciani F., Macchia G., Spadaro F., Paris L., Abalsamo L., Colone M., Molinari A., Podo F., Rivoltini L., Ramoni C., Fais S. Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 6, pp. 2833-2842.

48. Male V., Sharkey A., Masters L., Kennedy P.R., Farrell L.E., Moffett A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 10, pp. 3017-3027.
49. Mandal A., Viswanathan C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.*, 2015, Vol. 8, no. 2, pp. 47-55.
50. Markov A.S., Markova K.L., Sokolov D.I., Selkov S.A., MARKMIGRATION. 2019: Russia.
51. Martinez-Lostao L., de Miguel D., Al-Wasaby S., Gallego-Lleyda A., Anel A. Death ligands and granulysin: mechanisms of tumor cell death induction and therapeutic opportunities. *Immunotherapy*, 2015, Vol. 7, no. 8, pp. 883-882.
52. Micheau O., Thome M., Schneider P., Holler N., Tschoep J., Nicholson D.W., Briand C., Grutter M.G. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, no. 47, pp. 45162-45171.
53. Mikhailova V.A. B.K.L., Vyazmina L.P., Sheveleva A.R., Selkov S.A., Sokolov D.I. Evaluation of microvesicles formed by natural killer (NK) cells using flow cytometry. *Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 251-254. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-251-254.
54. Mikhailova V.A., Ovchinnikova O.M., Zainulina M.S., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Detection of microparticles of leukocytic origin in the peripheral blood in normal pregnancy and preeclampsia. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2014, Vol. 157, no. 6, pp. 751-756.
55. Murphy K., Weaver C. Janeway's Immunology. Garland Science, Taylor & Francis Group, 2017. 924 p.
56. Naruse K., Lash G.E., Bulmer J.N., Innes B.A., Otun H.A., Searle R.F., Robson S.C. The urokinase plasminogen activator (uPA) system in uterine natural killer cells in the placental bed during early pregnancy. *Placenta*, 2009, Vol. 30, no. 5, pp. 398-404.
57. Okada H., Nakajima T., Sanzumi M., Ikuta A., Yasuda K., Kanzaki H. Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, Vol. 85, no. 12, pp. 4765-4770.
58. Osinska I., Popko K., Demkow U. Perforin: an important player in immune response. *Cent. Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 39, no. 1, pp. 109-115.
59. Philpott N.J., Scopes J., Marsh J.C., Gordon-Smith E.C., Gibson F.M. Increased apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance. *Exp. Hematol.*, 1995, Vol. 23, no. 14, pp. 1642-1648.
60. Pinto-Diez C., Garcia-Recio E.M., Perez-Morgado M.I., Garcia-Hernandez M., Sanz-Criado L., Sacristan S., Toledo-Lobo M.V., Perez-Mies B., Esteban-Rodriguez I., Pascual A., Garcia-Villanueva M., Martinez-Janez N., Gonzalez V.M., Martin M.E. Increased expression of MNK1b, the spliced isoform of MNK1, predicts poor prognosis and is associated with triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 17, pp. 13501-13516.
61. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.*, 2013, Vol. 200, no. 4, pp. 373-383.
62. Riesbeck K., Billstrom A., Tordsson J., Brodin T., Kristensson K., Dohlsten M. Endothelial cells expressing an inflammatory phenotype are lysed by superantigen-targeted cytotoxic T cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1998, Vol. 5, no. 5, pp. 675-682.
63. Robson A., Harris L.K., Innes B.A., Lash G.E., Aljunaidy M.M., Aplin J.D., Baker P.N., Robson S.C., Bulmer J.N. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J.*, 2012, Vol. 26, no. 12, pp. 4876-4885.
64. Schuler M., Green D.R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001, Vol. 29, Pt 6, pp. 684-688.
65. Sedgwick A.E., d'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic*, 2018, Vol. 19, no. 5, pp. 319-327.
66. Si Y., Chu H., Zhu W., Xiao T., Shen X., Fu Y., Xu R., Jiang H. Concentration-dependent effects of rapamycin on proliferation, migration and apoptosis of endothelial cells in human venous malformation. *Exp. Ther. Med.*, 2018, Vol. 16, no. 6, pp. 4595-4601.
67. Simak J., Gelderman M.P., Yu H., Wright V., Baird A.E. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J. Thromb. Haemost.*, 2006, Vol. 4, no. 6, pp. 1296-1302.
68. Singh R., Letai A., Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2019, Vol. 20, no. 3, pp. 175-193.
69. Smith S.D., Dunk C.E., Aplin J.D., Harris L.K., Jones R.L. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am. J. Pathol.*, 2009, Vol. 174, no. 5, pp. 1959-1971.
70. Smulski C.R., Decossas M., Chekkat N., Beyrath J., Willen L., Guichard G., Lorenzetti R., Rizzi M., Eibel H., Schneider P., Fournel S. Hetero-oligomerization between the TNF receptor superfamily members CD40, Fas and TRAILR2 modulate CD40 signalling. *Cell Death Dis.*, 2017, Vol. 8, no. 2, e2601. doi: 10.1038/cddis.2017.22.
71. Sokolov D.I., Ovchinnikova O.M., Korenkov D.A., Viknyanschuk A.N., Benken K.A., Onokhin K.V., Selkov S.A. Influence of peripheral blood microparticles of pregnant women with preeclampsia on the phenotype of monocytes. *Transl. Res.*, 2016, Vol. 170, pp. 112-123.
72. Susanto O., Trapani J.A., Brasacchio D. Controversies in granzyme biology. *Tissue Antigens*, 2012, Vol. 80, no. 6, pp. 477-487.

73. Svensson K.J., Christianson H.C., Wittrup A., Bourseau-Guilmain E., Lindqvist E., Svensson L.M., Morgelin M., Belting M. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 24, pp. 17713-17724.
74. Thornhill M.H., Li J., Haskard D.O. Leucocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA-hy-926. *Scand. J. Immunol.*, 1993, Vol. 38, no. 3, pp. 279-286.
75. van der Pol E., Coumans F.A., Grootemaat A.E., Gardiner C., Sargent I.L., Harrison P., Sturk A., van Leeuwen T.G., Nieuwland R. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J. Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 12, no. 7, pp. 1182-1192.
76. Vermeulen K., van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.*, 2005, Vol. 84, no. 10, pp. 627-639.
77. 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.
78. Wang M., Su P. The role of the Fas/FasL signaling pathway in environmental toxicant-induced testicular cell apoptosis: An update. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 2018, Vol. 64, no. 2, pp. 93-102.
79. Waters W.R., Harkins K.R., Wannemuehler M.J. Five-color flow cytometric analysis of swine lymphocytes for detection of proliferation, apoptosis, viability, and phenotype. *Cytometry*, 2002, Vol. 48, no. 3, pp. 146-152.
80. Xu R., Greening D.W., Zhu H.J., Takahashi N., Simpson R.J. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 126, no. 4, pp. 1152-1162.
81. Yao L., Sgadari C., Furuke K., Bloom E.T., Teruya-Feldstein J., Tosato G. Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Blood*, 1999, Vol. 93, no. 5, pp. 1612-1621.
82. Zhang C., Gao F., Teng F., Zhang M. Fas/FasL Complex promotes proliferation and migration of brain endothelial cells via FADD-FLIP-TRAF-NF-kappaB pathway. *Cell Biochem. Biophys.*, 2015, Vol. 71, no. 3, pp. 1319-1323.

---

**Авторы:**

**Маркова К.Л.** — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Михайлова В.А.** — старший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; ассистент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Корневский А.В.** — ведущий научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Милютин Ю.П.** — старший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

---

**Authors:**

**Markova K.L.**, Junior Research Associate, Cell Interactions Laboratory, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Mikhailova V.A.**, Senior Research Associate, Cell Interactions Laboratory, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Assistant Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Korenevsky A.V.**, Leading Research Associate, Cell Interactions Laboratory, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Milyutina Yu.P.**, Senior Research Associate, Cell Interactions Laboratory, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Родыгина В.В.** — студент лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Александрова Е.П.** — студент лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Марков А.С.** — сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

**Балабас О.А.** — сотрудник ресурсного центра «Методы анализа состава вещества» ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 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

**Соколов Д.И.** — д.б.н., заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Rodygina V.V.**, Student, Cell Interactions Laboratory, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Aleksandrova E.P.**, Student, Cell Interactions Laboratory, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Markov A.S.**, Cell Interactions Laboratory, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

**Balabas O.A.**, Compositional Analysis Methods Resource Center, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Selkov S.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head, Department of Immunology and Cell 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

**Sokolov D.I.**, PhD, MD (Biology), Head, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 17.10.2019  
Принята к печати 20.11.2019

Received 17.10.2019  
Accepted 20.11.2019

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНЕРИРУЕМЫХ *IN VITRO* ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК С СОДЕРЖАНИЕМ CD16<sup>+</sup> КЛЕТОК В ПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Тыринова Т.В.<sup>1, 2</sup>, Леплина О.Ю.<sup>1</sup>, Тихонова М.А.<sup>1</sup>, Сахно Л.В.<sup>1</sup>,  
Максимова А.А.<sup>1</sup>, Останин А.А.<sup>1</sup>, Черных Е.Р.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Институт медицины и психологии ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский  
государственный университет», г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** Циркулирующие моноциты представляют собой гетерогенную популяцию клеток, часть которых, наряду с классическим моноцитарным маркером CD14, экспрессирует молекулу CD16. Различия в фенотипе между субпопуляциями моноцитов могут сказываться на их функциональной активности, а также способности к дальнейшей дифференцировке в дендритные клетки (ДК), которые представляют собой профессиональные антигенпрезентирующие клетки и обеспечивают активацию иммунного ответа или, наоборот, поддерживают состояние иммунологической толерантности. Целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи между субпопуляционной принадлежностью моноцитов и функциональной активностью генерируемых из них дендритных клеток, а также их чувствительности к толерогенному действию дексаметазона. ДК генерировали в присутствии GM-CSF и IFN $\alpha$  из полученной методом магнитной сепарации обогащенной популяции CD14<sup>+</sup> моноцитов периферической крови с деплецией (CD16<sup>-</sup>Мо-ДК) и без деплеции CD16<sup>+</sup> клеток (CD16<sup>+</sup>Мо-ДК). CD16<sup>+</sup>Мо-ДК характеризовались более низкой способностью поглощать FITC-меченный декстран и более высокой способностью индуцировать пролиферативный ответ Т-клеток на аллоантигены по сравнению с CD16<sup>-</sup>Мо-ДК. Кроме того, CD16<sup>+</sup>Мо-ДК проявляли более выраженную апоптоз-индуцирующую активность против аутологичных CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и против аллогенных CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, но были сопоставимы с CD16<sup>-</sup>Мо-ДК по способности индуцировать апоптоз в аллогенных CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах. Уровень продукции TNF $\alpha$ , сходный для обоих типов ДК, находился в обратной взаимосвязи с аллостимуляторной активностью CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и прямо коррелировал с апоптоз-индуцирующей активностью CD16<sup>+</sup>Мо-ДК против аллогенных CD4<sup>+</sup>Т-клеток. CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК были также сопоставимы по уровню продукции IL-10, который обратно коррелировал с показателями аллостимуляторной активности обоих типов ДК. CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК были подвержены супрессорному эффекту дексаметазона, который проявлялся увеличением фагоцитарной активности, снижением способности стимулировать пролиферацию аутологичных и аллогенных Т-клеток и подавлением продукции TNF $\alpha$ . При этом в популяции CD16<sup>+</sup>Мо-ДК

### Адрес для переписки:

Тыринова Тамара Викторовна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 228-21-01.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: ct\_lab@mail.ru; tyrinova@bk.ru

### Address for correspondence:

Tyrinova Tamara V.  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaia str., 14.  
Phone: 7 (383) 228-21-01.  
Fax: 7 (383) 222-70-28.  
E-mail: ct\_lab@mail.ru; tyrinova@bk.ru

### Образец цитирования:

Тыринова Т.В., О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова,  
Л.В. Сахно, А.А. Максимова, А.А. Останин,  
Е.Р. Черных «Взаимосвязь функциональной  
активности генерируемых *in vitro* дендритных клеток  
с содержанием CD16<sup>+</sup> клеток в популяции моноцитов  
периферической крови» // Медицинская иммунология,  
2020. Т. 22, № 2. С. 269–280.  
doi: 10.15789/1563-0625-RBT-1924

© Тыринова Т.В. и соавт., 2020

### For citation:

T.V. Tyrinova, O.Yu. Leplina, M.A. Tikhonova, L.V. Sakhno,  
A.A. Maximova, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh "Relationship  
between the functional activity of *in vitro* generated monocyte-  
derived dendritic cells and the presence of CD16<sup>+</sup> cells among  
peripheral blood monocytes", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2,  
pp. 269–280. doi: 10.15789/1563-0625-RBT-1924

DOI: 10.15789/1563-0625-RBT-1924

регистрировались более выраженное увеличение эндоцитозной активности и снижение способности ДК стимулировать пролиферацию CD4<sup>+</sup>T-клеток в ауто-СКЛ. Кроме того, обработка дексаметазоном CD16<sup>+</sup>Mo-ДК сопровождалась увеличением проапоптогенной активности ДК против аутологичных CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Таким образом, присутствие в пуле моноцитов CD16<sup>+</sup> клеток влияет на свойства генерируемых из них IFN $\alpha$ -индуцированных ДК и их чувствительность к иммунорегуляторному действию дексаметазона.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, классические моноциты, альтернативные моноциты, интерферон альфа, дексаметазон

## RELATIONSHIP BETWEEN THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF *IN VITRO* GENERATED MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS AND THE PRESENCE OF CD16<sup>+</sup> CELLS AMONG PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES

Tyrinova T.V.<sup>a, b</sup>, Leplina O.Yu.<sup>a</sup>, Tikhonova M.A.<sup>a</sup>, Sakhno L.V.<sup>a</sup>, Maximova A.A.<sup>a</sup>, Ostanin A.A.<sup>a</sup>, Chernykh E.R.<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** Peripheral blood monocytes are heterogeneous CD14<sup>+</sup> cell population, some of which also express CD16 molecule. Differences in phenotype between monocyte subpopulations can affect their functional activity, as well as the ability to further differentiate into dendritic cells (DCs). DCs are professional antigen-presenting cells which induce the immune response or, conversely, maintain the immunological tolerance. The aim of the present study was to analyze the relationship between monocyte subpopulations and the functional activity of monocyte-derived DCs, as well as DC sensitivity to the tolerogenic effect of dexamethasone. DCs were generated by cultivating enriched fractions of CD14<sup>+</sup> monocytes with or without CD16<sup>+</sup> cell depletion (CD16<sup>-</sup>Mo-DCs or CD16<sup>+</sup>Mo-DCs, respectively) in the presence of IFN $\alpha$  and GM-CSF. Monocyte subpopulations were obtained by immunomagnetic negative selection. CD16<sup>+</sup>Mo-DCs were characterized by lower ability to take up FITC-dextran and higher allostimulatory activity compared to CD16<sup>-</sup>Mo-DCs. In addition, CD16<sup>+</sup>Mo-DCs showed higher apoptosis-inducing activity against autologous CD4<sup>+</sup>T lymphocytes and allogeneic CD8<sup>+</sup>T lymphocytes, but were similar to CD16<sup>-</sup>Mo-DCs in their ability to induce apoptosis in allogeneic CD4<sup>+</sup>T lymphocytes. TNF $\alpha$  production level, similar for both types of DCs, was negatively correlated with CD16<sup>-</sup>Mo-DC allostimulatory activity and directly correlated with apoptosis-inducing activity of CD16<sup>+</sup>Mo-DCs towards allogeneic CD4<sup>+</sup>T cells. CD16<sup>-</sup>Mo-DCs and CD16<sup>+</sup>Mo-DCs were similar by their IL-10 production, which was inversely related to allostimulatory activity of both types of DCs. Dexamethasone increased endocytic activity, decreased the ability to stimulate autologous and allogeneic T cells, inhibited TNF $\alpha$  production of CD16<sup>-</sup>Mo-DCs and CD16<sup>+</sup>Mo-DCs. However, CD16<sup>+</sup>Mo-DCs demonstrated a more pronounced increase in endocytic activity and more dramatic decrease in their ability to stimulate the proliferation of CD4<sup>+</sup>T cells in auto-MLR. Also, addition of dexamethasone into CD16<sup>+</sup>Mo-DCs cultures led to the increase in DC pro-apoptogenic activity against autologous CD8<sup>+</sup>T lymphocytes. Thus, the presence of CD16<sup>+</sup> cells among monocyte population affects the properties of IFN $\alpha$ -induced monocyte-derived DCs and DC sensitivity to the immunomodulatory effects of dexamethasone.

**Keywords:** dendritic cells, classical monocytes, non-classical monocytes, interferon-alpha, dexamethasone

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00215 А.

### Введение

Моноциты представляют собой гетерогенную популяцию клеток костномозгового происхождения, которые играют важную роль в поддержа-

нии тканевого гомеостаза и иммунитета и являются системным резервуаром предшественников для клеток миелоидной линии, прежде всего дендритных клеток (ДК) [6, 22]. Моноциты дифференцируются в ДК *in vivo* при различных патологических состояниях, ассоциированных с воспалением, включая инфекции и аутоиммунные заболевания [17, 22]. В настоящее время выделя-

ют три основные субпопуляции циркулирующих моноцитов. Основную долю составляют классические моноциты с фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток, которые способны поддерживать пул ДК в норме и первыми мигрировать в зону воспаления или повреждения [19]. Два других типа, включая промежуточные (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, 2-8%) и неклассические (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, 2-11%) моноциты, экспрессирующие молекулу CD16, составляют минорную долю моноцитов. Роль этих моноцитов до конца не изучена, однако показано, что при различных патологиях (аутоиммунные заболевания, вирусная инфекция, опухолевый рост, хроническое воспаление) количество CD16<sup>+</sup> моноцитов возрастает [6, 12]. Несмотря на проводимые исследования, до сих пор неясно, могут ли различные субпопуляции моноцитов детерминировать функциональные особенности генерируемых из них ДК. Этот вопрос имеет важное значение, поскольку ДК, будучи высокоспециализированными антигенпрезентирующими клетками, играют важную роль как в запуске иммунного ответа, так и индукции толерантности. Однако взаимосвязь отдельных субпопуляций моноцитов с формированием иммуностимуляторных и толерогенных свойств ДК остается малоизученной.

Проведенные нами ранее исследования показали, что в присутствии IFN $\alpha$  ДК, полученные из моноцитов, содержащих CD16<sup>+</sup> клетки (CD16<sup>+</sup>Мо-ДК), характеризовались более зрелым фенотипом по сравнению с ДК, полученными из популяции моноцитов с деплецией CD16<sup>+</sup> клеток (CD16<sup>-</sup>Мо-ДК), что может обуславливать более высокую иммуностимуляторную активность ДК и иметь важное значение для индукции иммунного ответа. С другой стороны, было показано, что ингибирующий эффект дексаметазона на дифференцировку и созревание ДК более выражен в культурах CD16<sup>+</sup>Мо-ДК [2]. В связи с этим можно предположить, что переключение иммуностимуляторных свойств IFN-ДК в сторону регуляторных свойств под влиянием дексаметазона связано с популяцией CD16<sup>+</sup> моноцитов.

**Целью настоящей работы** явилось дальнейшее сравнительное исследование функциональной активности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК и их чувствительности к толерогенному действию дексаметазона. Выбор в качестве толерогенного стимула глюкокортикоидов был обусловлен их важной ролью в стресс-индуцированной иммуносупрессии и активном использовании в качестве терапевтического средства [7].

## Материалы и методы

В исследование были включены 39 здоровых доноров обоего пола в возрасте от 20 до 62 лет. Забор крови и все исследования проводили по-

сле получения письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. Для выделения моноцитов из полученной взвеси МНК использовали наборы магнитных бус (Easy Sep<sup>TM</sup>, STEMCELL Technologies Inc.), позволяющие получить популяции CD14<sup>+</sup> моноцитов с деплецией (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> моноциты) и без деплеции CD16<sup>+</sup> клеток (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноциты). Магнитную сепарацию осуществляли согласно инструкциям производителя. Контроль чистоты выделенных субпопуляций моноцитов проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием FITC-конъюгированных анти-CD14- и Ре-конъюгированных анти-CD16-антител (BD PharMingen, США). Содержание CD14<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> моноцитов во фракции CD14<sup>+</sup> моноцитов с деплецией CD16<sup>+</sup> клеток составляло 81,1 $\pm$ 3,2 и 3,4 $\pm$ 0,8% соответственно, а во фракции CD14<sup>+</sup> моноцитов без деплеции CD16<sup>+</sup> клеток — 73,6 $\pm$ 4,5 и 22,3 $\pm$ 2,9% соответственно.

ДК генерировали путем культивирования выделенных CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов в 6-луночных планшетах (Nuncclon, Дания) в течение 3-4 суток в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS, БиолоТ, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN $\alpha$  (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария). Для индукции созревания ДК на 4 сутки вносили липополисахарид (ЛПС, 10 мкг/мл, LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich) и продолжали культивировать в течение 24 ч. В отдельной серии экспериментов на этапе дифференцировки за сутки до внесения ЛПС в культуры ДК добавляли дексаметазон (10<sup>-6</sup> М).

Способность ДК к захвату антигена оценивали по поглощению полимера глюкозы FITC-декстран (1 мкг/мл; Sigma, США) при +4 °С (контроль) и при +37 °С в течение 1 ч. После инкубации ДК трижды отмывали холодным забуференным физиологическим раствором (ЗФР), окрашивали Ре-меченными анти-HLA-DR-антителами (BD PharMingen, США) и оценивали внутриклеточную экспрессию FITC-Декстрана в гейте HLA-DR<sup>+</sup> клеток методом проточной цитометрии.

Стимуляторную активность IFN-ДК оценивали в аутологичной и аллогенной смешанной культуре лейкоцитов (ауто- и алло-СКЛ, соответственно), используя в качестве отвечающих клеток аутологичные или аллогенные МНК доноров (0,1  $\times$  10<sup>6</sup>/лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде

RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови АВ(IV) группы при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Стимуляторами служили ДК в соотношении МНК:ДК = 10:1. Пролиферативный ответ оценивали на 5 сутки радиометрически по включению <sup>3</sup>H-тимидина (1 мКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Для оценки влияния ДК на пролиферативную активность субпопуляций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток аутологичные и аллогенные МНК окрашивали витальным красителем CFSE (5(6)-carboxyfluoresceindiacetate N-succinimidyl ester; 2 мМ, Sigma-Aldrich, США) и сокультивировали в СКЛ (0,1 × 10<sup>6</sup>/лунку) с ДК в соотношении МНК:ДК = 10:1 в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови АВ(IV) группы при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 5 суток. Культуры дублировали в 12 идентичных повторях с целью получения клеток в количестве, достаточном для проведения цитофлуориметрического анализа. По завершении культивирования клетки окрашивали PE-меченными анти-CD3-, APC-меченными анти-CD4- и PerCP-меченными анти-CD8-антителами (BD Pharmingen, США). Анализ пролиферативного ответа МНК проводили методом проточной цитометрии в гейтах CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов по уменьшению интенсивности флуоресценции красителя CFSE. Результат выражали в виде процентного содержания делящихся клеток к общему количеству клеток в исследуемой области.

Уровень апоптоза Т-лимфоцитов оценивали в ауто- и алло-СКЛ при культивировании в течение 72 ч МНК доноров (0,1 × 10<sup>6</sup>/лунку) в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии ДК в соотношении МНК:ДК = 10:1. Культуры дублировали в 12 идентичных повторях с целью получения клеток в количестве, достаточном для проведения цитофлуориметрического анализа. Апоптоз Т-клеток оценивали после окончания культивирования методом проточной цитометрии в гейте CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток по связыванию с APC-меченным Annexin V (признак раннего апоптоза) и PI (признак позднего апоптоза/некроза) согласно инструкции фирмы-производителя (BD Pharmingen, США).

Концентрацию продуцируемых цитокинов TNFα и IL-10 в супернатантах полученных ДК определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы (АО «Вектор-Бест», Россия). Анализ уровня продукции цитокинов в цельных супернатантах культур IFN-ДК проводился в пересчете на 10<sup>5</sup> ДК.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ

Statistica 6.0. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический W-критерий Вилкоксона (для связанных парных выборок). Для анализа взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (r<sub>s</sub>). Различия считали достоверными при уровне значимости p < 0,05.

## Результаты

Поскольку одним из функциональных признаков зрелости ДК является их поглотительная активность, нами была проведена оценка способности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК к эндцитозу. Несмотря на то, что оба типа ДК активно захватывали FITC-меченный декстран (рис. 1А), популяция CD16<sup>+</sup>Мо-ДК отличалась меньшим относительным количеством ДК, содержащих внутриклеточно декстран (p = 0,07). При этом интенсивность флуоресценции внутриклеточного содержания FITC-декстрана в сравниваемых типах ДК была сопоставима (Ме 443 vs 475 ед. фл.).

Одна из ключевых функций ДК в иммунном ответе заключается в их способности презентировать антигены и активировать Т-клетки. Как видно из рисунка 1Б, CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК эффективно стимулировали пролиферативную активность Т-клеток в ауто- и алло-СКЛ. Стимуляторная активность изучаемых типов ДК была сопоставима в ауто-СКЛ, однако CD16<sup>+</sup>Мо-ДК отличались значимо более высокой способностью индуцировать пролиферативный ответ Т-клеток на аллоантигены по сравнению с CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (p = 0,037).

Анализ пролиферативного ответа в субпопуляциях лимфоцитов показал, что в культурах ауто-СКЛ CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК с одинаковой интенсивностью стимулировали пролиферацию CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и практически не индуцировали пролиферации CD8<sup>+</sup>Т-клеток (рис. 1В). Индекс пролиферации CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов составлял 1,08 и 1,09 расч. ед. (Ме) в случае активации CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК соответственно. При этом CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК эффективно (индекс пролиферации > 3,5 расч. ед.) стимулировали пролиферацию аллогенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в алло-СКЛ (рис. 1Г).

Наряду со стимулирующим эффектом ДК обладают способностью ограничивать иммунный ответ, одним из механизмов которой является активационно-индуцированный апоптоз Т-клеток при их взаимодействии с ДК [5]. Как видно из рисунка 1Д, Е, стимуляция МНК дендритными клетками сопровождалась возрастанием доли апоптотических CD4<sup>+</sup>Т-клеток в ауто- и алло-СКЛ. Эти изменения были более выражены и статистически значимы в алло-СКЛ (рис. 1Е), тогда как в ауто-СКЛ проявлялись в виде отчет-

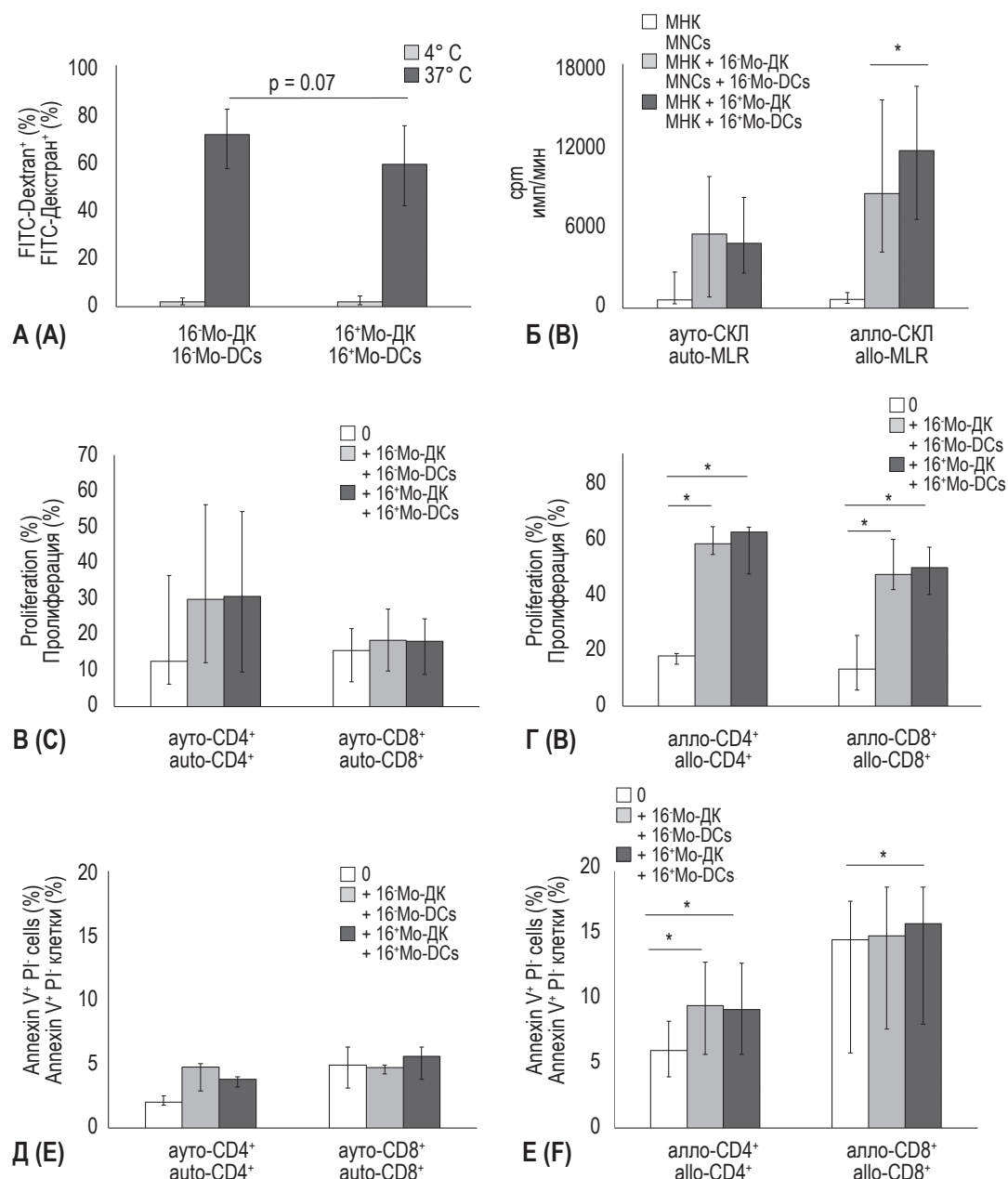
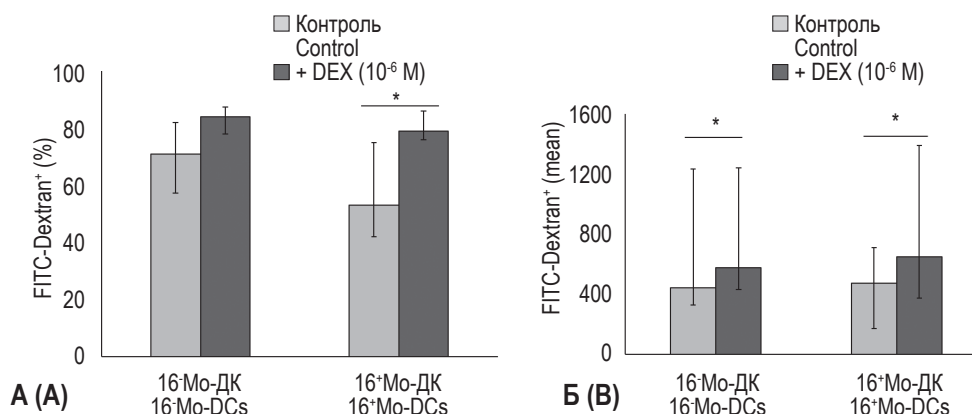


Рисунок 1. Функциональная активность IFN-ДК, генерированных из CD16<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> моноцитов

Примечание. В виде медианных (Me) и интерквартильного диапазона значений представлены: А – относительное количество клеток (%) указанных типов IFN-ДК (n = 5), поглотивших в течение 1 ч FITC-меченный декстран при 4 °C (контроль) и 37 °C; Б – пролиферативный ответ (имп/мин) МНК в ауто-СКЛ (n = 12) и алло-СКЛ (n = 20) в отсутствие IFN-ДК (МНК) и присутствии указанных типов IFN-ДК; В, Г – пролиферативный ответ CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в ауто-СКЛ (В; n = 4) и алло-СКЛ (Г; n = 9), оцениваемый цитофлуориметрически по окраске CFSE в отсутствие IFN-ДК (0) и присутствии указанных типов IFN-ДК; Д, Е – относительное количество (%) апоптотических CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов среди нестимулированных МНК (0), а также в присутствии указанных типов аутологических (Д; n = 5) и аллогенных (Е; n = 11) IFN-ДК. \* p<sub>w</sub> < 0,05 – достоверность различий между показателями.

Figure 1. The functional activity of CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup> monocyte-derived IFN-DCs

Note. The data are presented in the form of median (Me) and interquartile range (IQR) of (A) the relative number (%) of signed subtypes of IFN-DCs (n = 5) captured FITC-conjugated dextran for 1 h at a temperature of 4 °C (control) and 37 °C; (B) the proliferative response of MNCs in auto-MLR (n = 12) and allo-MLR (n = 20) test (cpm) in the absence of IFN-DCs (MNCs) and in the presence of signed subtypes of IFN-DCs; (C, D) the proliferative response of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in auto-MLR (C; n = 4) and allo-MLR (D; n = 9) evaluated using CFSE dye in the absence of IFN-DCs (0) and in the presence of signed subtypes of IFN-DCs; (E, F) the relative number (%) of apoptotic CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes among non-stimulated MNCs (0) and in the presence of signed subtypes of autologous (E; n = 5) and allogeneic (F; n = 11) IFN-DCs. \* p<sub>w</sub> < 0.05, differences between groups.



**Рисунок 2. Поглотительная активность IFN-ДК, генерированных из CD16<sup>-</sup> и CD16<sup>+</sup> моноцитов**

**Примечание.** Данные представлены в виде медианных (Me) и интерквартильного диапазона значений относительного количества клеток (А) и средней интенсивности флуоресценции (Б) в популяциях CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, генерированных в стандартных условиях (контр) и в присутствии дексаметазона [+ DEX (10<sup>-6</sup> M)], поглотивших в течение 1 ч FITC-меченный декстран при 37 °С (контроль поглотительной активности ДК при 4 °С не указан). n = 6; \* p<sub>w</sub> < 0,05 – достоверность различий между показателями.

Figure 2. Endocytic activity of CD16<sup>-</sup> and CD16<sup>+</sup> monocyte-derived IFN-DCs

Note. The data are presented in the form of median (Me) and interquartile range (IQR) of the relative cell number (A) and mean fluorescence (B) in CD16<sup>-</sup>Mo-DCs and CD16<sup>+</sup>Mo-DCs generated under standard conditions (control) and in the presence of dexamethasone [+ DEX (10<sup>-6</sup> M)] captured FITC-conjugated dextran for 1 h at a temperature 37 °C (negative control cells at 4 °C not shown). n = 6; \* p<sub>w</sub> < 0.05, differences between groups.

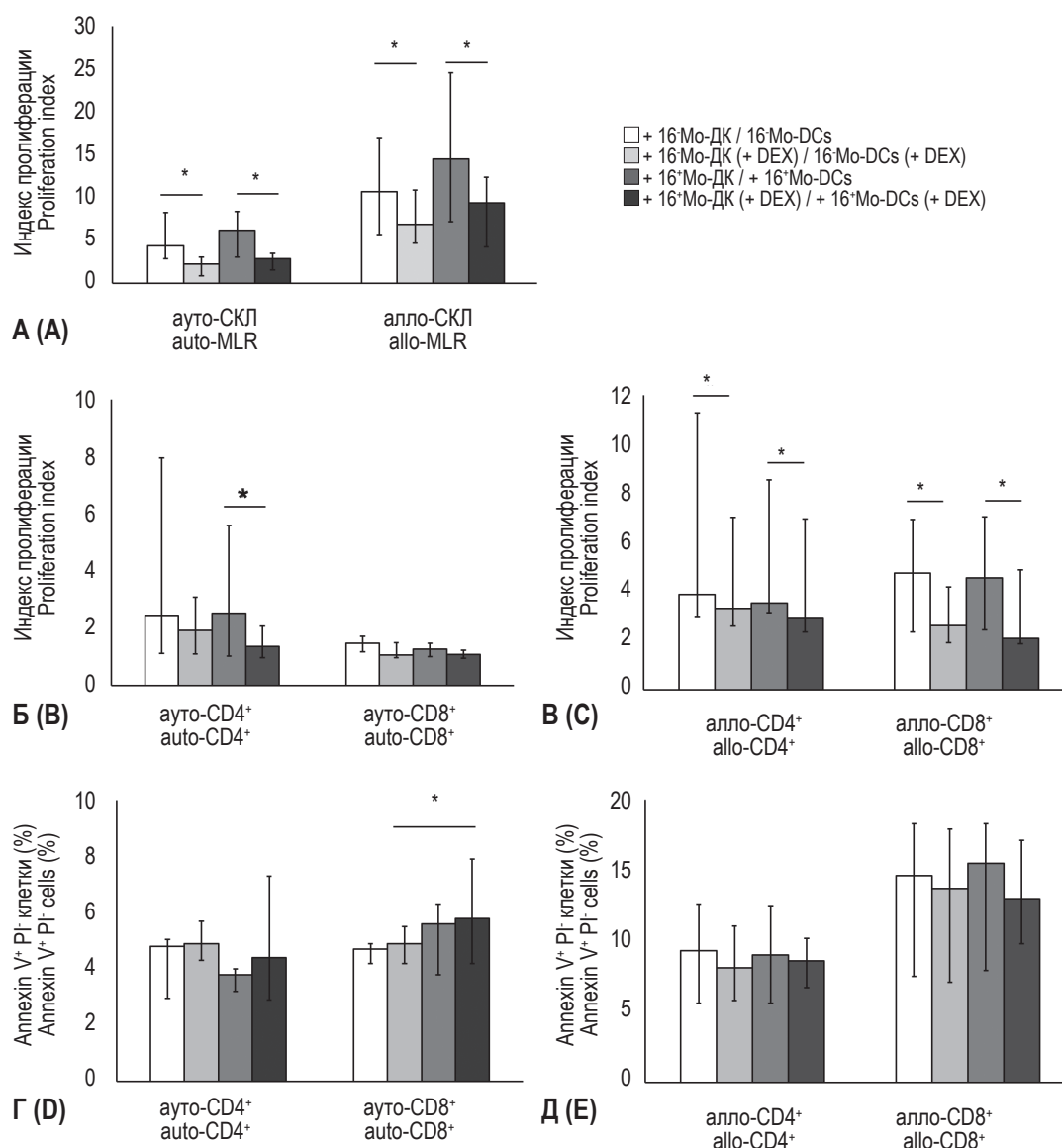
ливого тренда (рис. 1Д; p = 0,07 для обоих типов ДК). Оба типа ДК не индуцировали апоптоз CD8<sup>+</sup>T-клеток в ауто-СКЛ, поскольку не активировали пролиферацию этих клеток (рис.1 Д). В алло-СКЛ количество апоптотических CD8<sup>+</sup>T-клеток значимо возрастало при сокультивировании с CD16<sup>+</sup>Мо-ДК (p = 0,03) и на уровне тренда – с CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (p = 0,09).

Важным фактором в развитии иммунного ответа является способность ДК продуцировать цитокины, во многом определяющих стимуляторный или толерогенный потенциал ДК. CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК были сопоставимы по продукции провоспалительного цитокина TNFα (Me 1027 и 1104 пг/мл, соответственно) и противовоспалительного цитокина IL-10 (Me 108 и 105 пг/мл, соответственно). Отметим, что уровень продукции IL-10 обратно коррелировал с показателями аллостимуляторной активности как CD16<sup>-</sup>Мо-ДК, так и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК (r<sub>s</sub> = -0,780; p = 0,013 и r<sub>s</sub> = -0,703; p = 0,034 соответственно). В то же время значимая обратная корреляционная связь между продукцией TNFα и аллостимуляторной активностью выявлялась только для CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (r<sub>s</sub> = -0,695; p = 0,038), а прямая взаимосвязь между уровнем продукции TNFα и апоптоз-индуцирующей активностью ДК против аллогенных CD4<sup>+</sup>T-клеток (r<sub>s</sub> = 0,677; p = 0,022) регистрировалась для CD16<sup>+</sup>Мо-ДК.

Вторая часть исследования была посвящена сравнительному анализу влияния дексаметазона на свойства CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. До-

бавление дексаметазона в культуры ДК сопровождалось увеличением их способности к эндоцитозу (рис. 2А). Наиболее выраженные изменения были характерны для CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, среди которых количество FITC-декстран-позитивных клеток возрастало в среднем на 50% (IQR 15-81%; p = 0,04). CD16<sup>-</sup>Мо-ДК были менее чувствительны к действию дексаметазона, и их способность поглощать декстран возрастала в среднем только на 23% (IQR 2-49%; p = 0,068). Наряду с увеличением доли FITC-декстран-позитивных ДК добавление дексаметазона приводило к увеличению средней интенсивности флуоресценции FITC-меченного декстрана в обоих типах ДК (p = 0,043 и p = 0,043; рис. 2Б). Следует отметить, что если интактные CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК различались по поглотительной способности, то после обработки дексаметазоном указанные типы ДК становились сопоставимыми по поглотительной активности (Me 84 и 79%). Соответственно, влияние дексаметазона на эндоцитозную активность CD16<sup>+</sup>Мо-ДК было значимо выше по сравнению с таковым для CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (Me индекса влияния дексаметазона 1,97 vs 1,3 расч. ед.; p = 0,043).

Анализ стимуляторной активности интактных и дексаметазон-модифицированных ДК в радиометрическом тесте (рис. 3А) показал, что дексаметазон подавлял способность обоих типов ДК стимулировать пролиферативный ответ МНК в ауто- и алло-СКЛ (p < 0,05 для всех типов СКЛ). При исследовании эффектов дексаметазона на пролиферацию отдельных субпопуляций

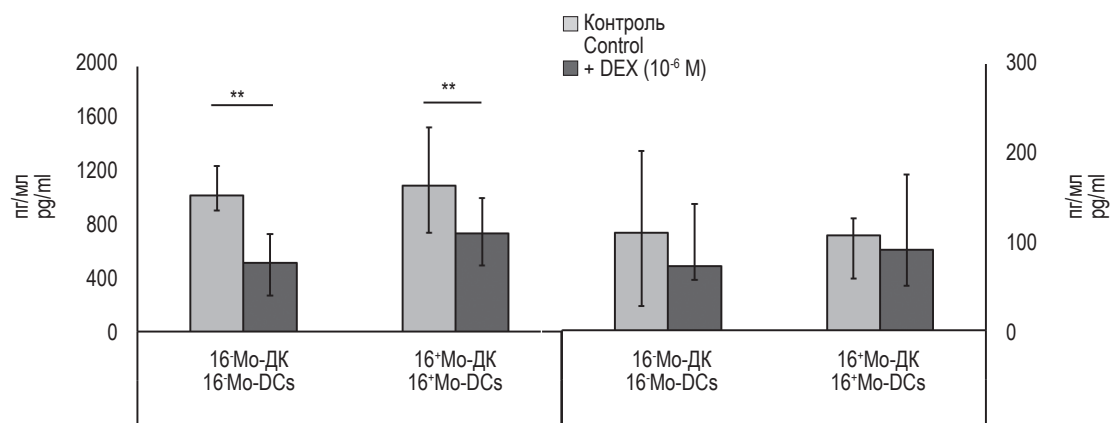


**Рисунок 3. Влияние дексаметазона на функциональную активность IFN-ДК, генерированных из CD16<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> моноцитов**

**Примечание.** Для популяций CD16<sup>+</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, генерированных в стандартных условиях и в присутствии дексаметазона (+ DEX), в виде медианных (Me) и интерквартильного диапазона значений представлены данные: А – индексов пролиферации МНК в ауто-СКЛ (n = 12) и алло-СКЛ (n = 20) в присутствии указанных типов IFN-ДК; Б, В – индексов пролиферации CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в ауто-СКЛ (Б; n = 4) и алло-СКЛ (В; n = 9), оцениваемой цитофлуориметрически по окраске CFSE в присутствии указанных типов IFN-ДК; Г, Д – относительного количества апоптотических CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в присутствии указанных типов аутологичных (Г; n = 5) и аллогенных (Д; n = 11) IFN-ДК. Индекс пролиферации рассчитывался индивидуально как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии указанных типов ДК к пролиферативному ответу МНК в отсутствие ДК. \* p<sub>w</sub> < 0,05 – достоверность различий между показателями.

Figure 3. The effect of dexamethasone on the functional activity of CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup> monocyte-derived IFN-DCs

Note. For CD16<sup>+</sup>Mo-DCs and CD16<sup>+</sup>Mo-DCs generated under standard conditions and in the presence of dexamethasone (+ DEX), the data are presented in the form of median (Me) and interquartile range (IQR) of (A) the indexes of proliferation of MNCs in auto-MLR (n = 12) and allo-MLR (n = 20) in the presence of signed subtypes of IFN-DCs; (B, C) the indexes of proliferation of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in auto-MLR (B; n = 4) and allo-MLR (C; n = 9) in the presence of signed subtypes of IFN-DCs; (D, E) the relative number of apoptotic CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in the presence of signed subtypes of autologous (D; n = 5) and allogeneic (E; n = 11) IFN-DCs. The proliferation index was calculated as the ratio of the proliferative response of MNCs in the presence of DCs to the proliferative response of MNCs in the absence of DCs. \* p<sub>w</sub> < 0.05, differences between groups.



**Рисунок 4.** Влияние дексаметазона на продукцию цитокинов в культурах IFN-ДК, генерированных из CD16<sup>+</sup> и CD16<sup>-</sup> моноцитов

**Примечание.** Данные представлены в виде медианных (Me) и интерквартильного диапазона значений концентрации TNFα (n = 13) и IL-10 (n = 11) в супернатантах цельных культур CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, генерированных в стандартных условиях (контр) и в присутствии дексаметазона [+ DEX (10<sup>-6</sup> M)]. \*\* p<sub>w</sub> < 0,01 – достоверность различий между показателями.

Figure 4. The effect of dexamethasone on the cytokine production by CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> monocyte-derived IFN-DCs

Note. The data are presented in the form of median (Me) and interquartile range (IQR) of TNFα (n = 13) and IL-10 (n = 11) concentration in the culture supernatants of CD16<sup>-</sup>Mo-DCs and CD16<sup>+</sup>Mo-DCs generated under standard conditions (control) and in the presence of dexamethasone [+ DEX (10<sup>-6</sup> M)]. \*\* p<sub>w</sub> < 0.01, differences between groups.

Т-клеток было показано, что обработка дексаметазоном CD16<sup>+</sup>Мо-ДК достоверно подавляла их способность стимулировать пролиферацию CD4<sup>+</sup>Т-клеток в ауто-СКЛ (Me супрессии 31% (IQR 5-58%); p = 0,043), тогда как модификация дексаметазоном CD16<sup>-</sup>Мо-ДК значимо не снижала их стимуляторную активность (рис. 3Б). Соответственно, CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, генерированные в присутствии дексаметазона, обладали меньшей стимуляторной активностью по сравнению с аналогичными культурами CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (Me индекса пролиферации 1,37 vs 1,94 расч. ед.; p = 0,06). При этом как интактные, так и дексаметазон-модифицированные CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК не индуцировали пролиферацию аутологичных CD8<sup>+</sup>Т-клеток (рис. 3Б).

В алло-СКЛ дексаметазон-модифицированные CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК характеризовались умеренным (но статистически значимым) уменьшением стимуляторной активности в отношении CD4<sup>+</sup>Т-клеток и более выраженным снижением способности стимулировать пролиферацию CD8<sup>+</sup>Т-клеток (рис. 3В). Снижение аллостимуляторной активности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (p = 0,008) и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК (p = 0,008) в последнем случае составляло, соответственно, 26 и 32%.

Обработка CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК дексаметазоном не влияла на способность ДК индуцировать апоптоз CD4<sup>+</sup>Т-клеток в ауто-СКЛ (рис. 3Г). В то же время отмечалась тенденция к усилению проапоптогенной активности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (p = 0,1) и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК (p = 0,08) в от-

ношении аутологичных CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. При этом относительное количество апоптотических CD8<sup>+</sup>Т-клеток в присутствии CD16<sup>+</sup>Мо-ДК было выше, чем в присутствии CD16<sup>-</sup>Мо-ДК (Me 5,8 vs 4,9%; p = 0,05). В культурах алло-СКЛ различий в проапоптогенной активности интактных и дексаметазон-модифицированных CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК против аллогенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток не наблюдалось (рис. 3Д).

Сравнение эффекта дексаметазона на продукцию цитокинов в исследуемых субпопуляциях ДК выявило снижение TNFα в культурах CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК в 2 (p = 0,007) и 1,5 (p = 0,009) раза, соответственно (рис. 4), при отсутствии значимого эффекта на продукцию IL-10. При этом, учитывая, что более чем в половине случаев (6/11, 55%) дексаметазон усиливал продукцию IL-10, соотношение TNFα/IL-10 в культурах CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК снижалось с 16,1 до 6,0 расч.ед (p = 0,013) и с 8,9 до 5,0 расч. ед. (p = 0,02), соответственно, что в целом указывало на смещение баланса цитокинов в сторону противовоспалительного ответа.

Корреляционный анализ выявил наличие отрицательной взаимосвязи между ингибирующим эффектом дексаметазона на продукцию TNFα в культурах CD16<sup>+</sup>Мо-ДК и индексом стимулирующего влияния дексаметазона на апоптоз-индуцирующую активность CD16<sup>+</sup>Мо-ДК против аллогенных CD4<sup>+</sup>Т-клеток (r<sub>s</sub> = -0,593; p = 0,05). Полученные данные указывают на то, что дексаметазон-индуцированное снижение продукции

TNF $\alpha$  под действием дексаметазона ослабляет проапоптогенную активность ДК.

Для продукции IL-10 корреляционных взаимосвязей не было выявлено.

## Обсуждение

Настоящее исследование продемонстрировало, что IFN $\alpha$ -индуцированные ДК могут дифференцироваться из циркулирующих CD14<sup>+</sup> моноцитов, как обогащенных, так и истощенных по CD16<sup>+</sup> клеткам. Однако популяционный состав моноцитов влияет на свойства генерируемых из них ДК, и присутствие в пуле моноцитов CD16<sup>+</sup> клеток способствует дифференцировке IFN-ДК с более низкой эндоцитозной способностью и более высокой стимуляторной активностью, что указывает на их степень зрелости. В то же время как CD16<sup>-</sup>, так и CD16<sup>+</sup> моноциты являются мишенями для ингибирующего влияния дексаметазона, и генерируемые в дальнейшем IFN-ДК характеризуются свойствами толерогенных клеток. При этом ДК, полученные из общего пула моноцитов без деплеции CD16<sup>+</sup> клеток, демонстрируют большую чувствительность к иммунорегуляторному действию дексаметазона.

Ранее нами было показано, что CD16<sup>+</sup>Мо-ДК отличаются от CD16<sup>-</sup>Мо-ДК более зрелым фенотипом [2]. Согласно данным литературы, классические моноциты выступают в роли предшественников промежуточных и неклассических моноцитов, экспрессирующих CD16-антиген [10, 19]. Кроме того, для неклассических CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> моноцитов характерна экспрессия проапоптотических и антипролиферативных генов, ассоциированных с высокодифференцированным статусом клеток, более высокая экспрессия антигенов МНС II класса и костимуляторных молекул, низкая фагоцитарная и повышенная аллостимуляторная активности [4, 26]. В этом аспекте использование всего пула моноцитов, содержащих в том числе CD16<sup>+</sup> клетки с большей степенью зрелости, позволяет получить IFN-ДК с более выраженными иммуногенными свойствами, характерными для более зрелых ДК.

Проведенное нами исследование позволило оценить, какие популяции Т-лимфоцитов отвечают на антигены, представленные на CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. Продemonстрировано, что оба типа ДК в ауто-СКЛ стимулировали пролиферацию аутологичных Т-клеток преимущественно за счет активации CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, тогда как пролиферативный ответ аллогенных Т-клеток был связан с активацией CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток.

Способность ДК индуцировать апоптоз Т-клеток рассматривается в качестве механизма ограничения иммунного ответа и предупрежде-

ния о чрезмерной активации [14]. Действительно, в отличие от CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты почти не отвечали на аутоантигены, представленные на CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. Поэтому уровень апоптоза в них не увеличивался по сравнению с интактными Т-клетками. Несмотря на то, что CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК эффективно стимулировали в алло-СКЛ пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток, апоптоз в обеих популяциях статистически значимо возрастал только при сокультивировании с CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. При этом для CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов была характерна большая по сравнению с CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитами чувствительность к апоптозу, индуцированному CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. CD16<sup>-</sup>Мо-ДК активировали апоптоз только в CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитах. В данном случае высокую чувствительность CD4<sup>+</sup>Т-клеток к апоптозу можно объяснить тем фактом, что молекула CD4 является не только корецептором в TCR/CD3-зависимой активации Т-клеток, но и выступает в роли негативного регулятора, участвуя в проведении апоптотического сигнала, опосредованного через Fas/FasL- (при участии протеинкиназы С) и TNF $\alpha$ /TNF-R-зависимый механизмы [3]. В то же время более широкий спектр цитотоксического действия CD16<sup>+</sup>Мо-ДК по сравнению с CD16<sup>-</sup>Мо-ДК, по-видимому, связан со свойствами исходной популяции моноцитов-предшественников. Для CD16<sup>+</sup> моноцитов показана более высокая экспрессия проапоптогенных молекул [26] и более выраженная цитотоксическая активность [23] по сравнению с классическими CD16<sup>-</sup> моноцитами.

Согласно полученным нами данным, CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК не различались по продукции TNF $\alpha$  и IL-10. Эти результаты частично расходятся с данными литературы, поскольку принято считать, что основными продуцентами TNF $\alpha$  среди пула моноцитов являются неклассические моноциты и генерированные из них ДК [25]. По-видимому, отсутствие различий в продукции TNF $\alpha$  между CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК связано с особенностями генерации ДК в присутствии IFN $\alpha$  и его стимулирующим влиянием на гены провоспалительных молекул [13], тогда как предыдущие работы были проведены на IL-4-индуцированных ДК [25].

В то же время именно для CD16<sup>+</sup>Мо-ДК нами выявлена обратная корреляционная зависимость между продукцией TNF $\alpha$  и индукцией апоптоза в аллогенных CD4<sup>+</sup>Т-клетках. TNF $\alpha$  является плеiotропным цитокином, который поддерживает активацию и пролиферацию наивных и эффекторных Т-клеток, а также индуцирует их апоптоз [3, 16]. TNF $\alpha$  может напрямую вызывать гибель Т-клеток или действовать опосредованно, повышая чувствительность Т-клеток

к FasL-зависимому апоптозу [11]. Причем именно CD4<sup>+</sup>T-клетки, но не CD8<sup>+</sup>T-клетки, чувствительны к FasL-медируемой цитотоксической активности IFN-ДК [1]. Полученные нами данные расширяют представления о цитотоксической активности ДК, генерированных из CD16<sup>+</sup> моноцитов, а также подтверждают значимость TNF $\alpha$  в реализации данной функции ДК.

По данным литературы, для IFN-ДК характерна высокая продукция IL-10 [9]. Исходя из проведенного нами корреляционного анализа, IL-10 участвует в ограничении аллостимуляторной активности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК. Этот эффект может быть связан с тем, что IL-10 по аутокринному механизму снижает на IFN-ДК экспрессию молекул, ассоциированных с антигенной презентацией — МНС II класса, DC-LAMP/CD208 — приводя в конечном итоге к снижению аллостимуляторной активности ДК в отношении CD4<sup>+</sup>T-клеток [9].

Важной частью нашего исследования было выяснение причастности субпопуляций моноцитов к толерогенному влиянию глюкокортикоидов на IFN-ДК. Полученные в настоящем исследовании результаты продемонстрировали, что CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК подвержены супрессорному эффекту дексаметазона, который проявляется увеличением поглотительной активности, характерной для незрелых ДК, снижением способности стимулировать пролиферацию аутологичных и аллогенных Т-клеток и подавлением продукции TNF $\alpha$ . При этом для CD16<sup>+</sup>Мо-ДК было характерно более выраженное увеличение эндоцитозной активности и снижение способности ДК стимулировать пролиферацию CD4<sup>+</sup>T-клеток в ауто-СКЛ. Кроме того, обработка дексаметазоном CD16<sup>+</sup>Мо-ДК сопровождалась увеличением проапоптогенной активности ДК против аутологичных CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Эти результаты указывают на то, что CD16<sup>+</sup> моноциты участвуют в формировании толерогенных свойств IFN-ДК. Зачастую проявление толерогенной активности ассоциируется с менее зрелым статусом ДК [15]. Полученные данные согласуются с установленным нами ранее фактом ингибирующего действия дексаметазона на созревание CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК, более выраженного в отношении CD16<sup>+</sup>Мо-ДК [2].

Как известно, толерогенное действие ДК на Т-лимфоциты реализуется через индукцию анергии и апоптоза Т-клеток, а также путем подавления функциональной активности Т-клеток иммуносупрессивными цитокинами и генерации регуляторных Т-клеток (Treg) [18, 24]. Обращает на себя внимание, что при добавлении дексаметазона снижение способности CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК стимулировать пролиферацию аллогенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов не сопровождалось усилением апоптоза Т-клеток. По-видимому, толерогенное действие дексаметазон-обработанных ДК опосредуется через индукцию анергии и блокирование клеточного цикла Т-лимфоцитов, но не вызывает гибель последних. Действительно, учитывая возможное участие TNF $\alpha$  в реализации цитотоксического эффекта ДК против аллогенных CD4<sup>+</sup>T-клеток и снижение продукции анализируемого медиатора в ответ на обработку дексаметазоном, механизм стимуляции апоптоза Т-клеток не является ключевым в реализации регуляторной функции толерогенных IFN-ДК.

Характерно, что в ответ на добавление дексаметазона CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК не усиливали продукцию IL-10. Несмотря на то, что в литературе есть данные о стимулирующем влиянии дексаметазона на продукцию IL-10 дендритными клетками [8, 20, 21], полученные нами результаты могут отражать особенности цитокин-секреторной активности IFN-ДК. Кроме того, снижение соотношения TNF $\alpha$ /IL-10 в культурах CD16<sup>-</sup>Мо-ДК и CD16<sup>+</sup>Мо-ДК указывает на смещение баланса в сторону Th2/противовоспалительной активности.

В целом проведенное нами исследование свидетельствует о том, что выявленные различия в свойствах IFN $\alpha$ -индуцированных ДК, генерируемых из общего пула моноцитов и моноцитов с деплецией CD16<sup>+</sup> клеток, могут иметь важное значение для объяснения особенностей функциональной активности ДК моноцитарного происхождения при различных патологических состояниях, ассоциированных с изменением соотношения классических, промежуточных и неклассических моноцитов.

## Список литературы / References

1. Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Сахно Л.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика сигнальных путей, опосредующих цитотоксический эффект дендритных клеток против активированных Т-лимфоцитов и NK-клеток // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 1-2. С. 43-50. [Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Characteristics of signaling pathways mediating a cytotoxic effect of dendritic cells upon activated T lymphocytes and NK cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 1-2, pp. 43-50. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-1-2-43-50.

2. Черных Е.Р., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Сахно Л.В., Останин А.А. Фенотип и функции дендритных клеток человека, генерированных из субпопуляций моноцитов CD14<sup>+</sup>, оппозитных по экспрессии CD16 // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 266-276. [Chernykh E.R., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Kurochkina Yu.D., Oleynik E.A., Sakhno L.V., Ostanin A.A. Phenotype and functions of human dendritic cells derived from CD14<sup>+</sup> monocyte subsets opposed to CD16 expression. *Byulleten sibirskoy meditsiny* = *Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 266-276. (In Russ.)]
3. Algeciras A., Dockrell D.H., Lynch D.H., Paya C.V. CD4 regulates susceptibility to Fas ligand- and tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 187, no. 5, pp. 711-720.
4. Ancuta P., Liu K.-Y., Misra V., Wacleche V., Gosselin A., Zhou X., Gabuzda D. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16<sup>+</sup> and CD16<sup>-</sup> monocyte subsets. *BMC Genomics*, 2009, Vol. 10, 403. doi: 10.1186/1471-2164-10-403.
5. Bakdash G., Sittig S.P., van Dijk T., Figdor C.G., de Vries I.J. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 53. doi: 10.3389/fimmu.2013.00053.
6. Boyette L.B., Macedo C., Hadi K., Elinoff B.D., Walters J.T., Ramaswami B., Chalasani G., Taboas J.M., Lakkis F.G., Metes D.M. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 4, e0176460. doi:10.1371/journal.pone.0176460.
7. Cain D., Cidlowski J. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 4, pp. 233-247.
8. Canning M.O., Grotenhuis K., de Wit H.J., Drexhage H.A. Opposing effects of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Endocrinol.*, 2000, Vol. 143, no. 5, pp. 687-695.
9. Carbonneil C., Saidi H., Donkova-Petrini V., Weiss L. Dendritic cells generated in the presence of interferon- $\alpha$  stimulate allogeneic CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation: modulation by autocrine IL-10, enhanced T-cell apoptosis and T regulatory type 1 cells. *Int. Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 7, pp. 1037-1052.
10. Coillard A., Segura E. *In vivo* differentiation of human monocytes. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1907. doi:10.3389/fimmu.2019.01907.
11. Elzey B.D., Griffith T.S., Herndon J.M., Barreiro R., Tschopp J., Ferguson T.A. Regulation of Fas ligand-induced apoptosis by TNF. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 6, pp. 3049-3056.
12. Feng A.-L., Zhu J.-K., Sun J.-T., Yang M.X., Neckenig M.R., Wang X.W., Shao Q.Q., Song B.F., Yang Q.F., Kong B.H., Qu X. CD16<sup>+</sup> monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2011, Vol. 164, no. 1, pp. 57-65.
13. Gessani S., Conti L., del Cornò M., Belardelli F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)*, 2014, Vol. 6, no. 6, pp. 1696-1723.
14. Hasegawa H., Matsumoto T. Mechanisms of tolerance induction by dendritic cells *in vivo*. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 350. doi:10.3389/fimmu.2018.00350.
15. Lutz M.B., Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.*, 2002, Vol. 23, no. 9, pp. 445-449.
16. Mehta A.K., Gracias D.T., Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine*, 2018, Vol. 101, pp. 14-18.
17. Mildner A.A., Yona S., Jing S. Close encounter of the third kind: monocyte-derived cells. *Adv. Immunol.*, 2013, Vol. 120, pp. 69-103.
18. Naranjo-Gómez M., Raïch-Regué D., Oñate C., Grau-López L., Ramo-Tello C., Pujol-Borrell R., Martínez-Cáceres E., Borràs F.E. Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J. Transl. Med.*, 2011, Vol. 9, no. 1, 89. doi: 10.1186/1479-5876-9-89.
19. Patel A.A., Zhang Y., Fullerton J.N., Boelen L., Rongvaux A., Maini A.A., Bigley V., Flavell R.A., Gilroy D.W., Asquith B., Macallan D., Yona S. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.*, 2017, Vol. 214, no. 7, pp. 1913-1923.
20. Rea D., van Kooten C., van Meijgaarden K.E., Melief C.J.M., Offringa R. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen presenting cells that secrete IL-10. *Blood*, 2000, Vol. 95, no. 10, pp. 3162-3167.
21. Rönnblom L., Eloranta M.L. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2013, Vol. 25, no. 2, pp. 248-253.
22. Segura E., Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 3, no. 9, pp. 440-445.
23. Stec M., Mytar B., Weglarczyk K., Ruggiero I., Zembala M. Characterization of monocyte subpopulations (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> and CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) generated from cord blood haematopoietic progenitor CD34<sup>+</sup>. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 11, 3551. doi:10.1182/blood.V112.11.3551.3551.
24. Unger W.W.J., Laban S., Kleijwegt F.S., van der Slik A.R., Roep B.O. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D 3 or dexamethasone: Differential role for PD-L1. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 11, pp. 3147-3159.

25. Wacleche W.S., Cattin A., Goulet J.-Ph., Gauchat D., Gosselin A., Cleret-Buhot A., Zhang Y., Tremblay C.L., Routy J.P., Ancuta P. CD16<sup>+</sup> monocytes give rise to CD103<sup>+</sup>RALDH2<sup>+</sup>TCF4<sup>+</sup> dendritic cells with unique transcriptional and immunological features. *Blood Adv.*, 2018, Vol. 2, no. 21, pp. 2862-2878.

26. Wong K.L., Tai J.J.-Y., Wong W.-C., Han H., Sem X., Yeap W.H., Kourilsky P., Wong S.C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 2011, Vol. 118, pp. e16-e31.

**Авторы:**

**Тыринова Т.В.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий иммуноterapiи Институт медицины и психологии ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

**Леплина О.Ю.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Тихонова М.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

**Максимова А.А.** — аспирант 3 года лаборатории клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

**Черных Е.Р.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммуноterapiи ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Tyrinova T.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Senior Research Associate, Laboratory of Cell Technologies of Immunotherapy, Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

**Leplina O. Yu.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Tikhonova M.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

**Maximova A.A.**, Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Ostanin A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Chernykh E.R.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 07.01.2020  
Принята к печати 10.01.2020

Received 07.01.2020  
Accepted 10.01.2020

# СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ С ДИСКОРДАНТНЫМ ОТВЕТом НА АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ

Королевская Л.Б.<sup>1</sup>, Сайдакова Е.В.<sup>1</sup>, Шмагель Н.Г.<sup>2</sup>, Шмагель К.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

<sup>2</sup> Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Пермь, Россия

**Резюме.** Дискордантный ответ на антиретровирусную терапию у ВИЧ-инфицированных пациентов характеризуется неэффективным восстановлением численности CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. Роль регуляторных Т-клеток в развитии дискордантного ответа на лечение остается малоизвестной как из-за отсутствия специфических и надежных маркеров регуляторных Т-клеток, так и из-за неоднородности их популяции. В настоящей работе нами были обследованы ВИЧ-инфицированные пациенты с подавленной на фоне антиретровирусной терапии репликацией вируса (уровень ВИЧ менее 50 копий в мл крови), ответивших (n = 22) и не ответивших (n = 19) приростом численности CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов на фоне более чем двухлетнего приема вирусологически эффективной терапии. Контрольную группу обследованных составили неинфицированные добровольцы (n = 23). Субпопуляционный состав CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и регуляторных Т-клеток был исследован методом многоцветной проточной цитометрии. Было установлено, что у инфицированных ВИЧ больных с неэффективным восстановлением иммунитета на фоне проводимого лечения по сравнению с ВИЧ-позитивными субъектами, дающими стандартный ответ на антиретровирусную терапию, абсолютное число CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, так же как и входящих в их состав регуляторных Т-клеток, было снижено во всех субпопуляциях различной степени зрелости: наивных клетках, лимфоцитах центральной памяти, клетках эффекторной памяти и терминально дифференцированных эффекторах. Это отличало их от пациентов, дающих эффективный ответ на лечение, у которых дефицит регуляторных Т-лимфоцитов был выявлен только среди наивных клеток и клеток центральной памяти. Важно отметить, что у зараженных ВИЧ больных с дискордантным ответом на терапию процентное содержание регуляторных Т-клеток эффекторной памяти — лимфоцитов, обладающих наибольшей супрессорной активностью — было существенно повышено по сравнению с таковым в остальных субпопуляциях CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. По-видимому, несмотря на дефицит регуляторных Т-лимфоцитов, размер пула этих клеток у больных с дискордантным ответом на лечение является достаточным для контроля над активацией CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. В то же время численности регуляторных Т-клеток может не хватать для подавления избыточной активации иммунокомпетентных клеток, не относящихся к популяции CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. Этим можно

## Адрес для переписки:

Королевская Лариса Борисовна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (342) 280-83-34.  
E-mail: bioqueen@mail.ru

## Address for correspondence:

Korolevskaya Larisa B.  
Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural  
Branch, Russian Academy of Sciences  
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.  
Phone: 7 (342) 280-83-34.  
E-mail: bioqueen@mail.ru

## Образец цитирования:

Л.Б. Королевская, Е.В. Сайдакова, Н.Г. Шмагель, К.В. Шмагель «Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток периферической крови у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на антиретровирусную терапию» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 281–290.  
doi: 10.15789/1563-0625-RTC-1770

© Королевская Л.Б. и соавт., 2020

## For citation:

L.B. Korolevskaya, E.V. Saidakova, N.G. Shmagel, K.V. Shmagel "Regulatory T cell subsets in peripheral blood of HIV-infected patients with discordant response to antiretroviral therapy", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 281–290.  
doi: 10.15789/1563-0625-RTC-1770

DOI: 10.15789/1563-0625-RTC-1770

частично объяснить повышенный уровень иммунной активации у больных с дискордантным ответом на терапию по сравнению с таковым у лиц, стандартно отвечающих на лечение.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, антиретровирусная терапия, дискордантный ответ, регуляторные Т-лимфоциты, наивные Т-клетки, Т-клетки центральной памяти, Т-клетки эффекторной памяти

## REGULATORY T CELL SUBSETS IN PERIPHERAL BLOOD OF HIV-INFECTED PATIENTS WITH DISCORDANT RESPONSE TO ANTIRETROVIRAL THERAPY

Korolevskaya L.B.<sup>a</sup>, Saidakova E.V.<sup>a</sup>, Shmagel N.G.<sup>b</sup>, Shmagel K.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russian Federation

**Abstract.** The discordant immunologic response to antiretroviral therapy in HIV-infected patients is characterized by ineffective recovery of CD4<sup>+</sup>T cell counts. The role of regulatory T cells in discordant response to the treatment remains poorly understood both due to the lack of specific and reliable markers of regulatory T cells and their subset's heterogeneity. In the present work, we studied two groups of HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy for more than two years and thus having their viral load suppressed (less than 50 copies of HIV per ml of blood): those who responded (n = 22) and did not respond (n = 19) to the treatment with an increase in their CD4<sup>+</sup>T cell counts. The control group consisted of uninfected volunteers (n = 23). The CD4<sup>+</sup>T lymphocyte subset composition was examined by flow cytometry. It was shown that in HIV-infected patients with ineffective immune recovery compared with subjects having a standard response to antiretroviral therapy, the absolute counts of regulatory T cells, as well as CD4<sup>+</sup>T lymphocytes, was reduced in all maturational subsets: naïve cells, central memory, effector memory, and terminally differentiated effectors. That differed immunological nonresponders from patients with a standard response to the treatment, which had a shortage only in naïve and central memory regulatory T cell subsets. It is important to note that in HIV-infected patients with a discordant response to therapy, the proportion of effector memory regulatory T cells, that possess the most prominent suppressive capacity, was significantly increased compared with that in other CD4<sup>+</sup>T lymphocyte subsets. Apparently, despite of regulatory T cell deficiency, in HIV-infected patients with a discordant response to the treatment, the regulatory T cell pool size is big enough to control CD4<sup>+</sup>T lymphocyte activation. Nevertheless, the number of regulatory T cells may not be sufficient to suppress the over-activation of immunocompetent cells that are not in the CD4<sup>+</sup>T lymphocyte subset. This can partly explain the increased cell activation level in patients with a discordant response to therapy as compared with those who have a standard response to the treatment.

**Keywords:** HIV-infection, antiretroviral therapy, discordant immunological response, regulatory T cells, naïve T lymphocytes, central memory T cells, effector memory T cells

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 17-54-30006).

### Введение

Инфекция вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) характеризуется прогрессивным опустошением пула CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Назначение антиретровирусной терапии (АРТ) приводит к подавлению репликации вируса и последующему увеличению численности CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов в крови больного (стандартный ответ на лечение) [3]. Вместе с тем у 20-30% ВИЧ-инфицированных пациентов развивается дискордантный ответ на АРТ, при ко-

тором, несмотря на эффективное подавление вирусной нагрузки, отмечается низкая способность к восстановлению числа периферических CD4<sup>+</sup>T-клеток [10, 17]. При этом у пациентов с дискордантным ответом на АРТ по сравнению с больными, стандартно отвечающими на лечение, дефицит CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов более выражен [14].

Регуляторные Т-клетки (Treg) представляют собой субпопуляцию CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Они выполняют важную функцию поддержания ауто-толерантности и иммунного гомеостаза [25, 30]. Однако их роль при ВИЧ-инфекции и особенно при развитии дискордантного ответа на терапию остается малопонятной. Большинство исследо-

ваний построено на оценке корреляционных связей между относительным или абсолютным числом Treg в крови пациентов и общепринятыми для характеристики заболевания параметрами: числом CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, уровнем вирусной нагрузки, показателями активации клеток [8, 13, 15, 20]. При этом представленные разными авторами данные крайне противоречивы, что может быть связано как с неоднородностью популяции Treg, так и с отсутствием надежных и специфичных маркеров для их идентификации [16, 25].

Существуют две большие популяции Treg — тимические и периферические клетки [21]. Важным их отличием является экспрессия изоформ поверхностной молекулы CD45. Почти все тимические Treg несут фенотип наивных клеток (CD45RA<sup>+</sup>), а популяция периферических Treg — клеток памяти (CD45RO<sup>+</sup>) [25]. Известно, что мишенью ВИЧ являются не все субпопуляции CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов: вирус избирательно инфицирует Т-клетки эффекторной памяти [6, 11]. Регуляторные Т-клетки входят в состав пула CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов и, следовательно, могут быть заражены ВИЧ [19]. Кроме того, они могут разделять фенотипические характеристики субпопуляций конвенциональных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Исходя из этого, оценка субпопуляционного состава Treg представляет собой несомненный интерес. Следует отметить, что среди пациентов с дискордантным ответом на лечение такие исследования ранее не проводились.

**Целью настоящей работы** была оценка субпопуляционного состава регуляторных Т-клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на лечение.

## Материалы и методы

План и проведение работы были одобрены этическим комитетом Пермского краевого центра по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № комитета IRB00008964). Каждый участник исследования подписал информированное согласие. Были обследованы ВИЧ-инфицированные пациенты (n = 41) и неинфицированные, относительно здоровые добровольцы (n = 23). Все ВИЧ-зараженные больные до начала лечения имели уровень CD4<sup>+</sup>T-клеток в крови менее 200 мкл<sup>-1</sup> и находились на АРТ более двух лет. Исходя из эффективности ответа на лечение, пациенты были разделены на две группы: 1) субъекты с числом периферических CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов более 350 мкл<sup>-1</sup> (стандартный ответ на терапию, n = 22) и 2) больные с количеством CD4<sup>+</sup>T-клеток крови менее 350 мкл<sup>-1</sup> (дискордантный ответ на лечение, n = 19).

Забор венозной крови проводили натощак в пробирки, покрытые ЭДТА. Плазму крови от-

деляли от форменных элементов центрифугированием. Вирусную нагрузку ВИЧ определяли посредством разветвленной ДНК-гибридизации набором “Versant HIV-1 RNA 3,0 assay b” на анализаторе Versant 440 (Siemens, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Численность CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов в периферической крови оценивали с использованием коммерческого набора Immunocytometry Systems (BDIS) Simultest™ (Becton Dickinson, США) на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования двукратно разведенной фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко (DPBS, Gibco, США) периферической крови в градиенте плотности Диаколл (1,077 г/мл, Диаэм, Россия). Выделенные клетки собирали, дважды отмывали раствором DPBS, подсчитывали в камере Горяева, после чего подвергали контролируемому замораживанию в жидком азоте в среде, содержащей 90% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, Южная Америка) и 10% диметилсульфоксида (AppliChem, Германия) до момента использования. Перед проведением иммунофенотипирования клетки размораживали. Подсчет жизнеспособных клеток (окраска трипановым синим) проводили на приборе Vi-CELL XR Cell Counter (Beckman Coulter, США) с использованием программного обеспечения Vi-CELL XR 2.04 (Beckman Coulter, США).

Идентификацию субпопуляций Т-лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре Fortessa (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител, специфичных к поверхностным молекулам CD3-AF700, CD25-BUV395, CD127-BV786, CCR7-PE-Cy7 (Becton Dickinson, США), CD45RA-BV650 (Biolegend, США), CD4-Qdot605, внутриклеточной молекуле FOXP3-PE (eBioscience™, США) и витального красителя LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, США). Среди CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов выявляли наивные клетки (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), клетки центральной (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>) и эффекторной (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) памяти и терминально-дифференцированные эффекторы (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). В каждой субпопуляции определяли регуляторные Т-клетки, к которым относили лимфоциты с фенотипом CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Рассчитывали относительные и абсолютные величины.

Полученные данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов (25-й и 75-й процентиля) либо средних величин и их ошибки. Достоверность различий определяли на основе критерия U Манна–Уитни и t-критерия Стьюдента.

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ СУБЪЕКТОВ

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE EXAMINED SUBJECTS

Характеристики Characteristics	ВИЧ-инфицированные пациенты HIV infected patients		Здоровые добровольцы Healthy controls 3
	Стандартный ответ на АРТ Standard response to ART 1	Дискордантный ответ на АРТ Discordant response to ART 2	
Число обследованных Number examined subjects	22	19	23
Возраст (годы) Age (years)	37,5 (32,8-42,0)*	39 (34-42)	32 (28-39)
Мужчины, абс. число (%) Men, abs. count (%)	10 (45)	9 (47)	8 (35)
Характеристика ВИЧ-инфекции HIV infection characteristics			
Половой путь передачи ВИЧ, абс. число (%) Sexual HIV transmission route, abs. count (%)	21 (95)	19 (100)	–
Длительность инфекции (годы) Infection duration (years)	9 (6-13)	6 (4-13)	–
Продолжительность АРТ (годы) ART duration (years)	5,1 (3,3-6,9)	4,3 (2,2-8,2)	–
Уровень ВИЧ в крови (копии/мл) HIV viral load (copies/μl)	< 50**	< 50	–
Численность CD4 <sup>+</sup> Т-клеток до АРТ (мкл <sup>-1</sup> ) CD4 <sup>+</sup> T cells before ART (μl <sup>-1</sup> )	160 (80-193) p <sub>1-2</sub> < 0,01	66 (30-150)	–
Численность CD4 <sup>+</sup> Т-клеток на момент исследования (мкл <sup>-1</sup> ) CD4 <sup>+</sup> T cells at the study (μl <sup>-1</sup> )	532 (424-652) p <sub>1-2</sub> < 0,001 p <sub>1-3</sub> < 0,001	268 (207-298) p <sub>2-3</sub> < 0,001	885 (772-1262)

Примечание. ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; АРТ – антиретровирусная терапия. \* – указаны медианы и интерквартильные размахи; статистические расчеты выполнены по методу Манна–Уитни; \*\* – предел чувствительности тест-системы.

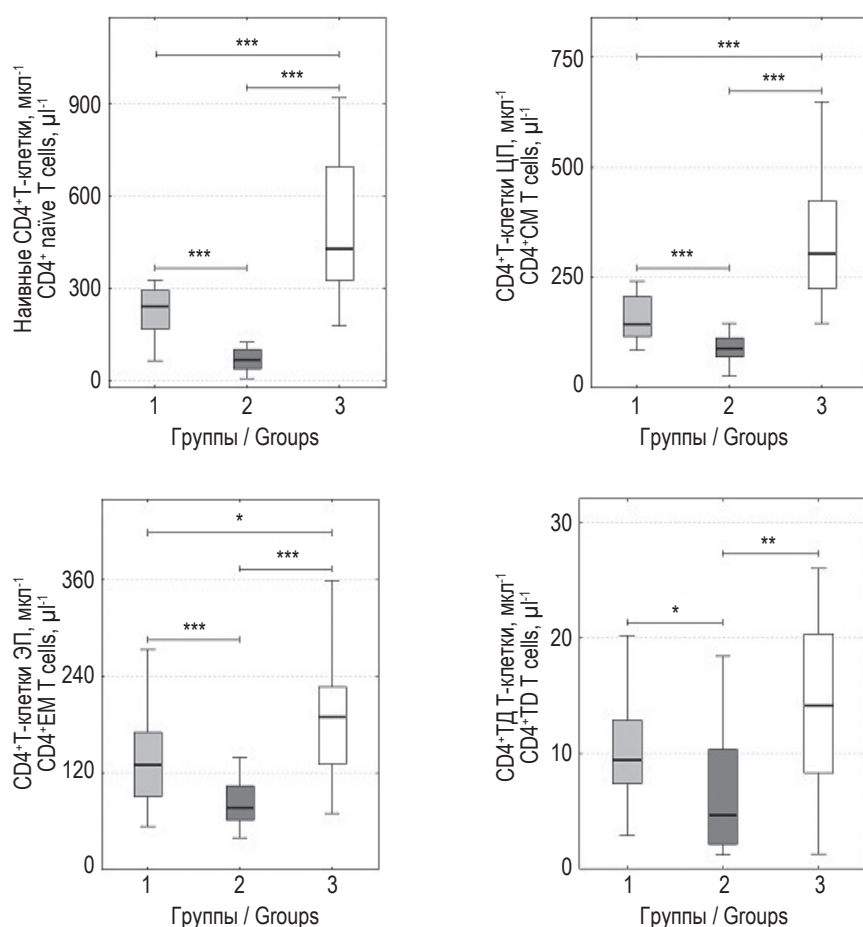
Note. HIV, human immunodeficiency virus; ART, antiretroviral therapy. \*, medians and interquartile ranges are shown; statistics was done by Mann–Whitney method; \*\*, limit of detection.

## Результаты

Субъекты всех обследованных групп не отличались между собой по возрасту и половому составу (табл. 1). Среди ВИЧ-инфицированных больных преобладал половой путь заражения вирусом. К моменту обследования пациенты со стандартным и дискордантным ответом на АРТ не различались по длительности инфекции и продолжительности лечения. Концентрация ВИЧ в крови пациентов составила менее 50 копий/мл (предел чувствительности тест-системы), что свидетельствовало о вирусологической эффек-

тивности АРТ. Абсолютное количество CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных субъектов обеих групп было существенно снижено по сравнению с соответствующим показателем здоровых добровольцев. Так как критерием разделения пациентов на группы была численность периферических CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, более глубокий дефицит этих клеток был установлен у лиц с дискордантным ответом на АРТ.

Оценка абсолютного числа CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов среди наивных элементов, клеток центральной, эффекторной памяти и терминально-дифференцированных эффекторов показала



**Рисунок 1. Субпопуляционный состав CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов и здоровых добровольцев**

Примечание. Представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные интервалы (прямоугольники) и 10-90% размахи (вертикальные отрезки) абсолютного количества клеток крови. Группы: 1 – ВИЧ-инфицированные пациенты со стандартным ответом на антиретровирусную терапию; 2 – ВИЧ-инфицированные больные с дискордантным ответом на антиретровирусную терапию; 3 – здоровые доноры. Субпопуляции клеток: ЦП – центральной памяти; ЭП – эффекторной памяти; ТД – терминально-дифференцированные. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  (тест Манна–Уитни).

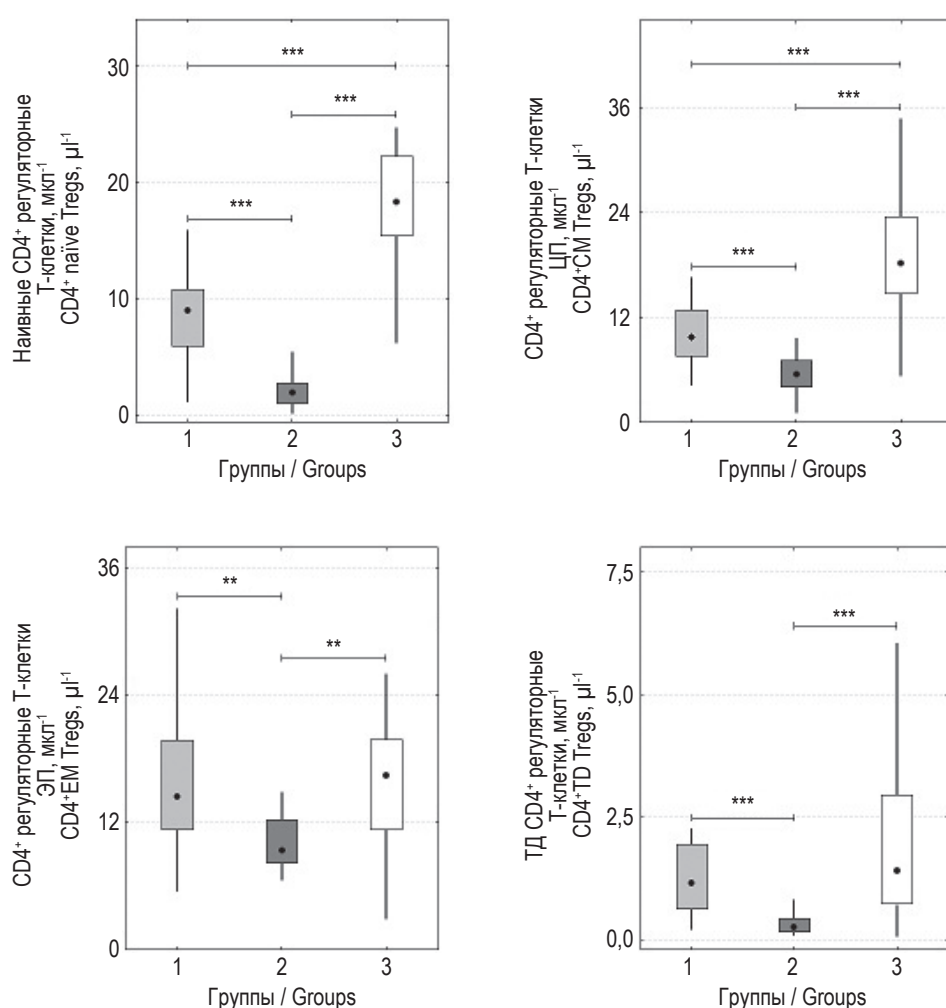
Figure 1. CD4<sup>+</sup>T cell subsets in HIV infected patients and healthy controls

Note. Medians (horizontal lines), interquartile ranges (boxes), and 10-90% percentiles (whiskers) are shown. Groups: 1, HIV infected patients with standard response to antiretroviral therapy; 2, HIV infected patients with discordant response to antiretroviral therapy; 3, healthy controls. T cell subsets: CM, central memory; EM, effector memory; TD, terminally differentiated. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (Mann–Whitney U-test).

следующее. У ВИЧ-инфицированных пациентов было установлено статистически значимое снижение численности клеток во всех субпопуляциях по сравнению с соответствующими показателями здоровых лиц (рис. 1). При этом у пациентов с дискордантным ответом на АРТ дефицит CD4<sup>+</sup>Т-клеток в каждой из субпопуляций был более выражен, чем в обеих группах сравнения.

При анализе численности Treg среди субпопуляций CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов различной степени зрелости были получены следующие данные (рис. 2). У ВИЧ-инфицированных субъектов со стандартным ответом на АРТ и здоровых людей

статистически значимые различия были установлены только при сравнении абсолютного количества Treg, несущих фенотип наивных элементов и клеток центральной памяти. При этом у больных с неэффективным восстановлением иммунитета на фоне АРТ численность Treg во всех субпопуляциях клеток была статистически значимо снижена, как по сравнению со здоровыми добровольцами, так и пациентами со стандартным ответом на лечение. Таким образом, у пациентов с дискордантным ответом на терапию абсолютное число регуляторных Т-клеток, как и CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, понижено среди наивных



**Рисунок 2. Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов и здоровых добровольцев**

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Regulatory  $\text{CD4}^+$ T cell subsets in HIV infected patients and healthy controls

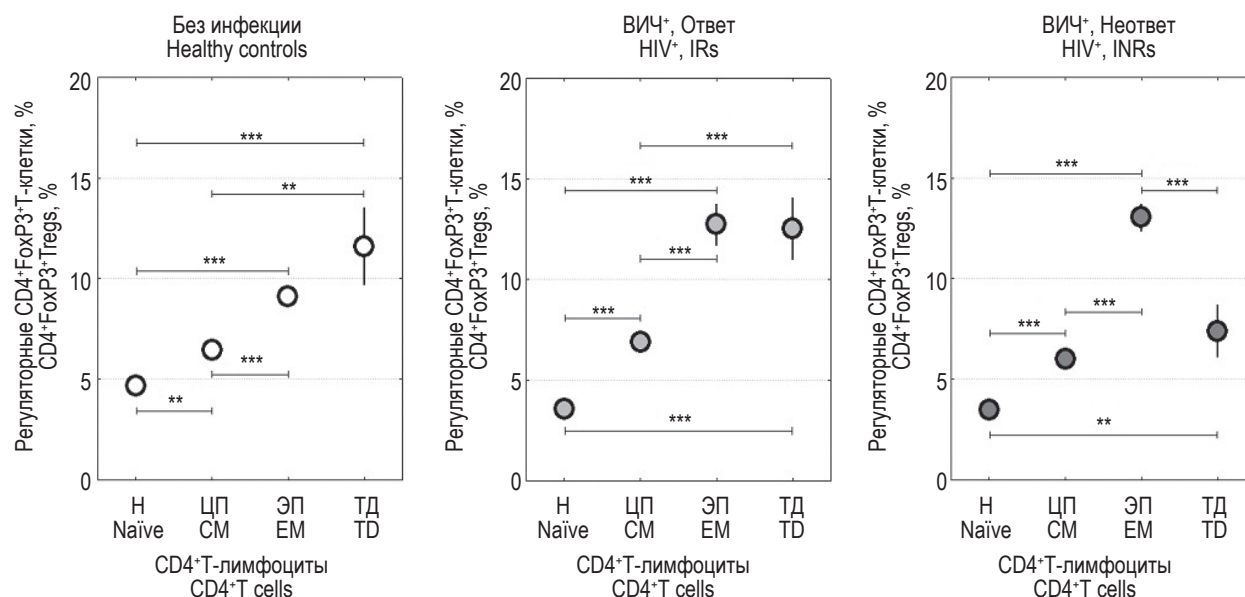
Note. As for Figure 1.

элементов, клеток памяти и терминально-дифференцированных эффекторов.

Изменение процентного содержания Treg среди  $\text{CD4}^+$ T-клеток различной стадии дифференцировки было следующим (рис. 3). У здоровых добровольцев минимальная доля Treg была выявлена в субпопуляции наивных лимфоцитов. В процессе созревания клеток относительное количество Treg в каждой последующей субпопуляции постепенно увеличивалось, достигая максимального значения среди терминально-дифференцированных элементов. У ВИЧ-инфицированных пациентов, так же как у здоровых людей, доля регуляторных клеток в субпопуляции наивных элементов оказалась наименьшей. Статистически значимые различия содержания Treg среди лимфоцитов данной субпопуляции были установле-

ны только при сравнении показателей в группах больных со стандартным ответом на АРТ и здоровых лиц ( $p < 0,05$ ). У зараженных субъектов, независимо от эффективности ответа на лечение, процент Treg значительно увеличивался среди  $\text{CD4}^+$ T-клеток центральной памяти по сравнению с его уровнем среди наивных элементов. При этом у больных обеих клинических групп относительное количество Treg в субпопуляции лимфоцитов центральной памяти было сопоставимо с соответствующим значением, выявленным у здоровых добровольцев ( $p > 0,05$ ).

Основные различия между субъектами обследованных групп были установлены на уровне клеток эффекторной памяти: при ВИЧ-инфекции в данной субпопуляции  $\text{CD4}^+$ T-лимфоцитов существенно возрастает доля регуляторных клеток.



**Рисунок 3. Доля регуляторных клеток в субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов**

**Примечание.** Представлены средние величины (кружки) и их ошибки (вертикальные отрезки). Группы: Без инфекции – здоровые добровольцы; ВИЧ<sup>+</sup>, Ответ – ВИЧ-инфицированные пациенты со стандартным ответом на антиретровирусную терапию; ВИЧ<sup>+</sup>, Неответ – ВИЧ-инфицированные больные с дискордантным ответом на антиретровирусную терапию. Субпопуляции клеток: Н – наивные; ЦП – центральной памяти; ЭП – эффекторной памяти; ТД – терминально-дифференцированные. \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (t-критерий Стьюдента).

Figure 3. Regulatory T cell frequencies in CD4<sup>+</sup>T lymphocyte subsets

Note. Means (circles) and standard errors (whiskers) are shown. Groups: HIV<sup>+</sup>, IRs, HIV infected patients with standard response to antiretroviral therapy; HIV<sup>+</sup>, INRs, HIV infected patients with discordant response to antiretroviral therapy. T cell subsets: Tregs, regulatory T cells; CM, central memory; EM, effector memory; TD, terminally differentiated. \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (Student's t-test).

Так, у больных со стандартным ответом на лечение относительное количество Treg среди CD4<sup>+</sup>T-клеток эффекторной памяти существенно превышало соответствующий показатель здоровых добровольцев ( $p < 0,01$ ). При этом у пациентов с дискордантным ответом на АРТ содержание Treg эффекторной памяти было сопоставимо с таковым, выявленным у субъектов, стандартно отвечающих на лечение ( $p > 0,05$ ), но статистически значимо превышало их уровень, установленный в группе здоровых лиц ( $p < 0,001$ ). Более того, у ВИЧ-позитивных больных, независимо от эффективности ответа на АРТ, доля Treg среди T-клеток эффекторной памяти была сопоставима с таковой, обнаруженной у здоровых добровольцев среди терминально-дифференцированных элементов. Следует также отметить, что только у пациентов с дискордантным ответом на АРТ относительное число Treg в субпопуляции терминально-дифференцированных лимфоцитов существенно снижалось по сравнению с их уровнем среди клеток эффекторной памяти ( $p < 0,001$ ). Более того, если у здоровых людей доля терминально-дифференцированных Treg повышалась относительно их количества среди клеток эффекторной памяти, то у больных, стан-

дартно отвечающих на лечение, относительное содержание Treg в обеих субпопуляциях почти не менялось. Вместе с тем при сравнении доли Treg среди терминально-дифференцированных элементов статистически значимые различия были выявлены только между показателями в группах ВИЧ-зараженных пациентов ( $p < 0,02$ ). Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что при ВИЧ-инфекции среди CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов эффекторной памяти существенно повышена доля регуляторных T-клеток, а наличие дискордантного ответа на АРТ сопровождается значительным снижением их относительного количества в субпопуляции терминально-дифференцированных эффекторов.

## Обсуждение

Роль регуляторных T-клеток при ВИЧ-инфекции и особенно при дискордантном ответе на лечение остается малопонятной. Ряд исследователей связывает низкие темпы восстановления численности CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов на фоне проводимой АРТ с уровнем Treg в крови пациентов [12, 20, 24]. Однако данные работы построены на оценке связей между показателями дискор-

дантного ответа на терапию и числом клеток с фенотипическими признаками Treg. Вместе с тем представленные на сегодняшний день данные литературы показывают, что популяция регуляторных клеток крайне неоднородна [16, 21]. Основным источником Treg является тимус, где под влиянием аутоантигенов формируется функционально зрелая популяция клеток. После выхода из тимуса Treg мигрируют на периферию, где осуществляют контроль за аутоиммунными реакциями [4, 21, 26]. Регуляторные клетки могут быть также генерированы за пределами тимуса из наивных предшественников, стимулированных чужеродными антигенами [21, 25, 29]. Популяция периферических Treg обеспечивает толерантность во взаимоотношениях «мать — плод» и, обладая выраженными супрессорными свойствами, играет важную роль в контроле над иммунной активацией и воспалением [7, 8]. Как и конвенциональные CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты, Treg можно разделить по фенотипическим признакам на функционально отличные субпопуляции — покоящиеся, активированные, наивные элементы, клетки памяти [5, 18].

В настоящей работе мы показали, что у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на АРТ по сравнению с субъектами, стандартно отвечающими на лечение, абсолютное число Treg, так же как и CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, было снижено во всех субпопуляциях различной степени зрелости: наивных клеток, клеток центральной, эффекторной памяти и терминально-дифференцированных эффекторов. Вместе с тем доля Treg эффекторной памяти была существенно повышена по сравнению с таковой в остальных субпопуляциях CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов.

Увеличение доли Treg среди CD4<sup>+</sup>T-клеток может быть связано с более высокой их жизнеспособностью по сравнению с конвенциональными CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитами [9]. Кроме того, повышенный запрос на Treg эффекторной памяти — ос-

новные клетки с выраженными супрессорными свойствами [22] — обусловлен, по-видимому, необходимостью постоянного контроля над персистирующей иммунной активацией, отмечаемой у ВИЧ-инфицированных больных [2]. Следует отметить, что результативность проявления супрессорных свойств Treg в значительной мере зависит от их соотношения с «отвечающими» клетками-мишенями [1]. Исходя из этого, именно относительное количество Treg будет иметь значение при подавлении активации CD4<sup>+</sup>T-клеток, абсолютное число которых существенно сокращается при ВИЧ-инфекции. Подтверждением этому может быть наличие у ВИЧ-инфицированных лиц, как правило, более высокого уровня активации CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов, чем CD4<sup>+</sup>T-клеток [14].

Необходимо отметить, что Treg проявляют супрессивную активность не только в отношении CD4<sup>+</sup>T-клеток, но в том числе и среди CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов и клеток врожденного иммунитета [23, 28]. Важным является то, что размер популяций названных выше клеток значительно превосходит численность самих регуляторных T-лимфоцитов. Следовательно, уменьшение абсолютного количества Treg предполагает снижение способности подавления клеток-мишеней других популяций. Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что при ВИЧ-инфекции размер пула регуляторных T-клеток, по-видимому, является достаточным для контроля над активацией CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов, но в то же время его может не хватать для сдерживания избыточной активации иммунокомпетентных клеток, не относящихся к популяции CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Этим частично можно объяснить повышенный уровень активации CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов и клеток врожденного иммунитета у больных с дискордантным ответом на АРТ по сравнению с таковым у лиц, стандартно отвечающих на лечение [14, 27].

## Список литературы / References

1. Angin M., Kwon D. S., Streeck H., Wen F., King M., Rezai A., Law K., Hongo T.C., Pyo A., Piechocka-Trocha A., Toth I., Pereyra F., Ghebremichael M., Rodig S.J., Milner D.A. Jr., Richter J.M., Altfeld M., Kaufmann D.E., Walker B.D., Addo M.M. Preserved function of regulatory T cells in chronic HIV-1 infection despite decreased numbers in blood and tissue. *J. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 205, no. 10, pp. 1495-1500.
2. Appay V., Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J. Pathol.*, 2008, Vol. 214, no. 2, pp. 231-241.
3. Autran B., Carcelain G., Li T.S., Gorochov G., Blanc C., Renaud M., Durali M., Mathez D., Calvez V., Leibowitch J., Katlama C., Debre P. Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy. *Immunol. Lett.*, 1999, Vol. 66, no. 1-3, pp. 207-211.
4. Baecher-Allan C., Hafler D.A. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol. Rev.*, 2006, Vol. 212, pp. 203-216.
5. Bi X., Suzuki Y., Gatanaga H., Oka S. High frequency and proliferation of CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Treg in HIV-1-infected patients with low CD4 counts. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 1, pp. 301-309.
6. Brenchley J.M., Price D.A., Douek D.C. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, no. 3, pp. 235-239.

7. Chevalier M.F., Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 1, pp. 29-37.
8. Eggena M.P., Barugahare B., Jones N., Okello M., Mutalya S., Kityo C., Mugenyi P., Cao H. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 7, pp. 4407-4414.
9. Fritzsche B., Oberle N., Eberhardt N., Quick S., Haas J., Wildemann B., Krammer P.H., Suri-Payer E. Cutting edge: in contrast to effector T cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 1, pp. 32-36.
10. Gaardbo J.C., Hartling H.J., Gerstoft J., Nielsen S.D. Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 2012, 670957. doi: 10.1155/2012/670957.
11. Grossman Z., Meier-Schellersheim M., Paul W.E., Picker L.J. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat. Med.*, 2006, Vol. 12, no. 3, pp. 289-295.
12. Horta A., Nobrega C., Amorim-Machado P., Coutinho-Teixeira V., Barreira-Silva P., Boavida S., Costa P., Sarmiento-Castro R., Castro A.G., Correia-Neves M. Poor immune reconstitution in HIV-infected patients associates with high percentage of regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 2, e57336. doi: 10.1371/journal.pone.0057336.
13. Jiao Y., Fu J., Xing S., Fu B., Zhang Z., Shi M., Wang X., Zhang J., Jin L., Kang F., Wu H., Wang F.S. The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and apoptosis of CD8<sup>+</sup> T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-progressors. *Immunology*, 2009, Vol. 128, no. 1 Suppl., pp. e366-e375.
14. Lederman M.M., Calabrese L., Funderburg N.T., Clagett B., Medvik K., Bonilla H., Gripshover B., Salata R.A., Taegle A., Lisgaris M., McComsey G.A., Kirchner E., Baum J., Shive C., Asaad R., Kalayjian R.C., Sieg S.F., Rodriguez B. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. *J. Infect. Dis.*, 2011, Vol. 204, no. 8, pp. 1217-1226.
15. Lim A., Tan D., Price P., Kamarulzaman A., Tan H.Y., James I., French M.A. Proportions of circulating T cells with a regulatory cell phenotype increase with HIV-associated immune activation and remain high on antiretroviral therapy. *AIDS*, 2007, Vol. 21, no. 12, pp. 1525-1534.
16. Liston A., Gray D.H. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 14, no. 3, pp. 154-165.
17. Massanella M., Negredo E., Clotet B., Blanco J. Immunodiscordant responses to HAART – mechanisms and consequences. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 9, no. 11, pp. 1135-1149.
18. Miyara M., Yoshioka Y., Kito H., Shima T., Wing K., Niwa A., Parizot C., Taflin C., Heike T., Valeyre D., Mathian A., Nakahata T., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., Amoura Z., Gorochoy G., Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 2009, Vol. 30, no. 6, pp. 899-911.
19. Moreno-Fernandez M.E., Zapata W., Blackard J.T., Franchini G., Chougnet C.A. Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain. *J. Virol.*, 2009, Vol. 83, no. 24, pp. 12925-12933.
20. Piconi S., Trabattoni D., Gori A., Parisotto S., Magni C., Meraviglia P., Bandera A., Capetti A., Rizzardini G., Clerici M. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4<sup>+</sup> T-cell counts during antiretroviral therapy. *AIDS*, 2010, Vol. 24, no. 13, pp. 1991-2000.
21. Plitas G., Rudensky A.Y. Regulatory T cells: differentiation and function. *Cancer Immunol. Res.*, 2016, Vol. 4, no. 9, pp. 721-725.
22. Rosenblum M.D., Way S.S., Abbas A.K. Regulatory T cell memory. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 2, pp. 90-101.
23. Rueda C.M., Jackson C.M., Chougnet C.A. Regulatory T-cell-mediated suppression of conventional T-cells and dendritic cells by different cAMP intracellular pathways. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 216. doi: 10.3389/fimmu.2016.00216.
24. Saison J., Ferry T., Demaret J., Maucourt Boulch D., Venet F., Perpoint T., Ader F., Icard V., Chidiac C., Monneret G., Lyon H.I.V. Cohort Study Association between discordant immunological response to highly active anti-retroviral therapy, regulatory T cell percentage, immune cell activation and very low-level viraemia in HIV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, Vol. 176, no. 3, pp. 401-409.
25. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C.M., Hafler D.A. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 7, pp. 490-500.
26. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 2008, Vol. 133, no. 5, pp. 775-787.
27. Stiksrud B., Aass H.C.D., Lørvik K.B., Ueland T., Trosæid M., Dyrhol-Riise A.M. Activated dendritic cells and monocytes in HIV immunological nonresponders: HIV-induced interferon-inducible protein-10 correlates with low future CD4<sup>+</sup> recovery. *AIDS*, 2019, Vol. 33, no. 7, pp. 1117-1129.
28. Weiss L., Piketty C., Assoumou L., Didier C., Caccavelli L., Donkova-Petrini V., Levy Y., Girard P.M., Burgard M., Viard J.P., Rouzioux C., Costagliola D.; ANRS 116 SALTO study group. Relationship between regulatory

T cells and immune activation in human immunodeficiency virus-infected patients interrupting antiretroviral therapy. *PLoS ONE*, 2010, Vol. 5, no. 7, e11659. 10.1371/journal.pone.0011659.

29. Yadav M., Stephan S., Bluestone J.A. Peripherally induced tregs – role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 232. doi: 10.3389/fimmu.2013.00232.

30. Yamaguchi T., Wing J.B., Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin. Immunol.*, 2011, Vol. 23, no. 6, pp. 424-430.

---

**Авторы:**

**Королевская Л.Б.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Сайдакова Е.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

**Шмагель Н.Г.** — д.м.н., врач-иммунолог, Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Пермь, Россия

**Шмагель К.В.** — д.м.н., заведующий лабораторией экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

---

**Authors:**

**Korolevskaya L.B.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Saidakova E.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

**Shmagel N.G.**, PhD, MD (Medicine), Clinical Immunologist, Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russian Federation

**Shmagel K.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

---

Поступила 27.05.2019  
Отправлена на доработку 13.09.2019  
Принята к печати 09.01.2020

---

Received 27.05.2019  
Revision received 13.09.2019  
Accepted 09.01.2020

## СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В НА РАННИХ СТАДИЯХ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

Бацунов О.К.<sup>1,2</sup>, Арсентьева Н.А.<sup>1</sup>, Любимова Н.Е.<sup>1</sup>, Эсауленко Е.В.<sup>1,3</sup>,  
Семенов А.В.<sup>1,2</sup>, Тотолян Арег А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Гепатит В — инфекционное вирусное заболевание, при котором происходит повреждение либо разрушение ткани печени и способное переходить в хроническую форму. При хроническом гепатите В (ХГВ) гепатоциты по мере гибели заменяются соединительной тканью, вследствие чего развивается фиброз, а затем цирроз печени. Ранняя диагностика фиброза печени является актуальной задачей при развитии ХГВ. Уже на этом этапе заболевания происходит активация иммунной системы, которая играет ведущую роль в повреждении печени при ХГВ. Основными регуляторами иммунных процессов выступают цитокины, которые опосредуют межклеточные взаимодействия. Отдельной группой цитокинов являются хемокины — белки клеточной миграции, при ХГВ они отвечают за инфильтрацию ткани печени активированными лейкоцитами. Цитокины и хемокины являются активными участниками фиброгенеза, поэтому они могут служить биомаркерами развития фиброза печени, в том числе и на ранних стадиях. Целью настоящего исследования стал анализ содержания некоторых цитокинов/хемокинов в периферической крови больных ХГВ для поиска потенциальных биомаркеров начальных стадий фиброза печени. В исследование включено 30 пациентов с подтвержденным диагнозом «ХГВ» со стадиями фиброза печени F0-F1 по шкале Metavir, 36 пациентов с диагнозом «хронический гепатит С» (F0-F1) и 37 условно здоровых лиц в качестве контрольной группы. Были определены концентрации следующих цитокинов/хемокинов: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3 $\alpha$ , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC методом мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex, США). В результате проведенного исследования установлено, что у пациентов с ХГВ в плазме крови содержание цитокина TNF $\alpha$  и хемокинов CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 повышено, а хемокина CCL8/MCP-2 — снижено, что указывает на возможность использования этих цитокинов/хемокинов в качестве биомаркеров повреждения печени при ХГВ. В обследованной группе пациентов с ХГВ не выявлено зависимости концентраций цитокинов и хемокинов в плазме крови от вирусной нагрузки, что может объясняться ее низким уровнем. Для цитокинов плазмы крови у пациентов с ХГВ обнаружены корреляции между

### Адрес для переписки:

Бацунов Олег Константинович  
ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.  
Тел.: 8 (906) 227-68-57.  
E-mail: batsunov@gmail.com

### Address for correspondence:

Batsunov Oleg K.  
Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology  
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.  
Phone: 7 (906) 227-68-57.  
E-mail: batsunov@gmail.com

### Образец цитирования:

О.К. Бацунов, Н.А. Арсентьева, Н.Е. Любимова, Е.В. Эсауленко, А.В. Семенов, Арег А. Тотолян «Содержание некоторых цитокинов и хемокинов в крови пациентов с хроническим гепатитом В на ранних стадиях фиброза печени» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 291-300.  
doi: 10.15789/1563-0625-COC-1964

© Бацунов О.К. и соавт., 2020

### For citation:

O.K. Batsunov, N.A. Arsentieva, N.E. Lyubimova, E.V. Esaulenko, A.V. Semenov, Areg A. Totolyan "Content of certain cytokines and chemokines in blood of patients with chronic hepatitis B in the early stages of liver fibrosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 291-300.  
doi: 10.15789/1563-0625-COC-1964

DOI: 10.15789/1563-0625-COC-1964

содержанием TNF $\alpha$  и хемокинов CCL2/MCP-1 и CCL8/MCP-2, чего не наблюдается в контрольной группе. В то же время в контрольной группе обнаружена корреляция между содержанием TNF $\alpha$  и хемокина CXCL9/MIG, что не выявлено в группе больных. Для обеих групп обнаружена корреляция между содержанием хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10. На основании данных исследования разработан алгоритм, который позволяет установить в качестве причины развития начальной формы фиброза F0-F1 хронический гепатит В либо хронический гепатит С по содержанию в плазме крови цитокинов IFN $\gamma$ , CCL2/MCP-1 и CCL8/MCP-2 с диагностической эффективностью 89,4%.

*Ключевые слова:* цитокины, хемокины, хронический гепатит В, фиброз печени

## CONTENT OF CERTAIN CYTOKINES AND CHEMOKINES IN BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B IN THE EARLY STAGES OF LIVER FIBROSIS

Batsunov O.K.<sup>a, b</sup>, Arsentieva N.A.<sup>a</sup>, Lyubimova N.E.<sup>a</sup>, Esaulenko E.V.<sup>a, c</sup>,  
Semenov A.V.<sup>a, b</sup>, Totolyan Areg A.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Hepatitis B is an infectious viral disease in which damage or destruction of liver tissue occurs, and which can turn into a chronic form. In chronic hepatitis B (CHB), hepatocytes are replaced by connective tissue as they die, resulting in fibrosis, and then cirrhosis of the liver. Early diagnosis of liver fibrosis is an urgent task in the development of CHB. Already at this stage of the disease, the immune system is activated, which plays a leading role in liver damage in CHB. The main regulators of immune processes are cytokines, which mediate intercellular interactions. A separate group of cytokines are chemokines – proteins of cell migration. In CHB, they are responsible for infiltration of liver tissue by activated white blood cells. Cytokines and chemokines are active participants in fibrogenesis, so they can serve as biomarkers for the development of liver fibrosis, including in the early stages. The purpose of this study was to analyze the content of certain cytokines/chemokines in the peripheral blood of patients with CHB in order to search for potential biomarkers of the initial stages of liver fibrosis. The study included 30 patients with a confirmed diagnosis of CHB with stages of liver fibrosis F0-F1 on the Metavir scale, 36 patients with a diagnosis of chronic hepatitis C (F0-F1) and 37 conditionally healthy individuals as a control group. Concentrations of the following cytokines/chemokines were determined: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3a, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC by multiplex analysis using xMAP technology (Luminex, USA). As a result of the study, it was found that in patients with CHB, the plasma content of cytokine TNF $\alpha$  and chemokines CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG and CXCL10/IP-10 was increased, and the chemokine CCL8/MCP-2 was reduced, which indicates the possibility of using these cytokines/chemokines as biomarkers of liver damage in CHB. In the examined group of patients with CHB, there was no dependence of the concentrations of cytokines and chemokines in the blood plasma on the viral load, which may be explained by its low level. For plasma cytokines in patients with CHB, correlations were found between TNF $\alpha$  and CCL2/MCP-1 and CCL8/MCP-2 chemokines, which was not observed in the control group. At the same time, in the control group, a correlation was found between the content of TNF $\alpha$  and the chemokine CXCL9/MIG, which was not detected in the group of patients. For both groups, a correlation was found between the content of CXCL9/MIG and CXCL10/IP-10 chemokines. Based on the study data, an algorithm has been developed that allows us to establish chronic hepatitis B or chronic hepatitis C as the cause of the initial form of fibrosis F0-F1 in terms of the content of cytokines IFN $\gamma$ , CCL2/MCP-1 and CCL8/MCP-2 in blood plasma with a diagnostic efficiency of 89.4%.

*Keywords:* cytokines, chemokines, chronic hepatitis B, liver fibrosis

## Введение

Гепатит В — инфекционное вирусное заболевание, при котором происходит повреждение либо разрушение ткани печени. Риск развития хронического заболевания колеблется от 90% у новорожденных, родившихся от НВсAg-позитивных матерей, до 25–30% у грудных детей и детей в возрасте до 5 лет и составляет менее 10% у взрослых [4]. Кроме того, вероятность трансформации острого вирусного гепатита В в хронический намного выше у лиц с иммунодефицитными состояниями [3]. В настоящее время, по данным ВОЗ, в мире насчитывается около 257 млн носителей хронического гепатита В (ХГВ) [8]. Течение заболевания — волнообразное, с периодическими обострениями. По мере гибели клетки печени заменяются соединительной тканью, вследствие чего развивается фиброз, а затем цирроз печени. В некоторых случаях возможно развитие гепатоцеллюлярной карциномы [4].

Согласно современным представлениям, повреждение печени при ХГВ зависит от интенсивности воспалительных процессов, уровня вирусемии и генотипа вируса, при этом ведущую роль играет активность иммунной системы [7]. Участниками воспалительного процесса со стороны врожденного иммунитета являются нейтрофилы, натуральные киллеры и локальные фагоциты. Реакция адаптивного иммунитета на вирусную инфекцию — развитие таких иммунных ответов, как цитотоксический, в результате которого появляются специфические цитотоксические клетки, и гуморальный, с формированием антител к различным молекулярным структурам вируса [6].

В регуляции иммунных процессов принимают участие цитокины, специальные пептиды иммунной системы. Отдельную группу цитокинов составляют хемокины — молекулы, регулирующие клеточную миграцию. Выделяют четыре класса хемокинов в зависимости от расположения консервативных цистеинов в белковой молекуле: СХС, СС, СХЗС и С, где С обозначает остатки цистеина, а Х — любой другой аминокислотный остаток, разделяющий цистеины. При развитии воспалительных реакций именно они обеспечивают привлечение активированных клеток в очаг воспаления [6]. Основными источниками хемокинов в печени являются активированные моноциты, клетки Купфера, эндотелиальные клетки и гепатоциты [7].

Одной из актуальных задач ведения больных с ХГВ является мониторинг функционального состояния печени. «Золотым стандартом» диагностики фиброза печени остается пункционная биопсия — инвазивный метод, который не может быть использован для динамического наблю-

дения. Для оценки фиброза также применяют неинвазивный метод — эластометрию печени, которая позволяет с относительно высокой точностью дифференцировать выраженные и тяжелые степени фиброза, но не обладает достаточной чувствительностью при определении ранних стадий процесса. Цитокины принимают участие в фиброгенезе и потенциально могут служить биомаркерами фиброза печени [5]. С применением современных методов мультиплексного анализа, позволяющего в короткие сроки проанализировать содержание большого спектра биомолекул в плазме крови, возможно точное количественное определение цитокинов и хемокинов, которые могут быть использованы для оценки активности формирования фиброза [2]. Его интенсивность зависит от активности иммунных процессов, сопровождающих заболевание, однако их регуляция с помощью цитокинов имеет высокую внутреннюю сложность за счет многочисленных взаимосвязей разных цитокинов, их рецепторов и клеток-мишеней. По этой причине в настоящее время иммунопатогенез хронического гепатита В не является полностью изученным. Также мало данных о роли различных цитокинов в развитии фиброза при этом заболевании, особенно у пациентов со слабо выраженными клиническими проявлениями.

Целью настоящего исследования стал анализ содержания некоторых цитокинов/хемокинов в периферической крови больных ХГВ для поиска потенциальных биомаркеров начальных стадий фиброза печени.

## Материалы и методы

Настоящее исследование было выполнено в 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. На проведение данного исследования было получено согласие Этического комитета ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, протокол № 3 от 22.11.2016.

Материалом исследования служила периферическая кровь. Образцы крови забирали в вакуумные пробирки с антикоагулянтom  $K_2EDTA$ , центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин для отделения плазмы. Плазму отбирали в пробирки типа Эппендорф, замораживали и хранили при  $t -80^\circ C$ .

В исследование были включены 30 пациентов (11 мужчин и 19 женщин) в возрасте 24–69 лет с подтвержденным диагнозом «ХГВ», без сопутствующих патологий. Все пациенты про-

ходили лечение в Клинической инфекционной больнице им. С.П. Боткина, являющейся клинической базой кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ. Диагноз был подтвержден обнаружением в периферической крови пациентов серологических маркеров вируса гепатита В: HBsAg, анти-HBs IgG, анти-HBcIgG, HBeAg, анти-HBe IgG, наличием вирусной ДНК. Для определения стадии фиброза пациентам проводилась эластометрия печени. В настоящее исследование были включены пациенты с начальными стадиями фиброза печени (F0-F1 по шкале Metavir) и уровнем вирусной нагрузки менее 7000 копий/мл.

Группу сравнения составили 36 пациентов с диагнозом «хронический гепатит С» (ХГС) на ранних стадиях фиброза печени (F0-F1), проходивших лечение в этом же учреждении, сопоставимые по полу и возрасту с исследуемой группой. Диагноз был подтвержден обнаружением в периферической крови суммарных антител к вирусу гепатита С (анти-HCV) и выявлением РНК вируса в крови.

Контрольная группа включала 37 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с исследуемой группой, у которых отсутствовали какие-либо клинико-лабораторные и морфологические признаки поражения печени, а также инфекционные и соматические заболевания.

#### Проведение анализа

Концентрации цитокинов/хемокинов: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CCL20/MIP-3 $\alpha$  определяли с помощью мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex, США) с использованием тест-систем Milliplex MAG Human Cytokine/Chemokine Panel I, II, III (Millipore, США), основанных на магнитных микросферах Milliplex Mag, согласно инструкциям производителя. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе Luminex MAGPIX (Luminex, США).

#### Статистическая обработка

Статистическую обработку осуществляли с применением программ GraphPad Prizm 6 и Statistica 8. Для построения деревьев решений использовали программу JMP 14. Информативность диагностических показателей определяли методом характеристического (ROC) анализа. Полученные данные не подчинялись нормальному распределению, поэтому для оценки выборок использовали методы непараметрической статистики, в том числе критерий Манна-Уитни, коэффициент корреляции Спирмена. Достоверными считались различия между группами при

$p < 0,01$ . Результаты представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ).

## Результаты

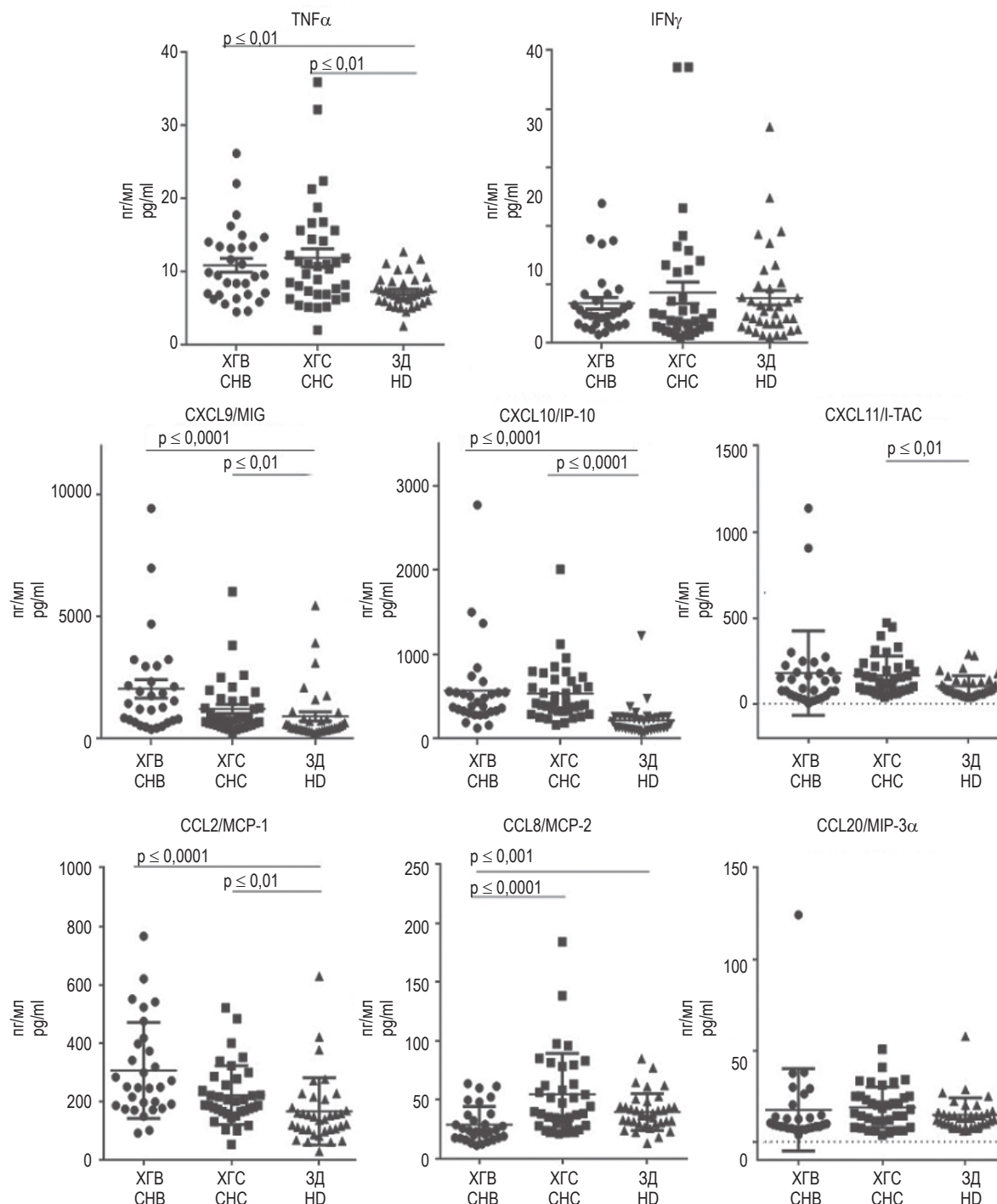
В результате проведенного анализа в периферической крови пациентов с хроническими вирусными гепатитами (ХВГ) и условно здоровых лиц выявлены достоверные различия в содержании цитокинов TNF $\alpha$ , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2 и отсутствие достоверных различий в содержании цитокинов IFN $\gamma$ , CXCL11/I-TAC и CCL20/MIP-3 $\alpha$ . Полученные результаты определения концентраций цитокинов/хемокинов представлены на рисунке 1.

В ходе настоящего исследования было показано, что концентрация TNF $\alpha$  в плазме крови больных ХВГ была повышена в 1,4 раза по сравнению с группой здоровых доноров (9,7 (6,9-13,6) пг/мл; 6,8 (5,9-8,6) пг/мл;  $p = 0,0012$ ). Выявлены повышенные концентрации хемокинов: CXCL9/MIG – в 3,3 раза (1433,0 (700,3-2643,0) пг/мл; 441,1 (341,9-806,9);  $p < 0,0001$ ), CXCL10/IP-10 – в 2,2 раза (405,7 (312,2-549,5) пг/мл по сравнению с 183,5 (112,9-254,7) пг/мл;  $p < 0,0001$ ), CCL2/MCP-1 в 1,7 раза (249,5 (183,7-402,2) пг/мл; 143,7 (102,7-200,4) пг/мл;  $p < 0,0001$ ); сниженное содержание – CCL8/MCP-2, в 1,6 раза (23,6 (17,8-37,4) пг/мл; 37,8 (29,9-44,3) пг/мл;  $p = 0,0011$ ). Для хемокина CXCL11/I-TAC наблюдается тенденция к повышению: 110,8 (45,7-194,8) пг/мл по сравнению с 77,9 (57,7-124,2) пг/мл,  $p = 0,4$  у здоровых доноров, а для CCL20/MIP-3 $\alpha$  – тенденция к снижению: 9,3 (7,7-17,4) пг/мл по сравнению с 12,9 (9,8-15,9) пг/мл,  $p = 0,2$  у здоровых доноров. Концентрация IFN $\gamma$  у пациентов с ХВГ с начальными стадиями фиброза не отличалась от таковой у здоровых доноров (4,8 (3,2-8,3) пг/мл; 5,1 (2,9-9,7) пг/мл).

Чтобы проанализировать взаимосвязи между исследованными цитокинами и хемокинами, был проведен корреляционный анализ между ними в группе больных ХВГ и в группе условно здоровых лиц. Значимые корреляции представлены в таблице 1.

Для цитокинов периферической крови у обследованной группы пациентов обнаружены корреляции между содержанием TNF $\alpha$  и хемокинов CCL2/MCP-1 и CCL8/MCP-2, чего не наблюдается в контрольной группе. В то же время в контрольной группе обнаружена корреляция между содержанием TNF $\alpha$  и хемокина CXCL9/MIG, что не выявлено в группе больных. Для обеих групп обнаружена корреляция между содержанием хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10.

Таким образом, у больных ХВГ F0-F1 выявлено пять цитокинов/хемокинов, значения которых



**Рисунок 1. Концентрации некоторых цитокинов и хемокинов в периферической крови пациентов с ХГВ и ХГС со стадиями фиброза печени F0-F1 и здоровых доноров (ЗД)**

Figure 1. Concentrations of certain cytokines and chemokines in the peripheral blood of patients with CHB and CHC with F0-F1 fibrosis stages and healthy donors (HD)

достоверно отличались от значений контрольной группы. Для того чтобы ответить на вопрос, являются ли эти цитокины специфичными для ХГВ, данные показатели сравнили со значениями у больных ХГС. Выявлено различие в содержании CCL8/MCP-2 в плазме крови с достоверностью  $p < 0,0001$  и тенденция к увеличению кон-

центрации CCL2/MCP-1 и CXCL9/MIG в группе пациентов ХГВ по сравнению с ХГС с достоверностью  $p < 0,05$ . Для оценки возможности разделения пациентов ХГВ и ХГС на ранних стадиях фиброза по уровню хемокинов в плазме крови были построены ROC-кривые, представленные на рисунке 2.

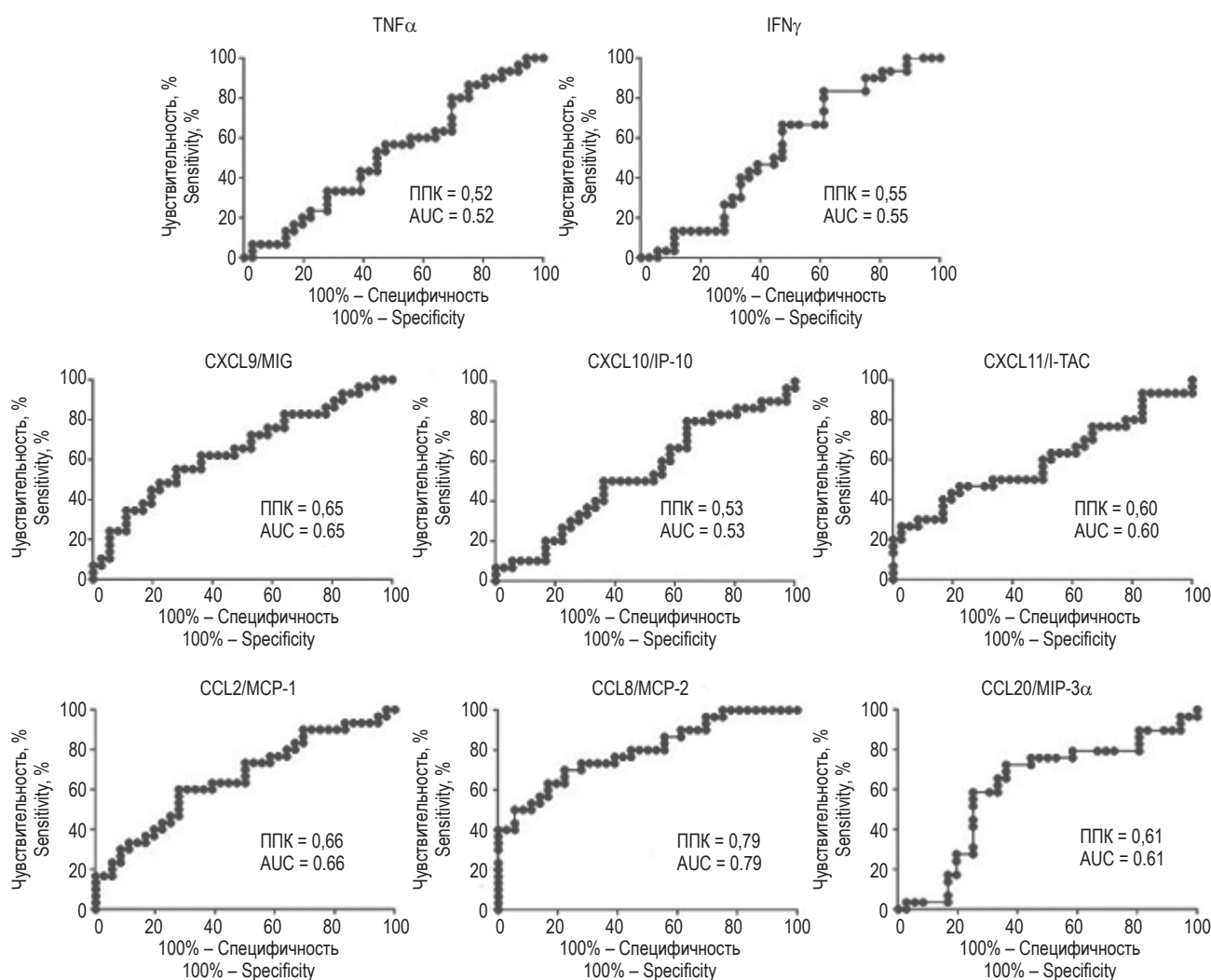
**ТАБЛИЦА 1. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ИЗМЕРЕННЫХ ЦИТОКИНОВ И ХЕМОКИНОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ В И У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ**

TABLE 1. CORRELATIONS OF MEASURED CYTOKINES AND CHEMOKINES IN PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B AND IN HEALTHY DONORS

Цитокин/хемокин Cytokine/chemokine		ХГВ, r CHB, r	p	Доноры, r Donors, r	p
TNF $\alpha$	CCL2/MCP-1	0,75	< 0,0001	-	-
	CCL8/MCP-2	0,57	0,0011	-	-
	CXCL9/MIG	-	-	0,59	0,0001
CXCL9/MIG	CXCL10/IP-10	0,56	0,0014	0,57	0,0003

**Примечание.** r – коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Note. r - Spearman's rank correlation coefficient.



**Рисунок 2. ROC-кривые, характеризующие зависимость чувствительности и специфичности исследованных цитокинов и хемокинов при сравнении групп пациентов со стадиями фиброза печени F0-F1, с указанием площади под кривой (AUC, area under ROC curve)**

Figure 2. ROC-curves that characterize the dependence of the sensitivity and specificity of the studied cytokines and chemokines when comparing groups of patients with stages of liver fibrosis F0-F1, indicating the area under the curve

Результаты ROC-анализа показали, что ни один из цитокинов/хемокинов по отдельности не обладает достаточной специфичностью и чувствительностью, а максимальное значение площади под кривой выявляется для хемокина CCL8/MCP-2 и равно 0,79, однако не достигает порогового значения 0,8. Вследствие этого было принято решение оценить комбинацию цитокинов в качестве биомаркеров, способных охарактеризовать группы пациентов с ХГВ и ХГС на ранних стадиях фиброза. Для этого был применен метод многомерного статистического анализа данных деревьев решений. Полученный алгоритм дифференциальной диагностики причины начальной стадии фиброза печени при хронических вирусных гепатитах представлен на рисунке 3.

В результате анализа были получены следующие пороговые значения для дифференциации причины развития начальной формы фиброза между хроническим гепатитом В и хроническим гепатитом С: CCL2/MCP-1 – 245,3 пг/мл, CCL8/MCP-2 – 21,5 и 28,0 пг/мл, IFN $\gamma$  – 2,5 пг/мл. Их использование позволяет достигнуть диагностической эффективности в 89,4%, что говорит о хорошем качестве выбранной модели.

## Обсуждение

Обследованная группа больных ХГВ включала пациентов с низкой вирусной нагрузкой и мини-

мальной степени повреждения печени, однако содержание TNF $\alpha$  в группе больных было повышено по сравнению с группой условно здоровых доноров, что свидетельствует об активации иммунных процессов.

Обнаруженная положительная корреляция TNF $\alpha$  и CCL2/MCP-1 ранее была описана при различных заболеваниях, например при раке простаты или при развитии постменопаузального остеопороза [13, 14]. Наличие у CCL2/MCP-1 двух эффектов – привлечение в очаг воспаления моноцитов и поляризация Т-хелперов от наивных к Т-хелперам второго типа посредством индукции синтеза IL-4 [14], – скорее, указывает на ведущую роль этого хемокина в первичном распознавании патогена и выборе варианта иммунного ответа. Следовательно, повышение CCL2/MCP-1 является маркером ранней активации иммунной системы, в то время как повышение TNF $\alpha$  – маркер уже сформированного ответа. В патогенезе хронической инфекции эти состояния тесно соседствуют, чем, возможно, объясняется обнаруженная корреляция.

Известно, что CCL8/MCP-2 является хемотаксическим фактором для моноцитов/макрофагов, Т-хелперов первого типа и натуральных киллеров. В плазме крови обследованной группы пациентов показано его снижение. Кроме других эффектов, он опосредует миграцию этих клеток в область желчных протоков и портальных

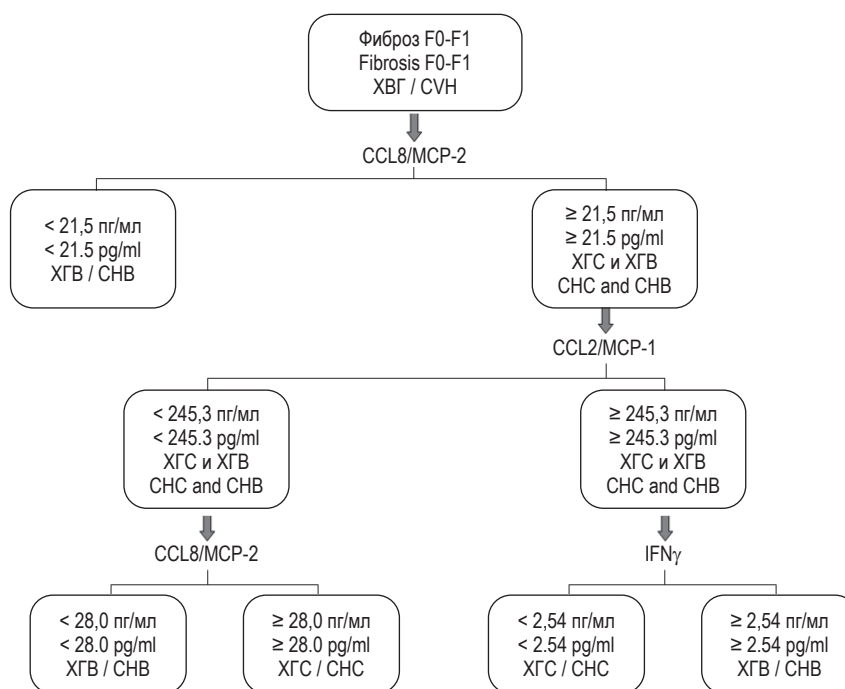


Рисунок 3. Алгоритм разделения пациентов с ХВГ на стадиях фиброза печени F0-F1 по содержанию цитокинов CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2 и IFN $\gamma$

Figure 3. Algorithm for separating patients with chronic viral hepatitis (CVH) at the stages of liver fibrosis F0-F1 by the content of cytokines CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2 and IFN $\gamma$

трактов при воспалении [2]. Можно предположить, что его пониженное содержание у больных ХГВ на ранних стадиях фиброза печени связано с действием иммуносупрессорных механизмов, препятствующих разрушению печени в стадии интеграции. С другой стороны, естественным антагонистом CCR3, одного из рецепторов CCL8/MCP-2, является хемокин CXCL11/I-TAC [11], концентрация которого была повышена у пациентов с ХГВ, что также может обуславливать снижение эффективности данного хемокина. При этом для CCL8/MCP-2 обнаружена положительная корреляция с уровнем TNF $\alpha$ .

Хемокин CCL20/MIP-3 $\alpha$  активирует миграцию незрелых дендритных клеток и Т-клеток памяти [9]. Ранее нами была установлена прямая связь между содержанием CCL20/MIP-3 $\alpha$  и тяжестью фиброза печени у больных хроническим вирусным гепатитом С [2]. В исследованной группе больных с ХГВ не обнаружено достоверных отклонений уровня этого хемокина, что может быть связано с отсутствием фиброза у этих пациентов.

Хемокины CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и CXCL11/I-TAC являются IFN $\gamma$ -зависимыми [12]. В нашей работе эта взаимосвязь подтверждается выявленной положительной корреляцией их концентраций для группы условно здоровых доноров. Для группы пациентов наблюдается отсутствие корреляционных зависимостей между IFN $\gamma$  и этими хемокинами. Концентрация IFN $\gamma$  у пациентов не отличалась от значений контрольной группы, поэтому отсутствие указанных взаимосвязей может свидетельствовать о нарушении иммунных взаимодействий в результате иммуносупрессивного действия вируса и его антигенов.

Группа IFN $\gamma$ -зависимых хемокинов CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и CXCL11/I-TAC опосредуют миграцию активированных клеток. Выделяемый дендритными клетками CXCL10/IP-10 привлекает Т-хелперы первого типа в лимфоузлы, а CXCL9/MIG, наоборот, — в очаг воспаления. При этом оба хемокина участвуют в привлечении в очаг воспаления активированных эффекторных клеток — цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров. У пациентов с ХГВ с фиброзом F0-F1 и низкой вирусной нагрузкой обнаружено отсутствие повышения IFN $\gamma$  в сочетании с повышенными уровнями CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10. Описанные в литературе свойства этих хемокинов позволяют предположить, что они участвуют в выборе типа иммунного ответа и его тонкой регуляции [1, 10]. Повышение содержания хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 в плазме периферической крови указывает на активацию иммунных процессов,

тогда как другие признаки воспаления или повреждения печени выражены слабо. Ввиду того, что разрушение печени при ХГВ связано именно с активной деятельностью иммунной системы, эти хемокины могут выступать потенциальными маркерами прогрессирования развития фиброза.

В обследованной группе больных ХГВ не выявлено зависимости концентраций цитокинов и хемокинов в плазме крови от вирусной нагрузки, что может объясняться ее низким уровнем.

Ранее нами было показано увеличение концентраций TNF $\alpha$ , CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 и CCL2/MCP-1 в плазме крови больных ХГС [2], что также происходит при ХГВ. Сравнение уровней исследованных цитокинов у пациентов с ХГВ и ХГС выявило различие в содержании CCL8/MCP-2, а также тенденцию к увеличению концентрации CCL2/MCP-1 и CXCL9/MIG при ХГВ по сравнению с ХГС. Эти результаты указывают на возможные различия иммунных механизмов сдерживания активности вирусов гепатитов С и В. Несмотря на обнаруженные значимые отличия содержания хемокина CCL8/MCP-2 у пациентов с ХГВ и ХГС, площадь под ROC-кривой для него равна 0,79, что не позволяет достоверно разделить группы больных по этому параметру. Однако использование нескольких цитокинов (IFN $\gamma$ , CCL2/MCP-1 и CCL8/MCP-2) позволяет построить дерево решений с диагностической эффективностью 89,4%.

## Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что у пациентов с диагнозом «хронический гепатит В» на ранних стадиях фиброза печени при низкой вирусной нагрузке, несмотря на отсутствие или слабое проявление клинических признаков заболевания, в плазме крови обнаружено повышенное содержание цитокина TNF $\alpha$  и хемокинов CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 и пониженное — CCL8/MCP-2, что указывает на возможность использования указанных параметров в качестве биомаркеров повреждения печени при хроническом гепатите В.

На основании полученных данных разработан алгоритм, который позволяет дифференцировать в качестве причины развития начальной стадии фиброза печени (F0-F1) хронический гепатит В либо хронический гепатит С на основании определения уровня цитокинов IFN $\gamma$ , CCL2/MCP-1 и CCL8/MCP-2 в плазме крови.

## Список литературы / References

1. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Жебрун Д.А., Васильева Е.В., Тотолян Арег А. Роль хемокинового рецептора CXCR3 и его лигандов при некоторых иммунопатологических состояниях // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 617-632. [Arsentieva N.A., Semenov A.V., Zhebrun D.A., Vasilyeva E.V., Totolian Areg A. Role of CXCR3 chemokine receptor and its ligands in certain diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 617-632. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-617-632.
2. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Любимова Н.Е., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Козлов К.В., Жданов К.В., Тотолян Арег А. Содержание цитокинов и хемокинов в плазме крови больных хроническим вирусным гепатитом С // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 1. С. 83-92. [Arsentyeva N.A., Semenov A.V., Lyubimov N.E., Basina V.V., Esaulenko E.V., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Totolian Areg A. Contents cytokines and chemokines in blood plasma of patients with chronic viral hepatitis C. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 1, pp. 83-92. (In Russ.)]
3. Демиденко Т.П., Неверов В.А.; под ред. Ю.В. Лобзина. Вирусные гепатиты: пособие для врачей. СПб., 2011. 229 с. [Demidenko T.P., Neverov V.A. Viral hepatitis: a guide for doctors. Ed. Yu.V. Lobzin]. St. Petersburg, 2011. 229 p.
4. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 1008 с. [Pokrovsky V.I., Pak S.G., Briko N.I., Danilkin B.K. Infectious diseases and epidemiology: textbook]. Moscow: GEOTAR-Media, 2012. 1008 p.
5. Сурков А.Н., Намазова-Баранова Л.С., Геворкян А.К. Неинвазивная диагностика фиброза и цирроза печени при хронических вирусных гепатитах (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика, 2016. Т. 61, № 4. С. 209-214. [Surkov A.N., Namazova-Baranova L.S., Gevorkyan A.K. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis in chronic viral hepatitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2016, Vol. 61, no. 4, pp. 209-214. (In Russ.)]
6. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology: textbook]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
7. Chen C.J., Yang H.I., Su J., Jen C.L., You S.L., Lu S.N., Huang G.T., Iloeje U.H., REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*, 2006, Vol. 295, no. 1, pp. 65-73.
8. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization, 2017. Accessed August 14, 2019. Available at: <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>.
9. Lee A.Y.S., Korner H. The CCR6-CCL20 axis in humoral immunity and T-B cell immunobiology. *Immunobiol.*, 2019, Vol. 224, no. 3, pp. 449-454.
10. Mah A.Y., Cooper M.A. Metabolic regulation of Natural Killer Cell IFN- $\gamma$  production. *Crit. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 36, no. 2, pp. 131-147.
11. Metzemaekers M., Vanheule V., Janssens R., Struyf S., Proost P. Overview of the mechanisms that may contribute to the non-redundant activities of interferon-inducible CXC chemokine receptor 3 ligands. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 8, 1970. doi: 10.3389/fimmu.2017.01970.
12. van Raemdonck K., van den Steen P.E., Liekens S., van Damme J., Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytok. Gro. Fact. Rev.*, 2015, Vol. 26, no. 3, pp. 311-327.
13. Yang X.W., Wang X.S., Cheng F.B., Wang F., Wan L., Wang F., Huang H.X. Elevated CCL2/MCP-1 levels are related to disease severity in postmenopausal osteoporotic patients. *Clin. Lab.*, 2016, Vol. 62, no. 11, pp. 2173-2181.
14. Zhang J., Patel L., Pienta K.J. Targeting chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) as an example of translation of cancer molecular biology to the clinic. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2010, Vol. 95, pp. 31-53.

### Авторы:

**Бацунов О.К.** — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Арсентьева Н.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

### Authors:

**Batsunov O.K.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Arsentieva N.A.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Любимова Н.Е.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

**Lyubimova N.E.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

**Эсауленко Е.В.** — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией вирусных гепатитов ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующая кафедрой инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Esaulenko E.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Viral Hepatitis, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Adult Infectious Diseases and Epidemiology, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Семенов А.В.** — д.б.н., заместитель директора по инновационной работе ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Semenov A.V.**, PhD, MD (Biology), Deputy Director for Innovation, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Тотolian Арег А.** — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Totolian Areg A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 11.03.2019  
Отправлена на доработку 06.04.2019  
Принята к печати 11.03.2020

Received 11.03.2019  
Revision received 06.04.2019  
Accepted 11.03.2020

## ЛОКАЛЬНАЯ И СИСТЕМНАЯ ПРОДУКЦИЯ 45 ЦИТОКИНОВ ПРИ ОСЛОЖНЕННОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Нероев В.В., Зайцева О.В., Балацкая Н.В., Лазутова А.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца»  
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Резюме.** Диабетическая ретинопатия (ДР) имеет многофакторную природу с участием множества цитокинов и факторов роста. Изучение уровней цитокинов в биологических жидкостях представляется актуальным с целью углубленного понимания патогенеза заболевания. Цель работы – сравнительный анализ системных (сыворотка крови (СК)) и локальных (стекловидное тело (СТ)) уровней 45 цитокинов у пациентов с осложненной пролиферативной ДР, а также при различных особенностях клинической картины заболевания. Содержание цитокинов протестировано в 53 пробах СК и 32 пробах СТ 53 пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа с тяжелым течением пролиферативной ДР. Использовали метод мультиплексного анализа на платформе xMAP в программе Luminex xPONENT 3.1, с помощью наборов 45 plex (ProcartaPlex, eBioscience, Австрия). В пределах уровней чувствительности тест-системы в значительном количестве тест-проб СК выявлялись 25, а СТ – 27 цитокинов. В пробах СТ средние уровни 7 медиаторов – IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, HGF, LIF и VEGF-A – оказались достоверно выше, чем в СК, что является доказательством их локальной интраокулярной продукции. Показаны корреляционные связи между содержанием в СТ ростового фактора VEGF-A и ряда цитокинов, в том числе участвующих в воспалительных реакциях, что свидетельствует о взаимосвязи звеньев патогенеза: воспаления и неоваскуляризации. Определены особенности интраокулярного содержания цитокинов при различных проявлениях диабетических изменений глаз. Показана связь гемофтальма с повышением IL-8 и IP-10, руброза радужки – с повышением LIF, активности пролиферативной ДР – с увеличением MCP-1, крайне тяжелых изменений – с ростом IL-6 и EGF. Тестирование цитокинов в биологических жидкостях информативно при изучении механизмов воспаления, неоваскуляризации, а также защитных реакций в патогенезе ДР.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, диабетическая ретинопатия, тракционная отслойка сетчатки, гемофтальм, руброз радужки, патогенез, цитокины, стекловидное тело, сыворотка крови

## LOCAL AND SYSTEMIC PRODUCTION OF 45 CYTOKINES IN COMPLICATED PROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY

Neroev V.V., Zaytseva O.V., Balatskaya N.V., Lazutova A.A.

Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Diabetic retinopathy (DR) is multifactorial by its origin, involving many cytokines and growth factors. Studies of cytokine levels in biological fluids seem to be relevant for an in-depth understanding of

### Адрес для переписки:

Балацкая Наталья Владимировна  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр глазных болезней имени Гельмгольца»  
Министерства здравоохранения РФ  
105062, Россия, Москва,  
ул. Садовая-Черногрозская, 14/19.  
Тел.: 8 (916) 976-61-27.  
E-mail: balnat07@rambler.ru

### Address for correspondence:

Balatskaya Natalia V.  
Helmholtz National Medical Research  
Center of Eye Diseases  
105062, Russian Federation, Moscow,  
Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19.  
Phone: 7 (916) 976-61-27.  
E-mail: balnat07@rambler.ru

### Образец цитирования:

В.В. Нероев, О.В. Зайцева, Н.В. Балацкая,  
А.А. Лазутова «Локальная и системная продукция  
45 цитокинов при осложненной пролиферативной  
диабетической ретинопатии» // Медицинская  
иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 301-310.  
doi: 10.15789/1563-0625-LAS-1802

© Нероев В.В. и соавт., 2020

### For citation:

V.V. Neroev, O.V. Zaytseva, N.V. Balatskaya, A.A. Lazutova  
“Local and systemic production of 45 cytokines in complicated  
proliferative diabetic retinopathy”, Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2,  
pp. 301-310. doi: 10.15789/1563-0625-LAS-1802

DOI: 10.15789/1563-0625-LAS-1802

the disease pathogenesis. The purpose of the work was a comparative analysis of 45 cytokines at systemic (blood serum (BS)) and local (vitreous humor (VH)) levels in the patients with complicated proliferative DR, showing various features of the clinical pattern. The content of cytokines was tested in 53 samples of BS and 32 samples of VH in 53 patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus with severe proliferative DR. We used the multiplex analysis technique by means of xMAP platform and Luminex xPONENT 3.1 program using 45-plex sets (Procarta Plex «eBioscience», Austria). 25 cytokines were detected at significant amounts in BS test samples, and 27 cytokines were revealed in VH specimens. Sensitivity limits of the test system allowed to find significantly higher levels of 7 cytokines (IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, HGF, LIF and VEGF-A) in VH samples, than in the BS, thus indicating to their local intraocular production. Correlations between the contents of VEGF-A growth factor and amounts of cytokines, including those involved in inflammatory reactions, are shown in VH, thus presuming the interrelation of pathogenetic components, i.e., inflammation and neoangiogenesis. The features of intraocular cytokine content were determined for various manifestations of diabetic ocular changes. Hemophthalmus has been shown to be associated with increased IL-8 and IP-10; iris rubeosis, with increase in LIF; proliferative DR activity was associated with higher MCP-1 levels, and extremely severe changes were related to increase in IL-6 and EGF. Testing of cytokines in biological fluids is informative when studying the mechanisms of inflammation, neoangiogenesis, and protective responses in pathogenesis of diabetic retinopathy.

**Keywords:** diabetes mellitus, diabetic retinopathy, tractional retinal detachment, hemophthalmus, iris rubeosis, pathogenesis, cytokines, vitreous humor, blood serum

## Введение

Диабетическая ретинопатия (ДР) — тяжелое позднее микрососудистое осложнение сахарного диабета (СД), одна из ведущих причин слепоты и слабовидения в мире среди лиц трудоспособного возраста. По заключению Всемирной организации здравоохранения ДР занимает 5-ое место в мире среди причин слабовидения и 4-ое — среди причин слепоты пациентов. 2,6% людей в мире слепы вследствие ДР [7].

В Российской Федерации общая заболеваемость ДР составляет 303,5 на 100 тысяч взрослого населения. ДР диагностирована у 7,8% людей с СД. В нозологической структуре инвалидности по зрению доля глазных осложнений СД достигает 8% [3].

Патогенез глазных микрососудистых изменений при СД крайне сложен и во многих аспектах остается до конца не изученным. Важная роль в нем отводится нарушению продукции цитокинов и факторов роста. Именно они являются биологически активными молекулами, опосредующими основные звенья патогенеза ДР — неоангиогенез, воспаление и, по последним данным, нейродегенерацию [31, 35].

Изучение цитокинов в биологических средах глаза представляется актуальным с целью более углубленного понимания патогенеза ДР. В литературе представлено значительное число публикаций, посвященных оценке локальной и системной продукции цитокинов при ДР, диабетическом макулярном отеке. Однако большинство работ посвящены исследованиям отдельных иммуномедиаторов, хемокинов и факторов роста. Было обнаружено значительное повышение уровней провоспалительных цитокинов IL-6

и IL-8 в стекловидном теле (СТ) по сравнению с сывороткой крови (СК), что свидетельствует о преимущественно локальном воспалении при пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР) [21], а также увеличение содержания IL-17, TNF $\alpha$  и вазопротрофиеративного фактора роста VEGF-Ав СТ и СК у пациентов с ПДР [25], повышенные уровни воспалительных цитокинов [28] и других активных молекул.

В то же время лишь в ограниченном числе работ сделан акцент на комплексном изучении панелей цитокинов (одновременном определении от 20 до 50 молекул в тест-пробе) и сопоставительном анализе локальных и системных уровней данных белков [11, 16, 33, 38]. В единичных публикациях представлена оценка уровней цитокинов в сопоставлении с особенностями клинической картины заболевания.

Комплексное исследование панели цитокинов с различными биологическими функциями в жидкостных средах глаза и крови представляется крайне актуальным с точки зрения систематического подхода к изучению молекулярных механизмов патогенеза заболевания.

**Цель работы** — провести сравнительный анализ системных (СК) и локальных (СТ) уровней 45 цитокинов: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF $\beta$ , TNF $\alpha$ , GRO- $\alpha$ , IP-10, SDF-1 $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, Eotaxin, GM-CSF, NGF- $\beta$ , BDNF, EGF, FGF-2, HGF, LIF, PDGF-BB, PIGF-1, SCF, VEGF-A, VEGF-D у пациентов с осложненной ПДР, а также при различных особенностях клинической картины заболевания.

## Материалы и методы

Обследованы 53 пациента с СД 1-го и 2-го типа с тяжелым течением ПДР. Среди них 37 женщин и 16 мужчин. Достоверных отличий по полу, возрасту, давности заболевания СД, уровню HbA1c выявлено не было.

Пациенты проходили стандартное офтальмологическое обследование в условиях отдела по изучению патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России, включавшее визометрию (без коррекции, с максимальной коррекцией), тонометрию, биомикроскопию, осмотр глазного дна в условиях миопии, ультразвуковое А-В-сканирование, фундусфоторегистрацию (при возможности), оптическую когерентную томографию сетчатки (при возможности).

У всех пациентов этой группы, по данным клинического обследования, были выявлены рецидивирующий и/или организовавшийся гемофтальм и/или тракционная отслойка сетчатки как минимум на одном глазу на фоне тяжелых диабетических изменений сетчатки. Осложненный характер ПДР на обоих глазах был отмечен у 42 больных (79%).

На 32 глазах 32 пациентов проводилось хирургическое вмешательство, включавшее микроинвазивную субтотальную витрэктомию, швартэктомию, эндолазеркоагуляцию сетчатки, эндотампонаду силиконовым маслом по стандартной трехпортовой методике.

Забор крови с целью получения образцов СК осуществляли до каких-либо манипуляций. Пробы СТ забирались непосредственно в начале хирургического вмешательства. Забор биологических жидкостей проводился с согласия пациента после разъяснения целей исследования.

Иммунологические исследования проводились на базе отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

Все биопробы до исследования хранились при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Концентрацию цитокинов определяли методом мультиплексного анализа на платформе xMAP (прибор MAGPIX, Luminex Corporation, США) в программе Luminex xPONENT 3.1, с помощью наборов 45 plex (ProcartaPlex, eBioscience, Австрия).

В пробах биологических жидкостей определяли содержание 45 цитокинов: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF $\beta$ , TNF $\alpha$ , GRO- $\alpha$ , IP-10, SDF-1 $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, Eotaxin, GM-CSF, NGF- $\beta$ , BDNF, EGF, FGF-2, HGF, LIF, PDGF-BB, PIGF-1, SCF, VEGF-A, VEGF-D.

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Учитывая распределение части параметров, отличное от нормального, сравнительный анализ проводился непараметрическими методами. Показатели содержания цитокинов в биологических жидкостях группы пациентов представлены в формате: Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), где Me — медиана,  $Q_{0,25}$  и  $Q_{0,75}$  — квартили. В качестве дополнительной информации для оценки центральной тенденции, заключающейся в незначительной разнице медианы и среднего значения количественных признаков, данные также представлены в формате:  $M \pm m$ , где M — среднее значение, m — стандартная ошибка среднего значения. Для сравнения показателей двух независимых выборок применялась Z-аппроксимация U-критерия Манна—Уитни. Корреляционный анализ проводился с использованием непараметрического рангового r-коэффициента Спирмена, а критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным  $p < 0,05$ .

## Результаты

Содержание цитокинов определялось в 53 тест-пробах СК и 32 образцах СТ.

В пределах нижнего и верхнего уровней чувствительности тест-системы в значительном количестве тест-проб СК выявлялись 25 цитокинов: IL-2, IL-7, IL-8, IL-15, IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , GRO- $\alpha$ , IP-10, SDF-1 $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, Eotaxin, NGF- $\beta$ , BDNF, EGF, FGF-2, HGF, LIF, PDGF-BB, PIGF-1, SCF, VEGF-A, VEGF-D. Уровни остальных медиаторов находились ниже предела минимальной чувствительности тест-системы либо выявлялись в небольшом количестве образцов, что делало невозможным проведение статистического анализа.

В образцах СТ в пределах нижней и верхней границ чувствительности метода определялись те же цитокины, а также IL-6, IL-1ra — всего 27 соединений.

Средние показатели цитокинов в образцах биологических жидкостей представлены в таблице 1.

В пробах СТ средние уровни 11 цитокинов — IL-2, SDF-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, Eotaxin, NGF- $\beta$ , BDNF, EGF, FGF-2, PDGF-BB, PIGF-1 — оказались достоверно ниже, чем в СК.

В то же время показатели 7 цитокинов — IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, HGF, LIF и VEGF-A — в пробах СТ статистически значимо превышали таковые в СК, что свидетельствует об их локальной интраокулярной продукции.

Корреляционный анализ выявил достоверную положительную связь между уровнями рогового

фактора VEGF-A и IL-6, IFN $\alpha$ , BDNF, HGF, LIF, PDGF-BB, VEGF-D, а также отрицательную корреляционную связь с IP-10 в пробах СТ (табл. 2).

Сравнительный анализ системных уровней цитокинов (в СК) в подгруппах пациентов, сформированных в зависимости от особенностей клинической картины, осложненной ПДР, не выявил каких-либо достоверных отличий.

Однако были обнаружены определенные особенности интраокулярного содержания цитокинов при различных проявлениях диабетических изменений глаз (табл. 3).

Достоверных связей между содержанием цитокинов в СТ и формированием фиброзных пролиферативных мембран обнаружено не было.

С целью углубленного субанализа была выделена подгруппа глаз с крайне тяжелыми проявлениями осложненной ПДР: сочетанием гемофтальма и массивной фиброзной пролиферации, приводящей к тракционной отслойке сетчатки.

В данной подгруппе в СТ отмечены достоверно более высокие уровни IL-6 ( $92,89 \pm 14,48$ ; Ме  $82,87$  ( $47,64-120,07$ )) в сравнении с глазами с изолированным гемофтальмом либо тракционной отслойкой сетчатки ( $80,70 \pm 35,19$ ; Ме  $40,27$  ( $25,77-77,21$ ));  $p = 0,02$ ;  $U = 2,22$ ), а также уровни EGF ( $6,38 \pm 0,74$ ; Ме  $5,70$  ( $4,19-7,18$ )) и  $9,81 \pm 1,17$ ; Ме  $7,74$  ( $5,76-13,45$ ) соответственно;  $p = 0,01$ ;  $U = 2,32$ ).

## Обсуждение

Из протестированных 45 цитокинов в пределах нижнего и верхнего уровней чувствительности тест-системы в значительном количестве тест-проб СК выявлялись 25 молекул: IL-2, IL-7, IL-8, IL-15, IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , GRO- $\alpha$ , IP-10, SDF-1 $\alpha$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, Eotaxin, NGF- $\beta$ , BDNF, EGF, FGF-2, HGF, LIF, PDGF-BB, PIGF-1, SCF, VEGF-A, VEGF-D. В образцах СТ в пределах нижней и верхней гра-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В СТ И СК ПАЦИЕНТОВ С ОСЛОЖНЕННОЙ ПДР

TABLE 1. CONTENT OF CYTOKINES (pg/ml) IN VH AND BS OF PATIENTS WITH COMPLICATED PDR

Цитокины Cytokines	Уровни в СТ Levels in VH	Уровни в СК Levels in BS	Достоверность отличий Significance of differences
IL-2	$6,06 \pm 0,31$ $5,64$ ( $5,27-7,09$ ) $n = 17$	$9,09 \pm 0,81$ $7,95$ ( $6,45-10,22$ ) $n = 21$	$p = 0,002$ $U = -3,04$
IL-6	$70,32 \pm 9,23$ $69,41$ ( $28,81-98,20$ ) $n = 31$	неприменимо* not applicable*	
TNF $\alpha$	$8,81 \pm 1,22$ $7,83$ ( $6,51-10,38$ ) $n = 7$	$8,95 \pm 0,82$ $8,53$ ( $6,44-12,04$ ) $n = 10$	$p = 0,95$ $U = 0,06$
IFN $\alpha$	$2,84 \pm 0,73$ $2,85$ ( $1,36-4,32$ ) $n = 8$	$1,36 \pm 0,14$ $1,53$ ( $0,99-1,53$ ) $n = 8$	$p = 0,22$ $U = 1,21$
IL-15	$8,55 \pm 1,92$ $5,99$ ( $3,65-13,37$ ) $n = 7$	$19,73 \pm 7,55$ $8,52$ ( $8,04-30,68$ ) $n = 8$	$p = 0,32$ $U = -0,98$
IL-1ra	$225,82 \pm 56,42$ $187,98$ ( $111,22-321,46$ ) $n = 8$	неприменимо* not applicable*	
IL-7	$49,03 \pm 11,98$ $10,89$ ( $3,44-69,82$ ) $n = 32$	$35,55 \pm 5,11$ $35,30$ ( $1,97-58,35$ ) $n = 44$	$p = 0,64$ $U = 0,45$
Eotaxin	$19,48 \pm 1,97$ $17,42$ ( $10,74-26,23$ ) $n = 32$	$226,51 \pm 24,47$ $209,97$ ( $65,83-328,37$ ) $n = 53$	$p < 0,0001$ $U = -6,54$
GRO- $\alpha$	$37,02 \pm 10,65$ $23,98$ ( $15,85-43,24$ ) $n = 17$	$18,36 \pm 2,42$ $15,67$ ( $9,79-23,94$ ) $n = 26$	$p = 0,10$ $U = 1,63$
IL-8	$141,02 \pm 36,38$ $75,43$ ( $28,66-151,54$ ) $n = 27$	$15,72 \pm 3,77$ $20,43$ ( $4,74-20,56$ ) $n = 8$	$p = 0,004$ $U = 2,87$

Цитокины Cytokines	Уровни в СТ Levels in VH	Уровни в СК Levels in BS	Достоверность отличий Significance of differences
IP-10	208,26±26,21 214,12 (78,27-279,38) n = 32	39,92±4,62 29,09 (18,83-43,96) n = 52	p < 0,0001 U = 6,01
MCP-1	2102,58±290,26 1850,25 (805,05-3393,03) n = 30	254,84±27,36 201,58 (79,06-405,34) n = 50	p < 0,0001 U = 6,19
MIP-1 $\alpha$	14,99±1,79 15,34 (5,90-23,37) n = 27	25,95±4,21 17,77 (14,31-22,82) n = 45	p = 0,15 U = -1,41
MIP-1 $\beta$	58,59±9,16 72,72 (14,75-89,24) n = 22	189,98±14,98 198,79 (90,12-287,69) n = 43	p < 0,0001 U = -4,84
SDF-1 $\alpha$	160,06±14,19 166,58 (102,06-218,05) n = 32	290,50±30,34 215,68 (160,30-302,72) n = 50	p = 0,002 U = -2,98
RANTES	27,63±1,91 28,33 (23,23-33,36) n = 14	194,64±20,73 184,47 (53,16-299,94) n = 50	p < 0,0001 U = -5,22
NGF- $\beta$	13,01±0,88 12,97 (10,84-14,93) n = 22	32,62±2,47 29,76 (24,84-34,32) n = 42	p < 0,0001 U = -5,83
BDNF	4,11±0,31 4,15 (2,69-5,01) n = 24	1284,25±160,76 843,42 (272,23-2154,70) n = 51	p < 0,0001 U = -6,94
EGF	8,09±0,75 6,65 (5,29-11,52) n = 30	72,07±9,59 53,21 (20,25-131,47) n = 42	p < 0,0001 U = -6,16
FGF-2	12,36±1,87 12,64 (7,02-18,02) n = 12	33,52±7,81 23,68 (10,01-52,19) n = 12	p = 0,02 U = -2,28
HGF	4662,72±581,37 4369,01 (2032,51-6326,35) n = 29	144,63±12,27 142,12 (69,86-194,55) n = 51	p < 0,0001 U = 7,39
LIF	64,17±7,83 51,95 (34,81-88,06) n = 32	11,49±1,11 10,80 (6,75-12,91) n = 35	p < 0,0001 U = 6,66
PDGF-BB	197,20±63,32 22,64 (13,23-357,75) n = 24	454,14±54,78 309,44 (189,86-517,51) n = 51	p < 0,0001 U = -4,02
PIGF-1	13,06±1,53 11,56 (7,62-7,52) n = 24	93,74±15,76 36,63 (26,44-139,61) n = 46	p < 0,0001 U = -5,63
SCF	15,22±1,34 14,29 (8,55-20,46) n = 32	17,66±3,54 11,83 (6,16-20,39) n = 34	p = 0,35 U = 0,92
VEGF-A	1575,23±198,75 1262,50 (771,62-2182,17) n = 30	377,78±49,73 260,44 (110,05-550,27) n = 46	p < 0,0001 U = 5,92
VEGF-D	8,70±1,03 7,34 (3,64-12,95) n = 30	8,64±1,12 9,17 (6,13-11,31) n = 8	p = 0,80 U = -0,25

Примечание. \* – ниже предела минимальной чувствительности тест-системы либо в небольшом количестве образцов.

Note. \*, below the minimum sensitivity limit of the test system or in a small number of samples.

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ ЦИТОКИНАМИ В СТ

TABLE 2. CORRELATION BETWEEN CYTOKINES IN VH

Цитокины Cytokines	IL-6	IFN $\alpha$	BDNF	HGF	LIF	PDGF-BB	VEGF-D	IP-10
VEGF-A	r = 0,48 p < 0,05	r = 0,82 p < 0,05	r = 0,67 p < 0,05	r = 0,45 p < 0,05	r = 0,41 p < 0,05	r = 0,57 p < 0,05	r = 0,47 p < 0,05	r = -0,36 p < 0,05

ТАБЛИЦА 3. СРЕДНИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВ В СТ, ДОСТОВЕРНО ОТЛИЧАЮЩИЕСЯ В ПОДГРУППАХ С РАЗЛИЧНЫМИ ОСОБЕННОСТЯМИ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ, ОСЛОЖНЕННОЙ ПДР

TABLE 3. AVERAGE CYTOKINES IN VH SIGNIFICANTLY DIFFERING IN SUBGROUPS WITH DIFFERENT FEATURES OF THE CLINICAL PICTURE COMPLICATED PDR

Цитокины Cytokines	Особенности клинической картины Features of the clinical picture		Достоверность отличий Significance of differences
	Гемофтальм - Hemophthalmus -	Гемофтальм + Hemophthalmus +	
IL-8	37,67 $\pm$ 13,63 21,42 (5,79-79,39) (n = 7)	298,060 $\pm$ 126,989 111,11 (43,81-300,71) (n = 20)	p = 0,01 U = -2,46
IP-10	140,37 $\pm$ 42,63 114,79 (46,83-181,13) (n = 10)	279,37 $\pm$ 48,92 244,06 (143,64-303,85) (n = 22)	p = 0,04 U = -2,05
SDF-1 $\alpha$	115,65 $\pm$ 24,57 102,06 (37,34-193,84) (n = 10)	180,25 $\pm$ 15,91 174,78 (148,13-200,90) (n = 22)	p = 0,05 U = -1,97
RANTES	19,77 $\pm$ 2,66 20,53 (15,52-24,02) (n = 4)	30,77 $\pm$ 1,62 29,51 (27,80-34,63) (n = 10)	p = 0,01 U = -2,47
NGF- $\beta$	8,76 $\pm$ 2,67 9,7 (5,74-10,84) (n = 3)	25,69 $\pm$ 12,01 13,56 (11,93-16,06) (n = 19)	p = 0,04 U = -2,06
BDNF	3,03 $\pm$ 0,31 2,62 (2,55-3,86) (n = 6)	5,94 $\pm$ 1,51 4,58 (3,30-5,60) (n = 19)	p = 0,03 U = -2,23
	Рубеоз радужки - Iris rubeosis -	Рубеоз радужки + Iris rubeosis +	
LIF	77,77 $\pm$ 11,43 62,64 (39,18-97,98) (n = 27)	33,18 $\pm$ 5,58 40,02 (27,29-40,52) (n = 5)	p = 0,046 U = 1,97
	Активность ПДР минимальная PDR activity is minimal	Активность ПДР высокая PDR activity is high	
MCP-1	1972,92 $\pm$ 698,37 864,40 (429,01-2740,42) (n = 14)	2696,76 $\pm$ 370,38 2253,18 (1740,70-3698,27) (n = 16)	p = 0,04 U = -2,01

ниц чувствительности метода определялись те же цитокины, а также IL-6, IL-1ra — всего 27 соединений.

Более высокие показатели IL-8, IP-10, MCP-1, HGF, LIF и VEGF-A в пробах СТ в сравнении с СК свидетельствуют об их локальной интраокулярной продукции. Наиболее существенное различие отмечалось для IP-10, MCP-1

и VEGF-A. IL-6 выявлялся в достаточно высоких концентрациях в подавляющем большинстве проб СТ, тогда как в СК уровень этого цитокина был ниже предела минимальной чувствительности метода.

Наши результаты отчасти согласуются с данными ряда исследователей, которые также обнаружили высокие уровни IL-6, IL-8, MCP-1

и VEGF-A в СТ пациентов с ДР по сравнению с СК [5, 12, 38].

Высокая интраокулярная продукция перечисленных факторов, вероятно, отражает их активное участие в основных звеньях патогенеза ДР — неоангиогенезе, воспалении и, возможно, нейродегенерации.

VEGF-A (фактор роста эндотелия сосудов) является частью системы, отвечающей за компенсаторные возможности подачи кислорода к тканям в состоянии гипоксии, участвуя, таким образом, в патологическом ангиогенезе. Высокое содержание этого фактора роста в СТ в сравнении с СК свидетельствует в пользу его активной интраокулярной продукции перицитами, эндотелием сосудов, мюллеровскими и ганглиозными клетками [14] и участия в ангиопрлиферативном звене патогенеза ПДР [9, 24, 30, 39].

Повышенный синтез HGF (фактор роста гепатоцитов) в СТ также может отражать его роль в процессе внутриглазной пролиферации. Известно, что HGF является сильным митогеном для гепатоцитов, стимулирует пролиферацию некоторых типов эпителиоцитов, а также клеток сосудистого эндотелия и меланоцитов. Он представляет собой специфичный для эндотелия фактор роста, который участвует в ангиогенезе [2]. В работах [26] также был обнаружен повышенный уровень HGF в СТ у пациентов с ДР в большей степени, нежели в СК, и сделан вывод о внутриглазном синтезе данного цитокина и его непосредственном влиянии на патогенез развития ПДР. Исследования Yu Y., Zhang J. и соавт. также показали повышенный уровень HGF в СТ у пациентов с ПДР [39].

Высокие интраокулярные уровни провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8, IP-10 и MCP-1, вероятно, отражают их участие в воспалительном звене патогенеза ПДР.

IL-6 — цитокин с выраженной провоспалительной активностью, синтезируется активированными макрофагами, Т- и В-лимфоцитами. Стимулирует пролиферацию тимоцитов, В-лимфоцитов, синтез белков острой фазы гепатоцитами, активирует предшественников цитотоксических лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов [1]. Предполагается, что IL-6 может увеличить проницаемость эндотелиальных клеток, модифицируя актиновые филаменты и изменяя форму эндотелиальных клеток [27].

IL-8 является одним из основных индукционных/провоспалительных хемокинов, относится к СХС-классу хемокинов, обеспечивает аттракцию нейтрофилов и лимфоцитов к очагу воспаления. Синтезируется клетками сосудистого эндотелия, активированным эпителием и фибробластами в очаге воспаления, а также

миелоидными клетками — моноцитами/макрофагами [19].

В многочисленных работах представлены доказательства повышения уровня IL-6 и IL-8 в СТ пациентов с ПДР, а также их связь с активностью процесса [4, 32].

Кроме того, в исследовании Capozzi M.E. и соавт. была показана связь повышенных уровней IL-8 в СТ у пациентов с более высокой степенью облитерации ретинальных сосудов [8].

Однако также имеются противоречивые данные. Например, в наблюдениях [35] уровень IL-6 в СТ был сопоставим в группе пациентов с ДР и контрольной группе без СД.

В расширенном исследовании [21] сделан вывод, что более высокие уровни IL-6 и IL-8 в СТ, чем в СК, свидетельствуют о преимущественно локальном воспалении при ПДР.

IP-10 (интерферон- $\gamma$ -индуцированный белок 10), так же как и IL-8, является хемокином СХС-класса. Секретируется моноцитами, эндотелиальными клетками и фибробластами в ответ на продукцию IFN $\gamma$ . Обладает плеiotропными функциями, включая стимуляцию моноцитов, миграцию NK- и Т-клеток, регуляцию Т-клеток, созревание клеток-предшественников костного мозга, модуляцию экспрессии молекул адгезии [23]. В нескольких исследованиях сообщалось, что IP-10 является мощным ингибитором ангиогенеза и может оказывать ингибирующее действие на фиброз [20, 34].

MCP-1 (моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1) относится к классу СС-хемокинов ( $\beta$ -хемокинов), привлекает в зону повреждения моноциты и макрофаги. Продуцируется большим количеством клеток, в частности активированными эндотелиоцитами, фибробластами, эпителиоцитами, гладкомышечными и мезангиальными клетками, астроцитами, моноцитами и микроглиальными клетками [6]. Является мощным индуктором ангиогенеза и фиброзной пролиферации [18].

Наши данные о достоверном повышении MCP-1 в СТ согласуются с исследованиями Schoenberger S.D. и соавт., показавшими высокие уровни IP-10 и MCP-1 в СТ пациентов с ПДР [30].

Однако в другом исследовании уровень MCP-1 в СТ больных с ПДР был понижен по сравнению с контролем без СД [39].

Часть работ показали высокий уровень IP-10 и MCP-1 в СК пациентов с ПДР [16, 17, 24, 29].

Гиперпродукция перечисленных провоспалительных факторов, обнаруженная в ходе нашего исследования, отражает активизацию реакций воспаления, лейкоцитарно-эндотелиальных взаимодействий. Эти механизмы способствуют

разрушению плотных контактов между эндотелиальными клетками, потере компетентности гематоретинального барьера [15].

Активная интраокулярная продукция LIF (лейкемия-ингибирующий фактор) может быть следствием компенсаторных реакций, в том числе тормозящих развитие нейродегенерации и неоангиогенеза. Этот гликопротеин, принадлежащий к семейству IL-6, является нейропротектором с противовоспалительными свойствами. Преимущественно экспрессируется в эндотелиальных клетках, а рецептор LIF экспрессируется в окружающих клетках, в том числе астроцитах сетчатки. Обладает нейропротективным действием на сетчатку. В экспериментальном исследовании интравитреально вводили рекомбинантный человеческий LIF группе мышей с индуцированным диабетом. По результатам гистологического анализа после лечения LIF количество ганглиозных клеток сетчатки было значительно увеличено, а внутренний ядерный слой стал толще по сравнению с группой контроля – мышей с ДР, не получавших рекомбинантный человеческий LIF [37].

Также было обнаружено, что LIF обладает антиангиогенной активностью, ингибирует экспрессию и пролиферацию VEGF в астроцитах, побуждая их к дифференцировке и экспрессии GFAP, что противодействует их ответу на гипоксию [22].

Звенья патогенеза – неоангиогенез и воспаление – тесно связаны между собой, что подтверждается достоверной положительной связью между уровнями ростового фактора VEGF-A и IL-6, IFN $\alpha$ , BDNF, HGF, LIF, PDGF-BB, VEGF-D, а также отрицательной корреляционной связью с IP-10 в пробах СТ.

Наличие гемофтальма ассоциировалось с достоверно более высокими уровнями IL-8, IP-10, SDF-1 $\alpha$ , RANTES, NGF- $\beta$ , BDNF. Из перечисленных соединений уровни SDF-1 $\alpha$ , RANTES, NGF- $\beta$ , BDNF в среднем по группе были выше в СК, чем в СТ. Поэтому их повышение в СТ при гемофтальме отчасти можно связать с попаданием в полость глаза в составе крови.

В то же время повышенные уровни IL-8 и IP-10 при гемофтальме могут быть объяснены только участием этих провоспалительных хемокинов в патогенезе заболевания, в том числе развитии геморрагической активности, так как их содержание в СК в среднем по группе было ниже,

чем в СТ. Оба цитокина играют важную роль в воспалительном звене патогенеза заболевания. Активно обсуждается роль IL-8 в стимуляции ангиогенеза [19].

В глазах с рубцозом радужки уровень защитного противовоспалительного цитокина LIF оказался достоверно ниже. Вероятно, такая тяжелая клиническая картина заболевания, являющаяся следствием выраженной ишемии сетчатки, ассоциируется с дефицитом компенсаторных механизмов.

В случаях активной ПДР уровни хемокина MCP-1 в образцах СТ оказались достоверно выше, чем в глазах с минимальной активностью ПДР. Наши находки согласуются с результатами исследований Abu El-Asrar A.M. Авторы описывают локализацию MCP-1 в миофибробластах и эндотелиальных клетках сосудов пролиферативных мембран при ПДР и достоверное повышение уровней MCP-1 в СТ в подгруппе активной ПДР ( $p = 0,0224$ ) [5]. Кроме того, группой исследователей Hernandez C., Segura R.M. и соавт. также был сделан вывод о связи повышения MCP-1 в СТ с активностью ПДР, что доказывает участие этого цитокина в патогенетических механизмах [17].

В подгруппе глаз с крайне тяжелой клинической картиной достоверное повышение IL-6 может быть связано с более активными реакциями воспаления. Повышение EGF (эпидермального фактора роста), возможно, отражает его участие в процессах пролиферации клеток [41].

Таким образом, наше исследование подтвердило участие в патогенезе ДР большого числа локально синтезируемых сигнальных молекул, опосредующих процесс воспаления, способствующих неоангиогенезу, повышению проницаемости сосудов, а также обладающих защитными функциями. Выявлены корреляционные взаимосвязи между факторами неоангиогенеза и воспаления.

Дальнейшие исследования активных молекул в тест-пробах СТ представляются действенным механизмом изучения патофизиологии ДР и разработки патогенетически ориентированных подходов к лечению, новых таргентных лекарственных препаратов. В частности, обсуждаются возможности анти-IL-8-терапии ДР [10, 13, 40], использование LIF для торможения развития ДР [37], а также иные направления.

## Список литературы / References

1. Воробьев А.А., Быков А.С., Караулов А.В. Иммунология и аллергология. М.: Практическая медицина, 2006. 288 с. [Vorobyev A.A., Bykov A.S., Karaulov A.V. Immunology and allergology]. Moscow: Practical Medicine, 2006. 288 p.

2. Лепехова С.А., Апарцин К.А., Искра А.И. Роль фактора роста гепатоцитов в регенерации печени // Фундаментальные исследования, 2014. Т. 7, № 1. С. 187-192. [Lepekhova S.A., Apartsin K.A., Iskra A.I. Role of hepatocyte growth factor in liver regeneration. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2014, Vol. 7, no. 1, pp. 187-192. (In Russ.)]
3. Нероев В.В., Зайцева О.В., Михайлова Л.А. Заболеваемость диабетической ретинопатией в Российской Федерации // Российский офтальмологический журнал, 2018. Т. 11, № 2. С. 5-9. [Neroev V.V., Zaytseva O.V., Mikhailova L.A. Incidence of diabetic retinopathy in the Russian Federation according to Federal statistics. *Rossiyskiy oftalmologicheskiy zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2018, Vol. 11, no. 2, pp. 5-9. (In Russ.)]
4. Abu El-Asrar A.M. Role of inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.*, 2012, Vol. 19, no. 1, pp. 70-74.
5. Abu El-Asrar A.M., Struyf S., Kangave D., Geboes K., van Damme J. Chemokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative Vitreoretinopathy. *Eur. Cytokine Netw.*, 2006, Vol. 17, no. 3, pp. 155-165.
6. Barna B.P., Pettay J., Barnett G.H., Zhou P., Iwasaki K., Estes M.L. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *J. Neuroimmunol.*, 1994, Vol. 50, no. 1, pp. 101-107.
7. Bourne R.R., Stevens G.A., White R.A., Smith J.L., Flaxman S.R., Price H., Jonas J.B., Keeffe J., Leasher J., Naidoo K., Pesudovs K., Resnikoff S., Taylor H.R.; Vision Loss Expert Group. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *Lancet Glob. Health*, 2013, Vol. 1, no. 6, pp. 339-349.
8. Capozzi M.E., McCollum G.W., Cousins D.B., Penn J.S. Linoleic acid is a diabetes-relevant stimulator of retinal inflammation in human retinal muller cells and microvascular endothelial cells. *J. Diabetes Metab.*, 2016, Vol. 7, Iss. 12, 718. doi: 10.4172/2155-6156.1000718.
9. Crawford T.N., Alfaro I., Kerrison J.B., Jablon E.P. Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr. Diabetes Rev.*, 2009, Vol. 5, no. 1, pp. 8-13.
10. Dai C., Jiang S., Chu C., Xin M., Song X., Zhao B. Baicalin protects human retinal pigment epithelial cell lines against high glucose-induced cell injury by up-regulation of microRNA-145. *Exp. Mol. Pathol.*, 2019, Vol. 106, pp. 123-130.
11. Dai Y., Wu Z., Wang F., Zhang Z., Yu M. Identification of chemokines and growth factors in proliferative diabetic retinopathy vitreous. *BioMed Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 486386. doi: 10.1155/2014/486386.
12. Elner S.G., Elner V.M., Jaffe G.J., Stuart A., Kunkel S.L., Strieter R.M. Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Curr. Eye Res.*, 1995, Vol. 14, no. 11, pp. 1045-1053.
13. Farris R.A., Price E.T. Reverse translational study of fenofibrate's observed effects in diabetes-associated retinopathy. *Clin. Transl. Sci.*, 2017, Vol. 10, no. 2, pp. 110-116.
14. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J.N. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, no. 6, pp. 669-676.
15. Funatsu H., Noma H., Mimura T., Eguchi S. Vitreous inflammatory factor and macular oedema. *Br. J. Ophthalmol.*, 2012, Vol. 96, no. 2, pp. 302-304.
16. Hang H., Yuan S., Yang Q., Yuan D., Liu Q. Multiplex bead array assay of plasma cytokines in type 2 diabetes mellitus with diabetic retinopathy. *Mol. Vis.*, 2014, Vol. 20, pp. 1137-1145.
17. Hernandez C., Segura R.M., Fonollosa A., Carrasco E., Francisco G., Simo R. Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet. Med.*, 2005, Vol. 22, no. 6, pp. 719-722.
18. Hong K.H., Ryu J., Han K.H. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 4, pp. 1405-1407.
19. Hull J., Ackerman H., Isles K., Usen S., Pinder M., Thomson A., Kwiatkowski D. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001, Vol. 69, no. 2, pp. 413-419.
20. Keane M.P., Belperio J.A., Arenberg D.A., Burdick M.D., Xu Z.J., Xue Y.Y. IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 163, no. 10, pp. 5686-5692.
21. Koskela U.E., Kuusisto S.M., Nissinen A.E., Savolainen M.J., Liinamaa M.J. High vitreous concentration of IL-6 and IL-8, but not of adhesion molecules in relation to plasma concentrations in proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res.*, 2013, Vol. 49, no. 2, pp. 108-114.
22. Kubota Y., Hirashima M., Kishi K., Stewart C.L., Suda T. Leukemia inhibitory factor regulates microvessel density by modulating oxygen-dependent VEGF expression in mice. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 7, pp. 2393-2403.
23. Lee E.Y., Lee Z.H., Song Y.W. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.*, 2009, Vol. 8, no. 5, pp. 379-383.
24. Li S., Fu X.A., Zhou X.F., Chen Y.Y., Chen W.Q. Angiogenesis-related cytokines in serum of proliferative diabetic retinopathy patients before and after vitrectomy. *Int. J. Ophthalmol.*, 2012, Vol. 5, no. 6, pp. 726-730.
25. Li Y., Zhou Y. Interleukin-17: The role for pathological angiogenesis in ocular neovascular diseases. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2019, Vol. 247, no. 2, pp. 87-98.
26. Malik T.G., Ahmed S.S., Gul R., Ayesha E. Comparative analysis of serum proangiogenic biomarkers between those with and without diabetic retinopathy. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.*, 2018, Vol. 28, no. 9, pp. 686-689.

27. Murugeswari P., Shukla D., Rajendran A., Kim R., Namperumalsamy P., Muthukkaruppan V. Proinflammatory cytokines and angiogenic and anti-angiogenic factors in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy and eales' disease. *Retina*, 2008, Vol. 28, no. 6, pp. 817-824.
28. Nalini M., Raghavulu B.V., Annapurna A., Avinash P., Chandi V., Swathi N., Wasim. Correlation of various serum biomarkers with the severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Metab. Syndr.*, 2017, Vol. 11, Suppl. 1, pp. S451-S454.
29. Patel J.I., Saleh G.M., Hykin P.G., Gregor Z.J., Cree I.A. Concentration of haemodynamic and inflammatory related cytokines in diabetic retinopathy. *Eye*, 2008, Vol. 22, no. 2, pp. 223-228.
30. Schoenberger S.D., Kim S.J., Sheng J., Rezaei K.A., Lalezary M., Cherney E. Increased prostaglandin E2 (PGE2) levels in proliferative diabetic retinopathy, and correlation with VEGF and inflammatory cytokines. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2012, Vol. 53, no. 9, pp. 5906-5911.
31. Simo R., Hernandez C. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2014, Vol. 25, no. 1, pp. 23-33.
32. Simo-Servat O., Hernandez C., Simo R. Usefulness of the vitreous fluid analysis in the translational research of diabetic retinopathy. *Mediators Inflamm.*, 2012, Vol. 2012, 872978. doi: 10.1155/2012/872978.
33. Suzuki Y., Nakazawa M., Suzuki K., Yamazaki H., Miyagawa Y. Expression profiles of cytokines and chemokines in vitreous fluid in diabetic retinopathy and central retinal vein occlusion. *Jpn J. Ophthalmol.*, 2011, Vol. 55, no. 3, pp. 256-263.
34. Tager A.M., Kradin R.L., LaCamera P., Bercury S.D., Campanella G.S., Leary C.P., Polosukhin V., Zhao L.H., Sakamoto H., Blackwell T.S., Luster A.D. Inhibition of pulmonary fibrosis by the chemokine IP-10/CXCL10. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2004, Vol. 31, no. 4, pp. 395-404.
35. Tsai T., Kuehn S., Tsiampalis N., Vu M.K., Kakkassery V., Stute G., Burkhard Dick H., Joachim S.C. Anti-inflammatory cytokine and angiogenic factors levels in vitreous samples of diabetic retinopathy patients. *PLoS ONE*, 2018, Vol. 13, no. 3, e0194603. doi: 10.1371/journal.pone.0194603.
36. Wang W., Lo A.C. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 6, E1816. doi: 10.3390/ijms19061816.
37. Yang X.F., Huang Y.X., Lan M., Zhang T.R., Zhou J. Protective effects of leukemia inhibitory factor on retinal vasculature and cells in streptozotocin-induced diabetic mice. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2018, Vol. 131, no. 1, pp. 75-81.
38. Yoshimura T., Sonoda K.H., Sugahara M., Mochizuki Y., Enaida H., Oshima Y., Ueno A., Hata Y., Yoshida H., Ishibashi T. Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, no. 12, e8158. doi: 10.1371/journal.pone.0008158.
39. Yu Y., Zhang J., Zhu R., Zhao R., Chen J., Jin J., Tian Y., Su S.B. The profile of angiogenic factors in vitreous humor of the patients with proliferative diabetic retinopathy. *Curr. Mol. Med.*, 2017, Vol. 17, no. 4, pp. 280-286.
40. Yu Z., Gong C., Lu B., Yang L., Sheng Y., Ji L., Wang Z. Dendrobium chrysotoxum Lindl. alleviates diabetic retinopathy by preventing retinal inflammation and tight junction protein decrease. *J. Diabetes Res.*, 2015, Vol. 2015, 518317. doi: 10.1155/2015/518317.
41. Zeng F., Harris R.C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2014, Vol. 28, pp. 2-11.

**Авторы:**

**Нероев В.В.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Зайцева О.В.** — к.м.н., заместитель директора ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Балацкая Н.В.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Лазутова А.А.** — клинический ординатор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Neroev V.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Zaytseva O.V.**, PhD (Medicine), Deputy Director, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Balatskaya N.V.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Lazutova A.A.**, Clinical Resident, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Поступила 02.07.2019

Отправлена на доработку 13.09.2019

Принята к печати 19.09.2019

Received 02.07.2019

Revision received 13.09.2019

Accepted 19.09.2019

## АУТОАНТИТЕЛА КАК МАРКЕРЫ СОСТОЯНИЯ СЕРДЦА У ПАЦИЕНТОВ С ВИБРАЦИОННОЙ БОЛЕЗНЬЮ, ОТЯГОЩЕННОЙ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Маснавиева Л.Б., Кудяева И.В., Кузнецова Ю.А.

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Иркутская обл.,  
Россия

**Резюме.** Воздействие физических и химических факторов, ожирение, нарушение липидного обмена, сахарный диабет оказывают влияние на состояние эндотелия сосудов, процессы тромбообразования, фибринолиза и повышают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Можно предположить, что развитие и протекание патологических процессов в сердечно-сосудистой системе, обусловленных вибрационной болезнью в условиях отягощения сахарным диабетом, будут претерпевать изменения. Целью исследования являлось изучение уровней специфических аутоантител к антигенам сердечной ткани у пациентов с вибрационной болезнью, отягощенной сахарным диабетом 2 типа. Обследованы пациенты с вибрационной болезнью (группа I), больные сахарным диабетом 2 типа (II группа) и лица, имеющие вибрационную болезнь в сочетании с сахарным диабетом 2 типа (группа III). В обследование включены лица, не имеющие в анамнезе ишемической болезни сердца, инсульта и инфаркта миокарда. Изучены сывороточные уровни специфических аутоантител к антигенам кардиомиоцитов. Выявлено, что содержание аутоантител к  $\beta 1$ -адренергическим рецепторам у пациентов группы I было выше, чем у лиц группы II. Относительное содержание аутоантител к компонентам мембраны и цитоплазмы клеток миокарда у больных I-III групп не различалось. Установлено, что повышенные уровни аутоантител к компонентам мембраны и цитоплазмы клеток миокарда, кардиомиозину и  $\beta 1$ -адренергическим рецепторам наблюдались чаще у пациентов с вибрационной болезнью в сочетании с сахарным диабетом, а также без такового, чем у лиц с сахарным диабетом. Среди пациентов с вибрационной болезнью (I и III группы) не выявлено лиц с пониженным содержанием аутоантител к  $\beta 1$ -адренергическим рецепторам. У лиц с вибрационной болезнью изменения в уровнях специфических аутоантител могут свидетельствовать о развитии функционально-метаболических и структурных изменениях в сердце, нарушениях его электрической активности, которые еще не манифестировались в виде патологического процесса. Для пациентов с сахарным диабетом 2 типа, не имеющих вибрационной болезни, более низкие уровни аутоантител к  $\beta 1$ -адренорецепторам могут быть обусловлены повышением уровней катехоламинов, которое характерно для больных диабетом. Для подтверждения выдвинутых нами предположений необходимо проведение дальнейших исследований, включающих клинические данные и показатели функциональной диагностики.

**Ключевые слова:** аутоантитела, вибрационная болезнь, сахарный диабет, сердечно-сосудистая система, сердце,  $\beta 1$ -адренорецептор

### Адрес для переписки:

Маснавиева Людмила Борисовна  
ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований»  
665827, Россия, Иркутская обл., г. Ангарск,  
12-а микрорайон, 3, а/я 1170.  
Тел.: 8 (914) 003-19-76.  
E-mail: masnavieva\_luda@mail.ru

### Address for correspondence:

Masnavieva Lyudmila B.  
East-Siberian Institute of Medical and Ecological  
Research  
665827, Russian Federation, Irkutsk Region, Angarsk,  
Microrayon 12a, 3, P.O. Box 1170.  
Phone: 7 (914) 003-19-76.  
E-mail: masnavieva\_luda@mail.ru

### Образец цитирования:

Л.Б. Маснавиева, И.В. Кудяева, Ю.А. Кузнецова  
«Аутоантитела как маркеры состояния сердца  
у пациентов с вибрационной болезнью, отягощенной  
сахарным диабетом» // Медицинская иммунология,  
2020. Т. 22, № 2. С. 311-318.  
doi: 10.15789/1563-0625-AAM-1739  
© Маснавиева Л.Б. и соавт., 2020

### For citation:

L.B. Masnavieva, I.V. Kudaeva, Yu.A. Kuznetsova  
“Autoantibody as markers of the heart state in patients with  
vibration disease burdened diabetes mellitus”, *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020,  
Vol. 22, no. 2, pp. 311-318.  
doi: 10.15789/1563-0625-AAM-1739  
DOI: 10.15789/1563-0625-AAM-1739

# AUTOANTIBODY AS MARKERS OF THE HEART STATE IN PATIENTS WITH VIBRATION DISEASE BURDENED DIABETES MELLITUS

Masnavieva L.B., Kudaeva I.V., Kuznetsova Yu.A.

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Irkutsk Region, Russian Federation

**Abstract.** Physical and chemical factors, obesity, lipid metabolism disorder, diabetes affect the state of the vascular endothelium, the processes of thrombus formation, fibrinolysis and increase the risk of developing cardiovascular diseases. It can be assumed that the development and course of pathological processes in the cardiovascular system, caused by vibration disease with the onset of diabetes, will undergo changes. The purpose of the study was to assess the state of heart condition according to the level of specific autoantibodies with the combined effect of vibration disease and type 2 diabetes mellitus. Patients with vibration disease (group I), patients with type 2 diabetes (group II) and persons with vibration disease in combination with type 2 diabetes (group III) were examined. Individuals do not have a history of coronary heart disease, stroke, and myocardial infarction have been included in obsledovanie. Serum levels of specific autoantibodies characterizing the state of the heart have been studied. It was revealed that the content of autoantibodies to 1-adrenoreceptors in patients of group I was higher than in individuals of group II. The relative content of autoantibodies to the components of the membrane and cytoplasm of myocardial cells in patients of groups I-III did not differ. It was found that elevated levels of autoantibodies to components of the membrane and cytoplasm of myocardial cells, cardiomyosin, 1-adrenoreceptors were observed more often in patients with vibration disease combined with diabetes and in persons with vibration disease than in people with diabetes. Persons with a reduced content of autoantibodies to 1-adrenergic receptors were not detected among patients of groups I and III. Changes in the levels of specific autoantibodies in persons with vibration disease may indicate the development of functional metabolic and structural changes in the heart, disorders of its electrical activity that have not yet been manifested in the form of a pathological process. Lower levels of 1-adrenoceptor autoantibodies in patients with type 2 diabetes without vibration disease can be caused by increased levels of catecholamines, which is characteristic of diabetics. Further research, including clinical data and indicators of functional diagnostics is necessary to confirm our assumptions.

**Keywords:** autoantibodies, vibration disease, diabetes, cardiovascular system, heart,  $\beta 1$ -adrenergic receptor

## Введение

Среди причин смертности трудоспособного населения лидируют заболевания сердечно-сосудистой системы, обусловленные в том числе высокой распространенностью этиопатогенетических факторов риска проатерогенных нарушений и метаболического синдрома [36]. В риск развития сердечно-сосудистых заболеваний вносят вклад как ожирение и сахарный диабет, так и воздействие производственных факторов [7, 19]. У пациентов с диабетом отмечаются изменения в диастолической функции миокарда левого желудочка [4]. Работники горнодобывающей, машино- и авиастроительной, транспортной и других отраслей промышленности в процессе выполнения профессиональной деятельности подвергаются влиянию вибрации. Ее длительное воздействие вызывает нейрогуморальные и нейрорефлекторные изменения в организме человека, которые становятся причиной нарушения

тонуса кровеносных сосудов, процессов тромбо- и атерогенеза и увеличивают вероятность возникновения сердечно-сосудистой патологии [12, 14]. Учитывая, что риск возникновения заболеваний сердечно-сосудистой системы увеличивается как при сахарном диабете (СД), так и вибрационной болезни (ВБ), можно предположить, что развитие патологических процессов, обусловленных ВБ, протекающих на фоне СД, будет претерпевать изменения, и, возможно, будет наблюдаться усугубление течения профессиональной и соматической патологий.

Известно, что при развитии любого заболевания содержание аутоантител (ауто-АТ) значительно возрастает еще до его клинических проявлений, в то время как у здоровых лиц их сывороточные уровни незначительны [6, 11, 23]. Выявлены связи между уровнями ауто-АТ к структурам миокарда, к  $\beta 1$ -адренорецепторам и развитием нарушений ритма и проводимости сердца, которые могут указывать на важную роль

антител в развитии идиопатических нарушений сердца [3, 5, 10, 16].

**Цель исследования** — изучение уровней специфических аутоантител к антигенам кардиомиоцитов у пациентов с вибрационной болезнью, отягощенной сахарным диабетом 2 типа.

## Материалы и методы

На проведение исследования было получено разрешение локального этического комитета. После подписания информированного согласия обследованы 62 мужчины с ВБ (группа I), 66 лиц с диагнозом «СД 2 типа» (группа II) и 20 пациентов с сочетанной патологией — ВБ и СД 2 типа (группа III). Диагноз «ВБ» верифицирован с учетом санитарно-гигиенической характеристики условий труда, стажа работы, результатов клинико-функционального обследования пациентов. Диагноз «СД» установлен в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра и диагностическими критериями, принятыми Всемирной организацией здравоохранения. Критериями исключения из исследования являлись: острые и хронические неинфекционные заболевания в стадии обострения, наличие патологии в виде ИБС, хронических заболеваний дыхательной системы, наличие в анамнезе инсульта, инфаркта миокарда, онкологии, почечной, печеночной недостаточности, туберкулеза любой локализации, наличие психических или аутоиммунных заболеваний. Возраст мужчин

в группе I составил  $52,87 \pm 0,77$  лет, в группе II —  $52,37 \pm 1,07$  лет, в III группе —  $57,95 \pm 1,30$  лет.

В сыворотке крови изучали относительное содержание специфических ауто-АТ к компонентам мембраны и цитоплазмы клеток миокарда (CoM-02 и CoS-05 соответственно),  $\beta$ 1-адренорецепторам ( $\beta$ 1-АР) и кардиомиозину L. Уровень ауто-АТ определяли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов реагентов ЭЛИ-анкор-Тест (МИЦ «Иммункукус», Россия), измерение оптической плотности осуществляли на ИФА-ридере (BioTek ELx-800). В соответствии с рекомендациями производителя тест-системы оптимумом содержания ауто-АТ каждой специфичности считали диапазон -20 — +10%.

Для статистической обработки результатов использовался пакет прикладных программ Statistica 6.0. После проверки на нормальность распределения признаков в выборке (метод Шапиро—Уилка) сравнение количественных показателей осуществляли непараметрическими тестами Краскела—Уоллиса и U-критерием Манна—Уитни (с поправкой Бонферрони). Для выявления различий частот встречаемости признака в выборках использовали критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  для тестов Краскела—Уоллиса и  $\chi^2$ ,  $p < 0,017$  — для U-критерия Манна—Уитни. Результаты исследований представлены в виде значения медианы (Me) и интерквартильного

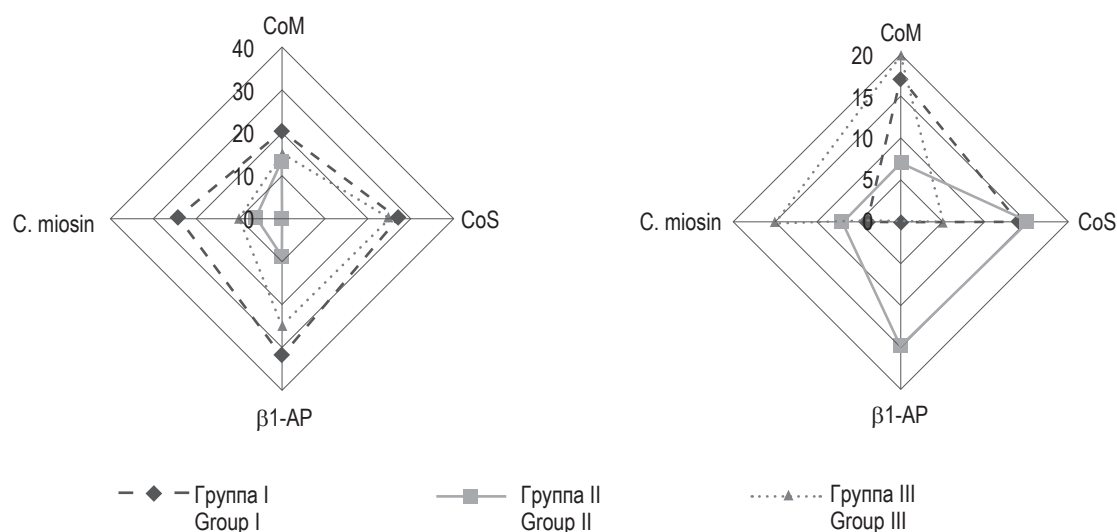
**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АУТОАНТИТЕЛ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ВИБРАЦИОННОЙ БОЛЕЗНЬЮ, ОТЯГОЩЕННОЙ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )**

TABLE 1. CONTENT OF SPECIFIC AUTOANTIBODIES IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH VIBRATION DISEASE BURDENED DIABETES MELLITUS, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )

Показатель Indicator	Группа I Group I	Группа II Group II	Группа III Group III	p
Ауто-АТ CoM, % Auto-AB CoM, %	-4,43 (-16,39-6,21)	-5,48 (-13,43-1,45)	-11,38 (-18,94 – -0,46)	0,699
Ауто-АТ CoS, % Auto-AB CoS, %	1,59 (-8,87-11,61)	0,36 (-4,91-10,93)	0,74 (-4,89-4,98)	0,892
Ауто-АТ к $\beta$ 1-АР, % Auto-AB to $\beta$ 1-AP, %	2,07 (-8,69-13,74)	-5,12* (-10,48-1,69)	-1,36 (-7,35-11,52)	0,026
Ауто-АТ к кардиомиозину, % Auto-AB to cardiomyosin, %	-2,87 (-9,12-7,92)	-5,18 (-11,16-0,39)	-10,19 (-16,92 – -0,08)	0,074

Примечание. p — уровень статистической значимости различий по критерию Краскела—Уоллиса; \* — различия статистически значимы по сравнению с группой I.

Note. p, the level of statistical significance of differences according to the Kruskal–Wallis criterion; \*, the differences are statistically significant compared with group I.



**Рисунок 1. Частота встречаемости отклонений содержания специфических аутоантител ниже и выше референтных уровней (слева и справа соответственно)**

Примечание. C. miosin – кардиомиозин.

Figure 1. Frequency of occurrence of abnormalities in the content of specific autoantibodies below and above the reference levels (left and right, respectively)

Note. C. miosin, cardiomyosin.

размаха (25-й и 75-й процентиля), процентов и доверительного интервала (ДИ).

## Результаты

В результате проведенных исследований было установлено, что содержание ауто-АТ к  $\beta 1$ -адренорецепторам у пациентов с ВБ было выше, чем у лиц с СД ( $p = 0,007$ ) (табл. 1).

Поскольку клинически значимым является отклонение индивидуальных уровней специфических ауто-АТ от референтного диапазона, была проведена оценка частоты встречаемости пониженного и повышенного содержания АТ в каждой из групп (рис. 1). Для лиц с ВБ характерным являлась высокая частота встречаемости отклонений в области положительных значений уровня ауто-АТ к  $\beta 1$ -АР (32,3% ДИ (20,6-43,9)), CoS (27,4% ДИ (16,3 – 38,5)) и кардиомиозину (24,2% ДИ (13,5-34,9)). Профиль отклонений от нормы в области отрицательных значений характеризовался сниженными уровнями ауто-АТ к антигенам CoM и CoS у 17,7% ДИ (8,2-27,3) и 14,5% ДИ (5,75-23,28) обследованных соответственно.

У пациентов с вибрационной болезнью в сочетании с сахарным диабетом профиль частот встречаемости повышенных значений был сходный с таковым у лиц с ВБ по CoS и  $\beta 1$ -АР. Повышенные уровни ауто-АТ к каждому из этих показателей выявлены в 25,0% ДИ (6,0-44,0) случаев. Профиль отклонений от нормативного уровня в области отрицательных значений в группе III, так же как и в группе I, характеризовался от-

сутствием случаев пониженных концентраций ауто-АТ к  $\beta 1$ -АР, а также наличием гипоиμмнореактивности ауто-АТ CoM у 20,0% ДИ (2,5-37,5) обследованных.

## Обсуждение

Оценивая изучаемые показатели, следует отметить, что случаи пониженного содержания АТ к  $\beta 1$ -АР встречались только среди обследованных II группы ( $p = 0,001$  и  $p = 0,066$  при сравнении группы II с группами I и III соответственно). Данный факт можно объяснить характерным для СД повышением содержания катехоламинов, которые регулируют количество адренорецепторов на мембранах клеток по принципу отрицательной обратной связи [9].

Среди лиц, имеющих ВБ, случаи повышенных уровней АТ к  $\beta 1$ -АР встречались чаще, чем среди пациентов группы II ( $p = 0,001$  и  $p = 0,060$  при сравнении группы II с группами I и III соответственно). В качестве возможного объяснения установленного факта можно предположить следующее. Известно, что при вибрации происходит нарушение вегетативной регуляции на разных уровнях (в ретикулярной формации головного мозга, в спинном мозге и в надсегментарных вегетативных структурах), что приводит к развитию симпатикотонии [18]. В свою очередь, согласно данным экспериментальных исследований, длительная симпатикотония способствует уменьшению количества  $\beta 1$ -АР [22], а также изменению их структуры и приобретению ими антигенных

свойств. В свою очередь, ауто-АТ к измененным  $\beta 1$ -АР обладают катехоламиноподобными эффектами и способны оказывать на них стимулирующее действие [20], вызывая повышение частоты сокращения кардиомиоцитов *in vitro* без развития десенситизации. Ее отсутствие может привести к развитию адренергической гиперстимуляции и гипертрофии миокарда [15, 25, 26].

Установлено также, что появление ауто-АТ к  $\beta 1$ -АР сопряжено с увеличением титра ауто-АТ к М2-холинорецепторам, которые обладают негативным хроно- и инотропным действием и способны оказывать ингибирующее влияние на активность аденилатциклазы [21, 24]. Однако у пациентов с ВБ регистрируются низкие значения уровней ауто-АТ к ацетилхолинорецепторам [2], что, возможно, играет саногенетическую роль и в условиях повышения ауто-АТ к  $\beta 1$ -АР предотвращает развитие нарушения ритма. Циркулирующие ауто-АТ к  $\beta 1$ -АР при связывании с  $CD3^+$  лимфоцитами также индуцируют синтез интерферона- $\gamma$  [17], который играет важную роль в патогенезе заболеваний миокарда. Однако данный механизм не может рассматриваться в качестве возможного патогенетического пути формирования нарушений в миокарде у лиц с ВБ, так как показано, что у пациентов с данной патологией не наблюдается повышенных концентраций данного цитокина [1].

Учитывая наличие феномена «молекулярной мимикрии» между  $\beta 1$ -АР и  $\alpha$ -миозином, в условиях роста уровня ауто-АТ к  $\beta 1$ -АР существует вероятность развития перекрестных реакций, которые способствуют  $\beta 1$ -АР-зависимому повреждению кардиомиоцитов. В связи с этим определенный интерес представляет изучение уровня аутоантител к кардиомиозину L. Установлено, что повышенные уровни ауто-АТ к данному компоненту клеток в группе I встречались статистически значимо чаще по сравнению с группой II ( $p = 0,008$ ). Согласно данным литературы, повышение титра ауто-АТ к кардиомиозину ассоциируется с вероятностью развития сердечной патологии, а также с повышением уровня аутоантител к мембране и цитоплазме кардиомиоцитов (CoM, CoS), характеризующих наличие изменений в сердечной мышце [8, 15].

Установлено, что каждый пятый пациент с ВБ имел повышенную иммунореактивность ауто-АТ к слабоанионным компонентам мембран клеток миокарда (CoM). В двух других группах данный показатель был незначительно ниже ( $p = 0,296$  и  $p = 0,556$  соответственно) и составил 14-15%. Повышенные уровни ауто-АТ к сильно анионным компонентам цитоплазмы клеток миокарда (CoS-05), которые чаще выявлялись у пациентов с ВБ и у лиц, имеющих сочетанную патологию

( $p < 0,001$  и  $p < 0,001$  по сравнению с группой II), характерны для разного рода функционально-метаболических нарушений в деятельности сердца, не сопровождающихся дистрофическими изменениями [8, 23]. Частота встречаемости пониженной иммунореактивности данных ауто-АТ в I-III группах не различалась. Сниженные уровни ауто-АТ CoM в группе пациентов с СД встречались чуть реже, чем среди лиц, имеющих ВБ, но межгрупповые различия не являлись статистически значимыми ( $p = 0,077$  и  $p = 0,090$  для групп I и III соответственно).

Данные АТ, с одной стороны, выступают неспецифическими маркерами нарушений миокарда, с другой — могут участвовать в различных физиологических процессах, в том числе в элиминации стареющих или патологически измененных клеток. Снижение значений ауто-АТ к антигенам миоцитов CoM и CoS у пациентов с ВБ, имеющих коморбидную патологию СД и без таковой, скорее всего, свидетельствует об их защитной роли. В то же время следует учитывать, что пониженные уровни ауто-АТ любой специфичности могут быть обусловлены патологически повышенным связыванием ауто-АТ при избыточном синтезе антиидиотипических АТ. Снижение иммунореактивности также может наблюдаться вследствие нефизиологического угнетения продукции ауто-АТ, ведущего к ухудшению клиренса органов и систем от продуктов естественного катаболизма [8], и значительное их снижение может свидетельствовать о риске развития нарушений в будущем. В частности, в литературе имеются сведения о наличии у пациентов с ВБ нарушений функционального состояния сердца в виде уменьшения податливости стенки левого желудочка, ее напряжении, приводящей к нарушению локальной сократимости, повышения внутримиекардиальных стрессов, увеличения давления в легочной артерии и постнагрузки для правого желудочка [13].

## Заключение

Анализируя изменения в содержании специфических аутоантител к антигенным компонентам кардиомиоцитов у пациентов с сахарным диабетом и вибрационной болезнью, можно отметить следующее. Около 25% пациентов из группы I и 10-25% из группы III имели повышенные уровни ауто-АТ CoS и к кардиомиозину. Более четверти пациентов этих групп имели гипериммунореактивность антител к  $\beta 1$ -АР. У пациентов с ВБ в сочетании с СД или без такового установлены повышенные уровни ауто-АТ к  $\beta 1$ -адренорецепторам, кардиомиозину L, ауто-АТ CoS, что указывает на начальные структурные

изменения в кардиомиоцитах, не сопровождающиеся воспалительным процессом, а также на потенциальное развитие нарушений его электрической активности, которые еще не манифестировались в виде патологического процесса. Для пациентов с СД 2 типа, не имеющих ВБ, (группа II) были характерны более низкие уровни ауто-АТ CoM, АТ к  $\beta 1$ -АР, что может быть обусловлено изменением уровней катехоламинов, характерным для данной патологии. Для под-

тверждения выдвинутых нами предположений необходимо проведение дальнейших исследований в ассоциации с клиническими данными и показателями функциональной диагностики.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность врачу-неврологу высшей категории, кандидату медицинских наук Сливницыной Наталье Валерьевне за помощь в формировании групп пациентов.

## Список литературы / References

1. Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И. Оценка медиаторов воспаления при воздействии вибрации на рабочих в зависимости от выраженности патологического процесса // Гигиена и санитария, 2017. Т. 96, № 5. С. 460-462. [Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I. Assessment of inflammation mediators under exposure to the vibration in employees in dependence on pronouncement of the pathological process. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2017, Vol. 96, no. 5, pp. 460-462. (In Russ.)]
2. Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И. Влияние промышленной вибрации на уровень антител к регуляторным белкам нервной ткани // Физиология человека, 2016. Т. 42, № 5. С. 97-101. [Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I. Influence of industrial vibration on the level of antibodies against regulatory proteins of the nervous tissue. *Fiziologiya cheloveka = Human Physiology*, 2016, Vol. 42, no. 5, pp. 97-101. (In Russ.)]
3. Гупало Е.М., Миронова Н.А., Малкина Т.А., Полевая Т.Ю., Голицын С.П. Роль воспаления в развитии нарушений ритма и проводимости // Сибирский медицинский журнал (г. Томск), 2015. Т. 30, № 1. С. 16-21. [Gupalo E.M., Mironova N.A., Malkina T.A., Polevaya T.Yu., Golitsyn S.P. The role of inflammation in heart rhythm and conduction disturbances. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2015, Vol. 30, no. 1, pp. 16-21. (In Russ.)]
4. Кологривова И.В., Суслова Т.Е., Винницкая И.В., Кошельская О.А., Бощенко А.А., Трубачева О.А. Иммунорегуляторный дисбаланс и структурно-функциональное состояние сердца у пациентов с сахарным диабетом 2 типа // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 833-846. [Kologrivova I.V., Suslova T.E., Vinnitskaya I.V., Koshelskaya O.A., Boshchenko A.A., Trubacheva O.A. Immunoregulatory imbalance and functional state of the heart in the patients with diabetes mellitus type 2. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 833-846. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-833-846.
5. Костюкевич М.В., Зыков К.А., Миронова Н.А., Агапова О.Ю., Шевелев А.Я., Ефремов Е.Е., Власик Т.Н., Голицын С.П. Роль аутоантител к  $\beta 1$ -адренорецептору при сердечно-сосудистых заболеваниях // Кардиология, 2016. № 12. С. 82-91. [Kostyukevich M.V., Zykov K.A., Mironova N.A., Agapova O.Yu., Shevelev A.Ya., Efremov E.E., Vlasik T.N., Golitsyn S.P. Role of autoantibodies against  $\beta 1$ -adrenergic receptor in cardiovascular disease. *Kardiologiya = Cardiology*, 2016, no. 12, pp. 82-91. (In Russ.)]
6. Моисеева О.М., Митрофанова Л.Б., Накацева Е.В., Зверев Д.А., Скурыдин С.В., Полетаев А.Б. Сравнительный анализ содержания аутоантител в сыворотке крови как инструмент диагностики воспалительных заболеваний миокарда // Терапевтический архив, 2012. Т. 84, № 9. С. 47-52. [Moiseeva O.M., Mitrofanova L.B., Nakatseva E.V., Zverev D.A., Skurydin S.V., Poletaev A.B. Comparative analysis of the serum level of autoantibodies as a diagnostic tool of myocardial inflammatory diseases. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2012, Vol. 84, no. 9, pp. 47-52. (In Russ.)]
7. Наумова О.В., Кудяева И.В., Маснавиева Л.Б., Дьякович О.А., Белик В.П. Молекулярно-генетические вопросы формирования эндотелиальной дисфункции у лиц, экспонированных ртутью // Медицина труда и промышленная экология, 2017. № 1. С. 10-13. [Naumova O.V., Kudaeva I.V., Masnavieva L.B., Dyakovich O.A., Belik V.P. Molecular genetic aspects of endothelial dysfunction in individuals exposed to mercury. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya = Occupational Health and Industrial Ecology*, 2017, no. 1, pp. 10-13. (In Russ.)]
8. Полетаев А.Б. Физиологическая иммунология – естественные аутоантитела и проблемы наномедицины. М.: Миклош, 2011. 220 с. [Poletaev A.B. Physiological immunology – natural autoantibodies and problems of nanomedicine]. Moscow: Miklosh, 2011. 220 p.
9. Порядин Г.В., Осолок Л.Н. Патофизиологические аспекты метаболического синдрома // Лечебное дело, 2011. № 4. С. 1-10. [Poryadin G.V., Oskolok L.N. Pathophysiology of metabolic syndrome. *Lechebnoe delo = Medicine*, 2011, no. 4, pp. 1-10. (In Russ.)]
10. Рогова М.М., Миронова Н.А., Родионова Е.С., Малкина Т.А., Зыков К.А., Беспалова Ж.Д., Бибилашвили Р.Ш., Ефремов Е.Е., Голицын С.П. Титры антител к  $\beta 1$ -адренорецепторам и М2-холинорецепторам у больных с желудочковыми нарушениями ритма сердца без признаков органического заболевания сердечно-сосудистой системы и их возможное клиническое значение // Рациональная фармакотерапия в кардиологии, 2012. Т. 8, № 5. С. 647-654. [Rogova M.M., Mironova N.A., Rodionova E.S., Malkina T.A., Zykov K.A., Bepalova Zh.D., Bibilashvili R.Sh., Efremov E.E., Golitsyn S.P. Titers of antibodies to  $\beta 1$ -adrenoceptor and M2

cholinergic receptors in patients with ventricular arrhythmias without an organic cardiovascular disease and their possible clinical significance. *Ratsionalnaya farmakoterapiya v kardiologii = Rational Pharmacotherapy in Cardiology*, 2012, Vol. 8, no. 5, pp. 647-654. (In Russ.)]

11. Спиридонова Н.В., Басина Е.И., Щукин В.Ю. Естественные (физиологические) аутоантитела и регуляция гомеостаза // Известия Самарского научного центра РАН, 2015. Т. 17, № 5-3. С. 861-867. [Spiridonova N.V., Basina E.I., Shchukin V.Yu. Natural (physiological) autoantibodies and regulation of homeostasis. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN = News of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2015, Vol. 17, no. 5-3, pp. 861-867. (In Russ.)]

12. Шпагина Л.А., Герасименко О.Н., Дробышев В.А., Кузнецова Г.В. Эндотелиально-гемостазиологические предикторы сердечно-сосудистого риска у больных вибрационной болезнью в сочетании с артериальной гипертензией // Сибирский медицинский вестник, 2017. № 1. С. 5-8. [Shpagina L.A., Gerasimenko O.N., Drobyshev V.A., Kuznetsova G.V. Endothelial hemostatic predictors of cardiovascular risk in patients with vibration disease in combination with the arterial hypertension. *Sibirskiy meditsinskiy vestnik = Siberian Medical Bulletin*, 2017, no. 1, pp. 5-8. (In Russ.)]

13. Шпагина Л.А., Третьяков С.В., Войтович Т.В. Функциональное состояние системы кровообращения в динамике лечения артериальной гипертонии у больных вибрационной болезнью // Терапевтический архив, 2003. Т. 75, № 2. С. 58-61. [Shpagina L.A., Tretyakov S.V., Voitovich T.V. Function of circulation system in the course of arterial hypertension treatment in patients with vibration disease. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2003, Vol. 75, no. 2, pp. 58-61. (In Russ.)]

14. Ямщикова А.В., Флейшман А.Н., Гидаятова М.О., Неретин А.А., Кунгурова А.А. Особенности вегетативной регуляции у больных вибрационной болезнью на основе активной ортостатической пробы // Медицина труда и промышленная экология, 2018. № 6. С. 11-14. [Yamshchikova A.V., Fleishman A.N., Gidayatova M.O., Neretin A.A., Kungurova A.A. Features of vegetative regulation in vibration disease patients, studied on basis of active orthostatic test. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya = Occupational Medicine and Industrial Ecology*, 2018, no. 6, pp. 11-14. (In Russ.)]

15. Caforio A.L.P., Tona F., Bottaro S., Vinci A., Dequal G., Daliotto L., Thiene G., Iliceto S. Clinical implications of anti-heart autoantibodies in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity*, 2008, Vol. 41, no. 1, pp. 35-45.

16. Chiale P.A., Garro H.A., Schmidberg J., Sánchez R.A., Acunzo R.S., Lago M., Levy G., Levin M. Inappropriate sinus tachycardia may be related to an immunologic disorder involving cardiac beta adrenergic receptors. *Heart Rhythm*, 2006, Vol. 3, no. 10, pp. 1182-1186.

17. Du Y., Yan L., Wang J., Zhan W., Song K., Han X., Li X., Cao J., Liu H.  $\beta$ 1-adrenoceptor autoantibodies from DCM patients enhance the proliferation of T lymphocytes through the  $\beta$ 1-AR/cAMP/PKA and p38 MAPK pathways. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 12, 52911. doi: 10.1371/journal.pone.0052911.

18. Hirata M., Sakakibara H. Visually-evoked P300 and NOGO potentials as indicators of central nervous system function in patients with vibration syndrome. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 2008, Vol. 82, no. 1, pp. 79-85.

19. Ippoliti F., Canitano N., Businaro R. Stress and obesity as risk factors in cardiovascular diseases: a neuroimmune perspective. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 2013, Vol. 8, no. 1, pp. 212-226.

20. Iwata M., Yoshikawa T., Baba A., Anzai T., Mitamura H., Ogawa S. Autoantibodies against the second extracellular loop of the beta1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2001, Vol. 37, pp. 418-424.

21. Liu H.R., Zhao R.R., Zhi J.M., Wu B.W., Fu M.L. Screening of serum autoantibodies to cardiac beta1-adrenoceptors and M2-muscarinic acetylcholine receptors in 408 healthy subjects of varying ages. *Autoimmunity*, 1999, Vol. 29, no. 1, pp. 43-51.

22. Milicevic G., Udiljak N., Milicevic T. Changes in vagal reactivity to the sympathicotonia during the progression of heart failure: from self-suppression to counteraction. *Med. Hypotheses*, 2013, Vol. 81, no. 2, pp. 264-267.

23. Poletaev A.B., Churilov L.P., Stroev Y.I., Agapov M.M. Immunophysiology versus immunopathology: natural autoimmunity in human health and disease. *Pathophysiology*, 2012, Vol. 19, no. 3, pp. 221-231.

24. Stavrakis S., Kem D.C., Patterson E., Lozano P., Huang S., Szabo B., Cunningham M.W., Lazzara R., Yu X. Opposing cardiac effects of autoantibody activation of beta-adrenergic and M2 muscarinic receptors in cardiac-related diseases. *Int. J. Cardiol.*, 2011, Vol. 148, no. 3, pp. 331-336.

25. Steinberg S.F. Beta1-adrenergic receptor regulation revisited. *Circ Res.*, 2018, Vol. 123, no. 11, pp. 1199-1201.

26. Wulsin L.R., Horn P.S., Perry J.L., Massaro J.M., d'Agostino R.B. Autonomic imbalance as a predictor of metabolic risks, cardiovascular disease, diabetes, and mortality. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2015, Vol. 100, no. 6, pp. 2443-2448.

**Авторы:**

**Маснавиева Л.Б.** — д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Иркутская обл., Россия

**Кудаева И.В.** — д.м.н., доцент, заместитель директора по научной работе, заведующая клинико-диагностической лабораторией ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Иркутская обл., Россия

**Кузнецова Ю.А.** — младший научный сотрудник лаборатории иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Иркутская обл., Россия

**Authors:**

**Masnavieva L.B.**, PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunological, Biochemical, Molecular and Genetic Researches in Hygiene, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Irkutsk Region, Russian Federation

**Kudaeva I.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Research, Head, Clinical Diagnostic Laboratory, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Irkutsk Region, Russian Federation

**Kuznetsova Yu.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Immunological, Biochemical, Molecular and Genetic Researches in Hygiene, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Irkutsk Region, Russian Federation

---

Поступила 11.03.2019

Отправлена на доработку 15.03.2019

Принята к печати 10.11.2019

---

Received 11.03.2019

Revision received 15.03.2019

Accepted 10.11.2019

## ЦИРКУЛЯЦИЯ МИКРОЧАСТИЦ ЛИМФОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Винник Ю.С., Дунаевская С.С., Антюфриева Д.А.

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

**Резюме.** Большой научный интерес к проблемам облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей обусловлен увеличением заболеваемости данной патологией и мультидисциплинарным подходом в диагностике и лечении. Цель исследования — изучить взаимосвязи между количеством циркулирующих микрочастиц лимфоцитарного происхождения и развитием критической ишемии нижних конечностей. Выполненное исследование относилось к когортным проспективным исследованиям. Были сформированы две исследуемые группы: 1 группа включала в себя 75 пациентов с ишемией ПВ степени по классификации Покровского—Фонтейна; 2 группа включала 75 пациентов с клиническими проявлениями критической ишемии. Также была сформирована группа контроля из 75 практически здоровых лиц, не имеющих признаков облитерирующих заболеваний сосудов нижних конечностей. Для объективизации оценки степени ишемии измеряли лодыжечное артериальное давление, лодыжечно-плечевой индекс, пальцевое артериальное давление, транскутанное напряжение кислорода в пальцах стопы. Для оценки кровотока в артериях нижних конечностей использовали ультразвуковую доплерографию артерий нижних конечностей и КТ-ангиографию. Исследование проводили при поступлении пациента в стационар до начала терапии. Лимфоциты и циркулирующие микрочастицы определяли в соответствии со стандартным протоколом. У практически здоровых лиц из контрольной группы число циркулирующих микрочастиц лимфоцитарного происхождения составляло 385 (260–479) на 100 лимфоцитов. В 1 группе этот показатель был в 2 раза выше и составлял 728 (654–836) ( $p_1 = 0,002$ ). Во 2 группе было в 5 раз выше, чем в группе контроля и достоверно отличалось от показателя 1 группы (1570 (1124–2120) ( $p_1 < 0,001$ ,  $p_2 = 0,002$ )). Коэффициент корреляции между числом циркулирующих микрочастиц и лодыжечным артериальным давлением составлял  $r_s = -0,82$  ( $p = 0,003$ ). Корреляция между лодыжечно-плечевым индексом и числом микрочастиц была равна  $r_s = -0,92$  ( $p < 0,001$ ). Пальцевое артериальное давление имело средней силы отрицательную корреляцию с числом микрочастиц. Транскутанное напряжение кислорода и число микрочастиц имели коэффициент корреляции равный  $r_s = -0,89$  ( $p = 0,002$ ). Коэффициент корреляции между просветом общей бедренной артерии и числом микрочастиц лимфоцитарного происхождения составлял  $r_s = -0,44$  ( $p = 0,016$ ). Коэффициент корреляции между просветом поверхностной бедренной артерии и числом микрочастиц  $r_s = -0,64$  ( $p = 0,002$ ). Высокими отрицательными являлись корреляции

### Адрес для переписки:

Антюфриева Дарья Александровна  
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ  
660022, Россия, г. Красноярск,  
ул. Партизана Железняка, 1.  
Тел.: 8 (965) 894-99-13.  
E-mail: antyufrievadaria@gmail.com

### Address for correspondence:

Antyufriyeva Darya A.  
Krasnoyarsk State V. Voyno-Yasenetsky Medical University  
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,  
Partizan Zheleznyak str., 1.  
Phone: 7 (965) 894-99-13.  
E-mail: antyufrievadaria@gmail.com

### Образец цитирования:

Ю.С. Винник, С.С. Дунаевская, Д.А. Антюфриева  
«Циркуляция микрочастиц лимфоцитарного происхождения при критической ишемии нижних конечностей» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 319–326.  
doi: 10.15789/1563-0625-COM-1796

© Винник Ю.С. и соавт., 2020

### For citation:

Yu.S. Vinnik, S.S. Dunayevskaya, D.A. Antyufriyeva  
“Circulation of microparticles of lymphocytic origin at critical ischemia of the lower extremities”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 319–326. doi: 10.15789/1563-0625-COM-1796

DOI: 10.15789/1563-0625-COM-1796

числа микрочастиц с сохраненным просветом подколенной артерии —  $r_s = -0,79$  ( $p < 0,001$ ), и задней большеберцовой артерии —  $r_s = -0,86$  ( $p < 0,001$ ). Очень высокий отрицательный коэффициент корреляции был между сохраненным просветом передней большеберцовой и числом микрочастиц лимфоцитарного происхождения  $r_s = -0,91$  ( $p = 0,003$ ). Выявленные высокие и очень высокие корреляционные связи между числом циркулирующих микрочастиц лимфоцитарного происхождения и показателями состояния артериального кровотока нижних конечностей, и сохраненным просветом артерий нижних конечностей позволяют говорить о перспективах использования микрочастиц как патогенетического маркера критической ишемии нижних конечностей.

*Ключевые слова:* лимфоциты, микрочастицы, ишемия, атеросклероз, патогенез, дисфункция эндотелия

## CIRCULATION OF MICROPARTICLES OF LYMPHOCYTIC ORIGIN AT CRITICAL ISCHEMIA OF THE LOWER EXTREMITIES

Vinnik Yu.S., Dunayevskaya S.S., Antyufriyeva D.A.

*Krasnoyarsk State V. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation*

**Abstract.** Great scientific interest to problems of obliterating atherosclerosis of vessels of the lower extremities is caused by increase in incidence of this pathology and multidisciplinary approach in diagnostics and treatment the research objective: to study interrelations between quantity of the circulating microparticles of lymphocytic origin and development of critical ischemia of the lower extremities. The executed research belonged to cohort prospective researches. Two studied groups were created: 1<sup>st</sup> group included 75 patients with ischemia IIB degrees on Pokrovsky–Fontaine’s classification. The 2<sup>nd</sup> group included 75 patients with clinical manifestations of critical ischemia. Also, the group of control of 75 almost healthy faces which do not have symptoms of obliterating diseases of vessels of the lower extremities was created. For objectification of assessment of degree of ischemia measured anklebone’s arterial blood pressure, the anklebone-humeral index, toe’s arterial blood pressure, Transcutaneous tension of oxygen in foot fingers. For blood-groove assessment in arteries of the lower extremities used ultrasonic doppler sonography of arteries of the lower extremities and the KT-angiography. The research was conducted at arrival of the patient in a hospital prior to therapy. Lymphocytes and the circulating microparticles defined according to the standard protocol. At almost healthy faces the number of the circulating microparticles of lymphocytic origin made of control group 385 (260-479) on 100 lymphocytes. In 1<sup>st</sup> group this indicator was twice higher and made 728 (654-836) ( $p_1 = 0.002$ ). In the 2<sup>nd</sup> group it was 5 times higher, than in group of control and authentically differed from an indicator of 1<sup>st</sup> group (1570 (1124-2120) ( $p_1 < 0.001$ ,  $p_2 = 0.002$ ) the Correlation coefficient between number of the circulating microparticles and anklebone’s arterial blood pressure  $r_s = -0.82$  ( $p = 0.003$ ), Correlation between the anklebone-humeral index and number of microparticles was equal to  $r_s = -0.92$  ( $p < 0.001$ ). Toe’s arterial blood pressure had average force negative correlation with number of microparticles. The transcutaneous tension of oxygen and number of microparticles had a correlation coefficient equal  $r_s = -0.89$  ( $p = 0.002$ ). The correlation coefficient between a gleam of the general femoral artery and number of microparticles of lymphocytic origin made  $r_s = -0.44$  ( $p = 0.016$ ). A correlation coefficient between a gleam of a superficial femoral artery and number of microparticles of  $r_s = -0.64$  ( $p = 0.002$ ). Negative correlations of number of microparticles with the kept gleam of a popliteal artery —  $r_s = -0.79$  ( $p < 0.001$ ), and a back tibial artery —  $r_s = -0.86$  were high, ( $p < 0.001$ ). Very high negative correlation coefficient was between the kept gleam of a lobby tibial and number of microparticles of lymphocytic origin of  $r_s = -0.91$  ( $p = 0.003$ ). The revealed high and very high correlation bonds between number of the circulating microparticles of lymphocytic origin and indicators of a condition of an arterial blood-groove of the lower extremities, and the kept gleam of arteries of the lower extremities allow to speak about the prospects of use of microparticles as pathogenetic marker of critical ischemia of the lower extremities.

*Keywords:* lymphocytes, microparticles, ischemia, atherosclerosis, pathogenesis, endothelial dysfunction

## Введение

Большой научный интерес к проблемам облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей обусловлен увеличением заболеваемости данной патологией и мультидисциплинарным подходом в диагностике и лечении [7]. Прогрессирование патологического процесса и развитие критической ишемии — наиболее актуальные проблемы современной сосудистой хирургии [4]. Развитие атеросклеротического поражения артерий зависит от множества факторов, ведущим из которых является повреждение эндотелия [10]. Активация лимфоцитов обеспечивает взаимодействие с эндотелием сосудистой стенки и вызывает развитие асептического воспаления, приводящего к формированию атеросклеротической бляшки [9]. Результатом активации является формирование циркулирующих микрочастиц лимфоцитарного происхождения, запускающих процессы апоптоза и слушивания эндотелия, что усиливает его повреждение [2, 6]. Таким образом, исследование циркулирующих микрочастиц как патогенетического маркера облитерирующего атеросклероза может представлять интерес на разных стадиях заболевания.

**Цель исследования** — изучить взаимосвязи между количеством циркулирующих микрочастиц лимфоцитарного происхождения и развитием критической ишемии нижних конечностей.

## Материалы и методы

Выполненное исследование относилось к когортным проспективным исследованиям. Включало пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей, проходивших лечение в хирургическом отделении СКЦ ФМБА России с 2015 по 2018 год. Исследование было одобрено на заседании локального этического комитета ФГБОУ ВО КрасГМУ, протокол 57/2014 от 29.10.2014 года. Были сформированы две исследуемые группы: 1 группа включала в себя 75 пациентов с ишемией ПВ степени по классификации Покровского—Фонтейна; 2 группа включала 75 пациентов с клиническими проявлениями критической ишемии. Распределение пациентов по группам основывалось на клинических рекомендациях «Заболевания артерий нижних конечностей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (2016 год). Кроме того, была сформирована группа контроля из 75 практически здоровых лиц, не имеющих признаков облитерирующих заболеваний сосудов нижних конечностей.

Для объективизации оценки степени ишемии измеряли лодыжечное артериальное давление, лодыжечно-плечевой индекс, пальцевое арте-

риальное давление, транскутанное напряжение кислорода в пальцах стопы. Для оценки кровотока в артериях нижних конечностей использовали ультразвуковую доплерографию артерий нижних конечностей и КТ-ангиографию. Группы были сравнимы по возрастному и половому составу. Все пациенты в обеих группах клинического наблюдения и участники группы контроля были мужчинами. Возраст в группе контроля составил 64 (52-75) года, в 1 группе — 66 (54-76) лет, во 2 группе — 68 (52-77) лет. Циркулирующие микрочастицы лимфоцитарного происхождения выделили в НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России. Исследование проводили при поступлении пациента в стационар до начала терапии. Лимфоциты и циркулирующие микрочастицы определяли в соответствии со стандартным протоколом. После чего выполняли фазово-контрастную микроскопию на микроскопе Olympus BX-41 “Olympus” (Япония), оценивали не менее 30 полей зрения, снятых с помощью цифровой камеры Olympus DP72 “Olympus” (Япония). Анализ изображений и подсчет выделенных клеток и микрочастиц осуществлялся с помощью программы ImageJ “National Institutes of Health” (США). Подсчитывали число циркулирующих микрочастиц на 100 выделенных лимфоцитов.

Описательная статистика исследуемых величин представлена в виде медианы и 25-го и 75-го перцентилей —  $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$ . Для оценки характера распределения использовали тест Шапиро—Уилка. Исследуемые величины не подчинялись нормальному распределению, для попарного сравнения в группах использовали непараметрический U-критерий Манна—Уитни. Критический уровень статистической значимости при проверке нулевой гипотезы принимали равным 0,05.

Связи между отдельными признаками описаны с помощью коэффициентов корреляции Спирмена ( $r_s$ ), Гамма и Кен-дал-Тау.

## Результаты

Лодыжечное артериальное давление у пациентов 1 группы не отличалось от показателей контрольной группы и составляло 122 (110-132) мм рт. ст.,  $p_1 = 0,324$ , при развитии критической ишемии этот показатель значимо отличался и составлял 54 (32-68) мм рт. ст.,  $p_1 < 0,001$ ,  $p_2 < 0,001$ . Это отражалось в изменении лодыжечно-плечевого индекса у пациентов с облитерирующим атеросклерозом. Так, в 1 группе этот индекс составил 0,63 (0,57-0,74),  $p_1 = 0,003$ , во 2 группе — 0,32 (0,28-0,41),  $p_1 < 0,001$ ;  $p_2 = 0,002$ . Пальцевое артериальное давление у пациентов 1 группы не отличалось от значения группы кон-

ТАБЛИЦА 1. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КРОВотоКА В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

TABLE 1. ASSESSMENT OF A CONDITION OF A BLOOD-GROOVE IN THE STUDIED GROUPS, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Показатели Indicators	Контрольная группа Control group (n = 75)	1 группа 1 <sup>st</sup> group (n = 75)	2 группа 2 <sup>nd</sup> group (n = 75)
Лодыжечное артериальное давление, мм рт. ст. Anklebone's arterial blood pressure, mm Hg	136 (128-156)	122 (110-132) $p_1 = 0,324$	54 (32-68) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,001$
Лодыжечно-плечевой индекс Anklebone-humeral index	1,10 (0,98-1,26)	0,63 (0,57-0,74) $p_1 = 0,003$	0,32 (0,28-0,41) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 = 0,002$
Пальцевое артериальное давление, мм рт. ст. Toe's arterial blood pressure, mm Hg	124 (118-148)	108 (110-132) $p_1 = 0,579$	38 (32-45) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,001$
Транскутанное напряжение кислорода, мм рт. ст. Transcutaneous tension of oxygen, mm Hg	96 (94-98)	86 (82-96) $p_1 = 0,831$	39 (29-52) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 < 0,001$

Примечание.  $p_1$  – значимость различий группы по сравнению с контролем (U-критерий Манна–Уитни);  $p_2$  – значимость различий между 1-ой и 2-ой группами (U-критерий Манна–Уитни).

Note.  $p_1$ , the importance of distinctions of group in comparison with control (Mann–Whitney U-test);  $p_2$ , the importance of differences between the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups (Mann–Whitney U-test).

ТАБЛИЦА 2. ВИЗУАЛИЗИРУЕМЫЙ ПРОСВЕТ АРТЕРИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ДОПЛЕРОГРАФИИ, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

TABLE 2. VISUALIZED GLEAM OF ARTERIES OF THE LOWER EXTREMITIES AT ULTRASONIC DOPPLEROGRAPHY, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

	Контрольная группа Control group (n = 75)	1 группа 1 <sup>st</sup> group (n = 75)	2 группа 2 <sup>nd</sup> group (n = 75)
ОБА, % GFA, %	89,1 (87,2-94,3)	67,9 (64,7-71,5) $p_1 = 0,002$	50,1 (47,1-54,1) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 = 0,012$
ПБА, % SFA, %	72,3 (68,5-74,3)	32,6 (29,9-41,3) $p_1 < 0,001$	20,7 (16,5-22,9) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 = 0,002$
ГБА, % DFA, %	83,6 (79,5-92,1)	69,1 (66,3-79,2) $p_1 = 0,217$	51,1 (38,6-55,0) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 = 0,014$
ПА, % PA, %	76,4 (72,3-88,4)	30,9 (22,3-38,2) $p_1 < 0,001$	16,1 (11,2-19,3) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 = 0,003$
ЗБА, % BTA, %	87,3 (64,7-91,4)	23,4 (20,1-38,5) $p_1 < 0,001$	10,9 (5,6-18,5) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 = 0,023$
ПБА, % FTA, %	89,9 (78,4-93,5)	22,0 (18,4-36,5) $p_1 < 0,001$	9,5 (3,2-12,6) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 = 0,013$

Примечание. ОБА – общая бедренная артерия, ПБА – поверхностная бедренная артерия, ГБА – глубокая бедренная артерия, ПА – подколенная артерия, ЗБА – задняя большеберцовая артерия, ПБА – передняя большеберцовая артерия.  $p_1$  – значимость различий группы по сравнению с контролем (U-критерий Манна–Уитни);  $p_2$  – значимость различий между 1-ой и 2-ой группами (U-критерий Манна–Уитни).

Note. GFA, general femoral artery; SFA, superficial femoral artery; DFA, deep femoral artery; PA, popliteal artery; BTA, back tibial artery; FTA, front tibial artery.  $p_1$ , the importance of distinctions of group in comparison with control (Mann–Whitney U-test);  $p_2$ , the importance of differences between the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups (Mann–Whitney U-test).

**ТАБЛИЦА 3. ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ МИКРОЧАСТИЦЫ ЛИМФОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПЕРЕСЧЕТЕ НА 100 ЛИМФОЦИТОВ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

TABLE 3. CIRCULATING MICROPARTICLES OF LYMPHOCYTIC ORIGIN IN TERMS OF 100 LYMPHOCYTES IN THE STUDIED GROUPS, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

	Контрольная группа Control group (n = 75)	1 группа 1 <sup>st</sup> group (n = 75)	2 группа 2 <sup>nd</sup> group (n = 75)
<b>Микрочастицы лимфоцитарного происхождения</b> Microparticles of lymphocytic origin	385 (260-479)	728 (654-836) $p_1 = 0,002$	1570 (1124-2120) $p_1 < 0,001$ ; $p_2 = 0,002$

**Примечание.** См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

троля, а во 2 группе было значимо ниже и составляло 38 (32-45) мм рт. ст.,  $p_1 < 0,001$ ,  $p_2 < 0,001$ . Транскутанное напряжение кислорода является одним из основных критериев адекватности перфузии, в 1 группе этот показатель не отличался от нормальных значений, во 2 группе был снижен до 39 (29-52) мм рт. ст.;  $p_1 < 0,001$ ,  $p_2 < 0,001$  (табл. 1)

Поражение артерий нижних конечностей у пациентов обеих групп имело мультифокальный характер. Сохранный просвет сосудов у пациентов с облитерирующим атеросклерозом во всех случаях отличался от показателей практи-

чески здоровых лиц контрольной группы. Просвет общей бедренной артерии (ОБА) в 1 группе составил 67,9 (64,7-71,5) %,  $p_1 = 0,002$ , во 2 группе он был несколько ниже 50,1 (47,1-54,1) % ( $p_1 < 0,001$ ,  $p_2 = 0,012$ ). У пациентов обеих групп отмечается резкое снижение просвета поверхностной бедренной артерии (ПБА), в 1 группе до 32,6 (29,9-41,3) %,  $p_1 < 0,001$ ; во 2 группе — до 20,7 (16,5-22,9) %,  $p_1 < 0,001$ ;  $p_2 = 0,002$ . Следует отметить, что в 1 группе не было выявлено значимого снижения просвета глубокой бедренной артерии (ГБА) — 69,1 (66,3-79,2) %,  $p_1 = 0,217$ , а во 2 группе этот показатель был значительно

**ТАБЛИЦА 4. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ПОКАЗАТЕЛЯМИ СОСТОЯНИЯ КРОВотоКА И ЧИСЛОМ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МИКРОЧАСТИЦ ЛИМФОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

TABLE 4. CORRELATION COEFFICIENTS BETWEEN INDICATORS OF A CONDITION OF A BLOOD-GROOVE AND NUMBER OF THE CIRCULATING MICROPARTICLES OF LYMPHOCYTIC ORIGIN

Показатели Indicators	Коэффициент корреляции Спирмена Correlation coefficient of Spirman
<b>Лодыжечное артериальное давление, мм рт. ст.</b> Anklebone's arterial blood pressure, mm Hg	$r_s = -0,82$ , $p = 0,003$
<b>Лодыжечно-плечевой индекс</b> Anklebone-humeral index	$r_s = -0,92$ , $p < 0,001$
<b>Пальцевое артериальное давление, мм рт. ст.</b> Toe's arterial blood pressure, mm Hg	$r_s = -0,69$ , $p < 0,001$
<b>Транскутанное напряжение кислорода, мм рт. ст.</b> Transcutaneous tension of oxygen, mm Hg	$r_s = -0,89$ , $p = 0,002$

**Примечание.**  $r_s$  — коэффициент корреляции Спирмена,  $p$  — двусторонняя значимость коэффициента корреляции Спирмена, считается достоверной при  $p \leq 0,01$ .

Note.  $r_s$ , a correlation coefficient of Spirman;  $p$ , the bilateral importance of a correlation coefficient of Spirman, is considered reliable at  $p \leq 0.01$ .

**ТАБЛИЦА 5. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ВИЗУАЛИЗИРУЕМЫМ ПРОСВЕТОМ АРТЕРИИ И ЧИСЛОМ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МИКРОЧАСТИЦ ЛИМФОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

TABLE 5. CORRELATION COEFFICIENTS BETWEEN THE VISUALIZED GLEAM OF AN ARTERY AND NUMBER OF THE CIRCULATING MICROPARTICLES OF LYMPHOCYTIC ORIGIN

Показатели Indicators	Коэффициент корреляции Спирмена Correlation coefficient of Spirman
ОБА, % GFA, %	$r_s = -0,44; p = 0,016$
ПБА, % SFA, %	$r_s = -0,64; p = 0,002$
ГБА, % DFA, %	$r_s = -0,48; p = 0,009$
ПА, % РА, %	$r_s = -0,79; p < 0,001$
ЗББА, % ВТА, %	$r_s = -0,86; p < 0,001$
ПББА, % ФТА, %	$r_s = -0,91; p = 0,003$

Примечание. См. примечание к таблице 2.  $r_s$  – коэффициент корреляции Спирмена,  $p$  – двусторонняя значимость коэффициента корреляции Спирмена, считается достоверной при  $p \leq 0,01$ .

Note. As for Table 2.  $r_s$ , a correlation coefficient of Spirman;  $p$ , the bilateral importance of a correlation coefficient of Spirman, is considered reliable at  $p \leq 0.01$ .

ниже – 51,1 (38,6-55,0) %,  $p_1 < 0,001$ ;  $p_2 = 0,014$ . Просвет подколенной артерии был значительно сужен в обеих группах и составил 30,9 (22,3-38,2) %,  $p_1 < 0,001$  и 16,1 (11,2-19,3) %,  $p_1 < 0,001$ ;  $p_2 = 0,003$  соответственно. Наиболее выраженный стеноз, вплоть до полной окклюзии, наблюдали в артериях голени. Просвет задней большеберцовой артерии (ЗББА) в 1 группе был равен 23,4 (20,1-38,5) %,  $p_1 < 0,001$ ; во 2 группе – 10,9 (5,6-18,5) %,  $p_1 < 0,001$ ;  $p_2 = 0,023$ . Просвет передней большеберцовой артерии (ПББА) составлял 22,0 (18,4-36,5) %,  $p_1 < 0,001$  и 9,5 (3,2-12,6) %,  $p_1 < 0,001$ ;  $p_2 = 0,013$  (табл. 2).

У практически здоровых лиц из контрольной группы число циркулирующих микрочастиц лимфоцитарного происхождения составляло 385 (260-479) на 100 лимфоцитов. В 1 группе этот показатель был в 2 раза выше и составлял 728 (654-836),  $p_1 = 0,002$ . Во 2 группе число циркулирующих микрочастиц было в 5 раз выше, чем в группе контроля и достоверно отличалось от показателя 1 группы (1570 (1124-2120),  $p_1 < 0,001$ ;  $p_2 = 0,002$  (табл. 3).

Коэффициент корреляции между числом циркулирующих микрочастиц и лодыжечным артериальным давлением составлял  $r_s = -0,82$  ( $p = 0,003$ ), что соответствовало высокой отрицательной корреляции. Корреляция между лодыжечно-плечевым индексом и числом микро-

частиц была равна  $r_s = -0,92$  ( $p < 0,001$ ), это очень высокая отрицательная корреляция. Пальцевое артериальное давление имело средней силы отрицательную корреляцию с числом микрочастиц. Транскутанное напряжение кислорода и число микрочастиц имели коэффициент корреляции равный  $r_s = -0,89$  ( $p = 0,002$ ), что соответствовало высокой отрицательной корреляции (табл. 4).

Коэффициент корреляции между сохраненным визуализируемым просветом ОБА и числом микрочастиц лимфоцитарного происхождения составлял  $r_s = -0,44$  ( $p = 0,016$ ), что соответствовало слабой отрицательной корреляции. Коэффициент корреляции между просветом ПБА и числом микрочастиц был равен  $r_s = -0,64$  ( $p = 0,002$ ), что соответствовало отрицательной корреляции средней силы. Коэффициент корреляции сохраненного просвета ГБА и числа микрочастиц получили равным  $r_s = -0,48$  ( $p = 0,009$ ), это слабая отрицательная корреляция. Высокими отрицательными являлись корреляции числа микрочастиц с сохраненным просветом ПА –  $r_s = -0,79$  ( $p < 0,001$ ), и ЗББА –  $r_s = -0,86$  ( $p < 0,001$ ). Очень высокий отрицательный коэффициент корреляции был получен между сохраненным просветом ПББА и числом микрочастиц лимфоцитарного происхождения  $r_s = -0,91$  ( $p = 0,003$ ) (табл. 5).

## Обсуждение

Формирование циркулирующих активных частиц лимфоцитарного происхождения играет важную роль в развитии сосудистой патологии. Микрочастицы обеспечивают межклеточную коммуникацию и запускают процесс повреждения эндотелия у пациентов с атеросклерозом различной локализации [12]. Существуют данные о высокой корреляции между числом микрочастиц лимфоцитарного происхождения и гуморальными маркерами повреждения эндотелия, такими как концентрация sPECAM-1 и антител к фосфолипидам [3].

Повреждение эндотелия приводит к целому каскаду патологических реакций, нарушающих баланс между тромбогенными и атромбогенными факторами, механизмами вазоконстрикции и вазодилатации [5].

Нарушение функционального состояния эндотелия играет ключевую роль в развитии атеросклеротического поражения периферических артерий [8]. Этот процесс провоцирует рост и образование новых атеросклеротических бляшек,

что приводит к снижению сохраненного просвета сосудов, вызывает ухудшение перфузии тканей и приводит к развитию критической ишемии. Активация лимфоцитов и формирование циркулирующих микрочастиц может являться патогенетическим маркером облитерации просвета артерии [1, 2, 11].

Таким образом, изучение числа циркулирующих микрочастиц лимфоцитарного происхождения может отражать интенсивность повреждения эндотелия сосудов нижних конечностей у пациентов с облитерирующим атеросклерозом.

## Заключение

Выявленные высокие и очень высокие корреляционные связи между числом циркулирующих микрочастиц лимфоцитарного происхождения и показателями состояния артериального кровотока нижних конечностей, и сохраненным просветом артерий нижних конечностей позволяют говорить о перспективах использования микрочастиц как патогенетического маркера критической ишемии нижних конечностей.

## Список литературы / References

1. Емельянчик Е.Ю., Вольф Н.Г., Ваземиллер О.А., Салмина А.Б. Функциональное состояние эндотелия у больных легочной артериальной гипертензией, ассоциированной с врожденными пороками сердца // Кардиология, 2017. Т. 57, № 8. С. 40-46. [Emelyanchik E.Yu., Volf N.G., Vasemiller O.A., Salmina A.B. Functional state of vascular endothelium in patients with pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart diseases. *Kardiologiya = Cardiology*, 2017, Vol. 57, no. 8, pp. 40-46. (In Russ.)]
2. Инжутова А.И., Ларионов А.А., Петрова М.М., Салмина А.Б. Теория межклеточной коммуникации в развитии дисфункции эндотелия // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2012. Т. 153, № 2. С. 165-170. [Inzhutova A.I., Larionov A.A., Petrova M.M., Salmina A.B. The theory of intercellular communication in development of dysfunction of an endothelium. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of the Experimental Biology and Medicine*, 2012, Vol. 153, no. 2, pp. 165-170. (In Russ.)]
3. Петрова М.М., Салмина А.Б., Инжутова А.И. Современные подходы к диагностике эндотелиальной дисфункции у больных гипертонической болезнью // Сибирское медицинское обозрение, 2007. Т. 4, № 45. С. 17-20. [Petrova M.M., Salmina A.B., Inzhutova A.I. The modern approaches to diagnosis of endothelial dysfunction at patients with an idiopathic hypertension. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2007, Vol. 4, no. 45, pp. 17-20. (In Russ.)]
4. Харазов А.Ф., Каляев А.О., Исаев А.А. Распространенность симптомной ишемии нижних конечностей в Российской Федерации // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова, 2016. Т. 7. С. 58-61. [Kharazov A.F., Kalyaev A.O., Isaev A.A. PAD prevalence in Russian Federation. *Hirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova = Surgery. N. Pirogov Journal*, 2016, Vol. 7, pp. 58-61. (In Russ.)]
5. Шабров А.В., Апресян А.Г., Добкес А.Л., Ермолов С.Ю., Ермолова Т.В., Манасян С.Г., Сердюков С.В. Современные методы оценки эндотелиальной дисфункции и возможности их применения в практической медицине // Рациональная фармакотерапия в кардиологии, 2016. Т. 12, № 6. С. 733-742. [Shabrov A.V., Apresyan A.G., Dobkes A.L., Ermolov S.Yu., Ermolova T.V., Manasyan S.G., Serdyukov S.V. Current methods of endothelial dysfunction assessment and their possible use in the practical medicine. *Ratsionalnaya farmakoterapiya v kardiologii = Rational Pharmacotherapy in Cardiology*, Vol. 12, no. 6, pp. 733-742. (In Russ.)]
6. Beum P.V., Lindorfer M.A., Beurskens F., Stukenberg P.T., Lokhorst H.M., Pawluczkwycz, A.W., Parren P.W., van de Winkel, J.G., Taylor R.P. Complement activation on B lymphocytes opsonized with rituximab or ofatumumab produces substantial changes in membrane structure preceding cell lysis. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 1, pp. 822-832.
7. Gallino A., Aboyans V., Diehm C., Cosentino F., Stricker H., Falk E., Schouten O., Lekakis J., Amann-Vesti B., Siclari F., Poredos P., Novo S., Brodmann M., Schulte K.L., Vlachopoulos C., de Caterina R., Libby P,

Baumgartner I.; European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. Non-coronary atherosclerosis. *Eur. Heart J.*, 2014, Vol. 35, no. 17, pp. 1112-1119.

8. Igari K., Kudo T., Toyofuku T., Inoue Y. The Relationship between endothelial dysfunction and endothelial cell markers in peripheral arterial disease. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 18, no. 11, e0166840. doi: 10.1371/journal.pone.0166840.

9. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2012, Vol. 32, no. 9, pp. 2045-2051.

10. Lu H., Daugherty A. Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2015, Vol. 35, no. 3, pp. 485-491.

11. Martinez M.C., Tesse A., Zobairi F., Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2005, Vol. 288, no. 3, pp. 1004-1009.

12. Suades R., Padró T., Alonso R., López-Miranda J., Mata P., Badimon L. Circulating CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> lymphocyte-derived microparticles map lipid-rich atherosclerotic plaques in familial hypercholesterolaemia patients. *Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 111, no. 1, pp. 111-121.

---

**Авторы:**

**Винник Ю.С.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии имени профессора М.И. Гульмана ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

**Дунаевская С.С.** — д.м.н., профессор, профессор кафедры общей хирургии имени профессора М.И. Гульмана ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

**Антюфриева Д.А.** — к.м.н., ассистент кафедры общей хирургии имени профессора М.И. Гульмана ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

---

**Authors:**

**Vinnik Yu.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, M. Gulman Department of General Surgery, Krasnoyarsk State V. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Dunayevskaya S.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, M. Gulman Department of General Surgery, Krasnoyarsk State V. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Antyufriyeva D.A.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, M. Gulman Department of General Surgery, Krasnoyarsk State V. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

---

Поступила 20.07.2019

Отправлена на доработку 13.09.2019

Принята к печати 13.01.2020

---

Received 20.07.2019

Revision received 13.09.2019

Accepted 13.01.2020

## КЛИНИЧЕСКАЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА ОСТЕОАРТРИТА

Ширинский В.С., Калиновская Н.Ю., Филатова К.Ю.,  
Ширинский И.В.

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

**Резюме.** Обследовано 40 больных женщин с гонартрозом: 19 больных опытной группы, у которых остеоартрит (ОА) сочетался с метаболическим синдромом (МС), 21 больная ОА без МС. Установлено, что метаболический фенотип гонартроза — ОА в сочетании с метаболическим синдромом — отличается от ОА без МС большей выраженностью боли по визуальной аналоговой шкале (ВАШ) (65 мм в опытной группе и 47 мм в группе контроля,  $p = 0,001$ ) и других симптомов ОА по шкале исходов остеоартрита Кnees Osteoarthritis Outcome Scale (KOOS) (43,2 баллов в опытной группе и 76,1 балла в группе контроля,  $p = 0,001$ ). Эти основные отличительные характеристики ассоциируются с низким уровнем качества жизни в соответствии с неспецифическим опросником для оценки качества жизни пациента Short Form-36 (SF-36) (30 баллов в опытной группе и 40 баллов в группе контроля) и клинически значимыми признаками депрессии, регистрируемыми с помощью шкалы оценки здоровья пациента Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) (12 баллов в опытной группе и 7 баллов в группе контроля). Метаболический тип гонартроза характеризуется лабораторными признаками системного вялотекущего воспаления, о чем свидетельствует увеличение содержания СРБ (11,4 мг/мл в опытной группе и 3,2 мг/мл в группе контроля,  $p = 0,03$ ), IL-6 (2,6 пг/мл в опытной группе и 0,7 пг/мл в группе контроля,  $p = 0,001$ ), IL-18 (196,6 пг/мл в опытной группе и 61,4 пг/мл в группе контроля,  $p = 0,001$ ) в сыворотке ПК, а также повышением содержания антител к Col2 (27,1 нг/мл в опытной группе и 5,5 нг/мл в группе контроля,  $p = 0,01$ ) и дислипидемией — увеличением уровня холестерина ЛПНП (5,5 ммоль/л в опытной группе и 59 ммоль/л в группе контроля,  $p = 0,032$ ) и триглицеридов (2,026 ммоль/л в опытной группе и 1,36 ммоль/л в группе контроля,  $p = 0,02$ ). Заключается, что фенотип ОА в сочетании с МС обусловлен их патогенетическим сходством (синтропия), основу которого составляет вялотекущее воспаление. Этот субтип ОА характеризуется малоизученным патогенезом и требует разработки новых принципов терапии этой коморбидности как единой болезни.

**Ключевые слова:** остеоартрит, метаболический синдром, иммунная система, вялотекущее воспаление, цитокины, липиды, СРБ

### Адрес для переписки:

Ширинский Иван Валерьевич  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6.  
Тел.: 8 (923) 107-51-00.  
Факс: 8 (383) 228-25-47.  
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

### Address for correspondence:

Shirinsky Ivan V.  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630047, Russian Federation, Novosibirsk, Zalesky str., 6.  
Phone: 7 (923) 107-51-00  
Fax: 7 (383) 228-25-47.  
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

### Образец цитирования:

В.С. Ширинский, Н.Ю. Калиновская, К.Ю. Филатова,  
И.В. Ширинский «Клиническая и иммунологическая  
характеристика метаболического фенотипа  
остеоартрита» // Медицинская иммунология, 2020.  
Т. 22, № 2. С. 327-334.  
doi: 10.15789/1563-0625-CAI-1881  
© Ширинский В.С. и соавт., 2020

### For citation:

V.S. Shirinsky, N.Yu. Kalinovskaya, K.Yu. Filatova,  
I.V. Shirinsky "Clinical and immunological features of  
metabolic phenotype of osteoarthritis", Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2,  
pp. 327-334. doi: 10.15789/1563-0625-CAI-1881

DOI: 10.15789/1563-0625-CAI-1881

## CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF METABOLIC PHENOTYPE OF OSTEOARTHRITIS

Shirinsky V.S., Kalinovskaya N.Yu., Filatova K.Yu., Shirinsky I.V.

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

**Abstract.** Forty women with gonarthrosis were included in this study. The main group consisted of 19 patients having osteoarthritis (OA) with metabolic syndrome (MS), the control group consisted of 21 patients with OA but without MS. It was found that metabolic phenotype of gonarthrosis, i.e. OA with concomitant MS, was different from OA without MS in terms of pain measured with visual analogue scale (VAS) (65 mm in the main group vs 47 mm in control group,  $p = 0.001$ ) and other OA symptoms in accordance with Knee Osteoarthritis Outcome Scale (KOOS) (43.2 points in the main group vs 76.1 points in the control group,  $p = 0.001$ ). These main distinguishing features were associated with low quality of life measured with non-specific questionnaire Short Form -36 (SF-36) (30 points in the main group and 40 points in the control) and clinically significant signs of depression, detected with Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) (12 points in the main group and 7 points in the control group). The metabolic phenotype of gonarthrosis was characterized with laboratory features of low-grade systemic inflammation as evidenced by increased CRP (11.4 mg/ml in the main group vs 3.2 mg/ml in the control group,  $p = 0.03$ ), IL-6 (2.6 pg/ml in the main group vs 0.7 pg/ml in the control group,  $p = 0.001$ ), IL-18 (196.6 pg/ml in the main group vs 61.4 pg/ml in the control group,  $p = 0.001$ ) in the peripheral blood serum, as well as increase in antibodies against Col2 (27.1 ng/ml in the main vs 5.5 ng/ml in the control group,  $p = 0.01$ ), and dyslipidaemia – increase in LDL-cholesterol (5.5 mmol/l in the main group vs 5.9 mmol/l in the control group,  $p = 0.032$ ) and triglycerides (2.026 mmol/l in the main group and 1.36 mmol/l in the control group,  $p = 0.02$ ). In conclusion, MS-associated OA phenotype occurs due to pathogenetic similarities between OA and MS (syntropy) based on systemic low grade inflammation. This OA phenotype is not well studied and needs further research to develop new treatments targeting these two comorbid disorders as a single disease.

**Keywords:** osteoarthritis; metabolic syndrome, immune system, low-grade inflammation, cytokines, lipids, CRP

### Введение

Остеоартрит (ОА) относится к числу наиболее часто встречающихся заболеваний суставов. Клинические проявления ОА выявляются у 10-20% населения [2, 3], рентгенологические признаки обнаруживаются значительно чаще, а количество пациентов, имеющих клинические и структурные изменения, существенно увеличивается с возрастом.

По данным эпидемиологических исследований в РФ число пациентов с ОА составляет порядка 15 млн человек [3,7], при этом за период 2010-2014 годов заболеваемость возросла на 12,1%.

Патогенез ОА связывают с комбинацией множества факторов (генетических, эпигенетических, биомеханических, метаболических и др.), которые в итоге приводят к развитию вялотекущего воспаления во всех структурах сустава, вовлечению в процесс клеток иммунной системы, жировой ткани, их медиаторов и формированию разнородных по фенотипу и этиопатогенезу клинических вариантов (субтипов) болезни [1, 6, 13]. Остеоартрит, ассоциированный с метаболическим синдромом (ОАМС), возникает в результате сочетания метаболических нарушений – ожирения, сахарного диабета, инсулинорезистентности, дислипидемии, гиперурикемии, артериальной гипертензии [1, 4, 16]. Частота МС в популяции лиц старше 18 лет колеблется от 10 до

30%, в России она варьирует от 20 до 35% [1, 11]. Эпидемиологические исследования подтвердили более высокую частоту метаболического синдрома (МС) при ОА (59 против 23 % без ОА) [24], причем у лиц молодого возраста (43 года) ОА ассоциировался с пятикратным увеличением риска МС. Несколько исследований указали на повышенный риск развития остеоартрита, независимо от локализации, у пациентов с МС [16]. Доказательства частого сочетания МС и ОА постоянно растут, однако механизмы, связывающие эти два заболевания, недостаточно изучены. Предполагается, что ОА и составляющие МС взаимосвязаны одним патофизиологическим процессом – системным низкоуровневым воспалением. Эта гипотеза основана на экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о нарушении системной регуляции дифференцировки, пролиферации, апоптоза, активности клеток не только тканей сустава, но и клеток жировой ткани, иммунной системы, а также избыточной нагрузки на опорные суставы вследствие ожирения [4, 16].

Задачей исследования являлось изучение характеристики клинических проявлений ОА в сочетании с МС и их связи с содержанием некоторых цитокинов, оценивающих выраженность системного воспаления, уровнем липидов в сыворотке периферической крови.

## Материалы и методы

Обследовано 40 больных женщин с гонартрозом: 19 больных опытной группы, у которых ОА сочетался с метаболическим синдромом, 21 больная ОА без МС. Диагноз «ОА коленного сустава» устанавливался согласно критериям Американской коллегии ревматологов (ACR) 1986 года, МС соответственно рекомендациям Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК) [5] — наличие у пациента абдоминального ожирения (окружность талии (ОТ) > 80 см у женщин и > 94 см у мужчин) и двух из следующих пяти критериев: 1) артериальная гипертензия (артериальное давление  $\geq 140/90$  мм рт. ст.); 2) повышение уровня триглицеридов (ТГ)  $\geq 1,7$  ммоль/л; 3) снижение уровня липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) < 1,0 ммоль/л у мужчин и < 1,2 ммоль/л у женщин; 4) повышение уровня липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) > 3,0 ммоль/л; 5) гипергликемия натощак (уровень сахара в крови  $\geq 6,1$  ммоль/л) или нарушение толерантности к глюкозе (показатель в плазме крови через 2 ч после нагрузки глюкозой  $\geq 7,8$ , но  $\leq 11,1$  ммоль/л) [11].

Всем больным проводилась рентгенография коленных суставов с последующей оценкой изменений по критериям Келлгрена—Лоуренса, согласно которым в 100% случаев у больных обеих подгрупп зарегистрирована 2–3 рентгенологическая стадия болезни.

Для лечения гипертонической болезни (ГБ) больные опытной группы постоянно принимали гипотензивные препараты в виде моно- или комбинированной терапии. С целью уменьшения выраженности боли больные обеих групп нерегулярно получали простые анальгетики (ацетаминофен), нестероидные противовоспалительные средства в разных дозировках. Оценка функции суставов и забор крови проводились до приема пациентами лекарственных препаратов.

Измерение выраженности боли и других симптомов ОА, нарушения функции суставов, качества жизни, депрессии проводилось по шкалам KOOS (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score) [15], WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index) [25], русскоязычной версии PHQ-9 (Patient Health Questionnaire — шкала депрессии) [9], визуально-аналоговой шкале (ВАШ) боли и здоровья, Short Form-36 (SF-36) [26], CIRS — G [23]. Уровень системного воспаления определяли с помощью оценки содержания IL-6, IL-10, IL-18 (Вектор-Бест, Россия), адипонектина (Abcam, UK), СРБ (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия) в сыворотке периферической крови с помощью стандартных наборов для ИФА, согласно инструкций фирм-производителей. Антитела к коллагену 2 (CoL2) в сыворотке крови оценивали с использованием набора фирмы MyBioSource.com., кон-

центрацию липидов в сыворотке ПК определяли стандартным методом.

Описательная статистика представлена медианой, 25% и 75% межквартильными интервалами. Для выявления различий между сравниваемыми подгруппами использовали U-критерий Манна—Уитни.

## Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены основные анамнестические и клинические данные обследованных больных. Обращает на себя внимание то, что все больные были пожилого возраста, с «избыточной» массой тела или «ожирением», согласно определениям экспертов ВОЗ. В первой подгруппе больных абсолютное большинство лиц было с ожирением, тогда как во второй подгруппе преобладали больные с избыточным весом. У пациентов опытной подгруппы зарегистрировано статистически значимое увеличение объема талии в сравнении с больными без МС. Продолжительность течения ОА, индекс CIRS-G в обеих подгруппах не отличались.

В таблице 2 представлены результаты оценки некоторых клинических и функциональных показателей состояния больных на момент обследования. Из таблицы следует, что по ряду показателей больные ОАМС статистически значимо отличаются от больных ОА без МС, а по некоторым выявляются сходства. Так, уровень боли по шкале ВАШ у пациентов опытной подгруппы в 1,5 раза больше, чем у больных контрольной подгруппы. В то же время интенсивность боли, оцениваемой по опроснику KOOS, у больных обеих подгрупп была одинаково умеренной. Оценка показателей общего состояния здоровья по шкале ВАШ и по результатам опросника соответствующей субшкалы SF-36 выявила умеренное снижение значений показателей в той и другой подгруппе, различий между подгруппами больных не установлено. Тяжесть симптомов гонартроза (субшкала KOOS симптомы и суммарный показатель WOMAC) у больных первой подгруппы была статистически значимо выше, и это ассоциировано с более высокими значениями уровня депрессии по шкале PHQ-9. Показатель качества жизни по опроснику KOOS у больных опытной подгруппы был в 2 раза ниже, чем у больных контрольной подгруппы. В то же время у пациентов той и другой подгруппы отмечено умеренное снижение показателей уровня физического и психического здоровья, однако различий между подгруппами не выявлено.

В таблице 3 представлены результаты изучения содержания некоторых биомаркеров в сыворотке периферической крови больных ОА. Обращает на себя внимание более чем трехкратное увеличение лабораторных показателей системного воспаления (СРБ, IL-6, IL-18) у больных

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ОА И ОА В СОЧЕТАНИИ С МС, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH OA AND OA WITH MS, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Показатели Parameters	Больные ОА в сочетании с МС Patients with OA and MS (n = 19)	Больные ОА Patients with OA (n = 21)	p
Возраст (годы) Age (years)	65,5 (61,5-70,5)	65 (53-69)	0,245
масса тела (кг) Weight (kg)	90 (85-100)	74,5 (68-79)	0,02
объем талии (см): Waist circumference (cm)	108,5 (104,5-115,0)	86 (77-94)	0,001
ИМТ (кг/м <sup>2</sup> ) BMI (kg/m <sup>2</sup> )	34,5 (32,00-36,65)	28 (23,5-31,1)	0,001
Продолжительность заболевания ОА (годы) Duration of OA (years)	7 (3-10)	6 (3-13)	0,118
Продолжительность заболевания гипертонической болезнью (годы) Duration of hypertension (years)	7 (4-10)	—	
Показатель CIRS-G CIRS-G score	10,5 (8-11)	9 (6-12)	0,234

ОА в сочетании с МС, в сравнении с больными ОА без МС. У больных ОАМС в сыворотке ПК выявлено значительное увеличение содержания специфических антител к коллагену 2 типа, в сравнение с контрольной подгруппой больных.

Таблица 4 содержит данные о содержании различных липидов в сыворотке крови больных ОА.

Из таблицы следует, что в опытной подгруппе больных ОА, в отличие от контрольной, статистически значимо повышены концентрации холестерина ЛПНП и триглицеридов.

Таким образом, результаты одномоментного исследования свидетельствуют о том, что метаболический фенотип гонартроза — ОА в сочетании с метаболическим синдромом — отличается от ОА без МС в первую очередь большей выраженностью боли и других симптомов ОА. Эти основные отличительные характеристики ассоциируются с низким уровнем качества жизни и клинически значимыми признаками депрессии. Метаболический тип гонартроза характеризуется лабораторными признаками системного вялотекущего воспаления, о чем свидетельствует увеличение содержания СРБ, IL-6, IL-18 в сыворотке ПК, а также повышением содержания антител к Col2 и дислипидемией: увеличением уровня холестерина ЛПНП и триглицеридов.

Здесь следует сделать некоторое отступление и напомнить, что коморбидные заболевания не есть простое сочетание нескольких болезней. Их фенотип, патогенез представляет собой новое целое с малоизученными эмерджентными свойствами и иными возможностями терапии, на основе сходства патогенеза [6]. Необходимо подчеркнуть, что «возникающие» свойства сложных биологических систем (эмерджентность),

характерные для полипатий, невозможно объяснить только с точки зрения их составляющих (отдельных болезней). Патогенез отдельных и коморбидных заболеваний связан, по мнению Barabási A.L., с изменениями универсальных сетевых процессов, происходящих на геномном, молекулярном, клеточном уровнях, которые приводят к поражению различных органов-мишеней [14]. Тем не менее, следуя традиционным подходам, рассмотрим вклад МС и его составляющих на тяжесть течения ОА, прогрессию, особенности патогенеза.

Все основные составляющие МС рассматриваются как факторы риска развития ОА, причем тяжесть течения ОА возрастает при их сочетании [1, 4, 6, 28], что показывают результаты и наших исследований. Более высокие значения боли в суставах, функциональной недостаточности и утренней скованности у больных ОАМС выявлены другими авторами [12]. Увеличение числа факторов МС коррелирует с выраженностью боли в коленных суставах (ОШ = 3,7; 95% ДИ 1,5-5,9;  $p = 0,001$ ) [4]. При гипергликемии (компонент МС) шанс формирования рентгенологических проявлений ОА возрастал в 2 раза, а клинических в 3 раза. Выявлена обратная корреляционная связь ширины суставной щели коленного сустава и прямо пропорциональная связь наличия остеофитов с числом компонентов МС [21].

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что пациенты с ОАМС, в отличие от больных ОА, характеризуются признаками умеренной депрессии. Анализ проблем остеоартрита и депрессии посвящен обзор данных литературы Н.И. Коршунова и соавт. [8], к которому

ТАБЛИЦА 2. КЛИНИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СОСТОЯНИЯ БОЛЬНЫХ ОА, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

TABLE 2. CLINICAL AND FUNCTIONAL PARAMETERS OF PATIENTS WITH OA, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

Показатели Parameters	Больные ОА в сочетании с МС Patients with OA and MS (n = 19)	Больные ОА Patients with OA (n = 21)	p
Боль по ВАШ VAS pain	65 (55,5-76,5)	47 (35-50)	0,001
Общее состояние здоровья по ВАШ VAS general health	56 (43,5-72,0)	47 (29-50)	0,124
KOOS симптомы KOOS symptoms	43,2 (34-57)	76,1 (67,06-85,10)	0,001
KOOS уровень боли KOOS pain	45,9 (40,7-55,6)	49,3 (27-70)	0,233
KOOS уровень качества жизни KOOS quality of life	18,7 (12,5-37,5)	43,2 (33,5-54,0)	0,002
WOMAC суммарный индекс WOMAC total	969 (735-1468)	760 (610-1100)	0,225
Качество жизни по SF-36: уровень физического здоровья SF-36: physical health	30 (25-30)	40 (25-60)	0,112
Уровень психического здоровья Mental health	58 (44-68)	64 (47-69)	0,232
Общее состояние здоровья General health	37,5 (32,5-50,0)	46 (37-66)	0,154
PHQ-9 шкала депрессии PHQ-9 depression scale	12 (9-17)	7 (5-11)	0,001

мы отсылаем заинтересованного читателя. Здесь мы ограничимся лишь некоторыми замечаниями.

Проявление депрессии у больных ОА значительно усложняет решение задач диагностики, прогноза, лечения. Депрессия часто является элементом патогенетической связки: «боль – депрессия – нарушения цикла сон – бодрствование», определяя снижение физических и психических возможностей больного и, как следствие, качества жизни. Депрессия извращает восприятие боли и затрудняет прогностическую оценку прогрессирования ОА. Наличие депрессии может повышать риск неудовлетворительных результатов артропластики. В оригинальной работе Li и соавт. [22] подчеркивается, что композиция компонентов МС способствует усилению болей и депрессии, ухудшая функцию коленных суставов. Не случайно, некоторые авторы предлагают выделение определенного фенотипа ОА – «остеоартрит с депрессией», поскольку эта подгруппа пациентов требует особого подхода к немедикаментозной и медикаментозной терапии и обязательного участия в лечении и реабилитации психиатра [8].

Результаты исследования выявили наличие у больных ОАМС дислипидемии. Помимо того, что она является известным биомаркером развития атеросклероза и его грозных последствий, показана ассоциация повышенного содержания общего холестерина, холестерина липопротеидов

низкой плотности (ЛПНП) и триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови с развитием и прогрессированием ОА [20].

Ключевым звеном патогенеза ГБ – обязательного компонента МС, определяющего поражение органов-мишеней – является ренин-ангиотензин – альдостероновая система (РАСС). Механизмы патогенного действия основного компонента этой системы – ангиотензина II (АТ II) – обусловлены не только его мощным вазоконстрикторным действием, но и пролиферативной, прооксидантной, провоспалительной и протромбогенной активностью. Активируя комплекс провоспалительных цитокинов, АТ II способствует развитию воспаления ткани, в которой он локально синтезирован, будь то ткань почек, сердца, сосуды сетчатки, эндотелий сосудов, синовиальная оболочка сустава [19].

Хорошо известно, что один из главных компонентов МС – висцеральное ожирение – является ключевым фактором развития и более быстрого прогрессирования ОА [17, 21]. Сама жировая ткань представляет собой самостоятельный секреторный орган, который продуцирует разные биологические активные вещества с различными эффектами [17]. Ожирение играет двоякую роль при ОА в зависимости от того, какие суставы поражены – опорные или мелкие. При поражении суставов кистей в патогенезе болезни ведущую роль играют системные процессы и метавоспаление,

**ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ БИОМАРКЕРОВ В СЫВОРОТКЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОА, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**  
TABLE 3. CONCENTRATIONS OF BIOMARKERS IN PERIPHERAL SERA OF PATIENTS WITH OA, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Биомаркер Biomarker	Больные ОА в сочетании с МС Patients with OA and MS (n = 19)	Больные ОА Patients with OA (n = 21)	p
<b>Антитела к коллагену 2 – Col2Ab (нг/мл)</b> Antibodies to collagen 2 – Col2Ab (ng/ml)	27,1 (30,0-61,2)	5,5 (4-6)	0,01
<b>IL-6 (пг/мл)</b> pg/ml	2,6 (1,1-6,4)	0,7 (0,2-1,7)	0,001
<b>IL-10 (пг/мл)</b> pg/ml	0 (0,0-4,4)	1,3 (0,6-3,4)	0,235
<b>IL-18 (пг/мл)</b> pg/ml	196,6 (131,90-267,02)	61,4 (48,1-100,3)	0,001
<b>Адипонектин (нг/мл)</b> Adiponectin (ng/ml)	30,7 (24,3- 53,1)	35,9 (21,4-63,4)	0,282
<b>СРБ (мг/мл)</b> CRP (mg/ml)	11,4 (3,7-13,6)	3,2 (1,8-8,6)	0,03

**ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОА, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**  
TABLE 4. CONCENTRATIONS OF LIPIDS IN PERIPHERAL SERA OF PATIENTS WITH OA, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Биомаркер Biomarker	Больные ОА в сочетании с МС Patients with OA and MS (n = 19)	Больные ОА Patients with OA (n = 21)	p
<b>Общий холестерин (ммоль/л)</b> Total cholesterol (mMol/l)	5,5 (5,1-6,2)	5,9 (5,8-7,0)	0,112
<b>Холестерин ЛПНП (ммоль/л)</b> LDL-cholesterol (mMol/l)	3,2 (2,7-3,8)	1,3 (0,962 -1,600)	0,032
<b>Холестерин ЛПВП (ммоль/л)</b> HDL-cholesterol (mMol/l)	1,2 (1,0-1,5)	1,4 (1,3-1,7)	0,124
<b>Индекс атерогенности</b> Atherogenic index	3,8 (2,5 - 4,3)	3,0 (2,5-4,0)	0,041
<b>Триглицериды (ммоль/л)</b> Triglycerides (mMol/l)	1,9 (1,3-2,3)	1,3 (1,1-1,5)	0,002

при гонартрозе механическая нагрузка является наиболее важным компонентом, однако системные метавоспалительные процессы также участвуют в прогрессировании ОА коленных суставов [21]. Существует множество доказательств, что компоненты МС (ожирение, гипергликемия, дислипидемия, ГБ, инсулинорезистентность и пр.) участвуют в патогенезе ОА [27, 28] за счет увеличения синтеза различных медиаторов воспаления (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-18, провоспалительные адипокины, АТII, некоторые липиды и др.), увеличения окислительного стресса и митохондриальной дисфункции, формируя особый тип воспаления — низкоуровневое, хроническое, связанное с метаболическими расстройствами и получившее название «метавоспаление» (metaflammation) [18]. Вялотекущий воспалительный процесс и составляющие метаболического синдрома образуют «замкнутый круг», взаимно потенцируя друг друга, охватывая различные органы-мишени: жировую

ткань, ткани суставов, клетки стенки сосудов, почек и др. Видимо, не случайно более высокая смертность пациентов с ОА и метаболическим синдромом от сердечно-сосудистых событий объясняется не только низкой физической активностью больных, но и вялотекущим хроническим воспалением [16].

Все это позволяет предположить, что частое сочетание ОА и МС обусловлено их патогенетическим сходством, основу которого составляет вялотекущее воспаление, а сама полипатия относится к группе синтропий [6, 10], характеризующейся особыми, недостаточно описанными клиническими характеристиками, малоизученным патогенезом и требующей новых подходов к терапии. Напомним, что согласно определению академика Пузырева В.П., «не случайность сочетания обусловлена сходством патогенеза и участием общих («синтропных») генов предраспо-

ложенности к развитию отдельных заболеваний и формированию конкретной синтропии» [10].

Отсюда необходимость обоснования нового холистического (персонифицированного) подхода к профилактике, диагностике, лечению и прогнозу коморбидной патологии вообще и ОАМС в частности, разработка которого находится в самом начале своего пути. Пока мы еще очень смутно представляем, на какие универсальные принципы должен опираться врач в лечении

коморбидной патологии, чтобы избежать неизбежной полипрагмазии. Один из вариантов подходов, широко обсуждаемый в последние годы, — теория сетевых взаимодействий, сетевая медицина и управление сетями [14]. Единичные примеры ее эффективности и безопасности внушают оптимизм и веру в правильность холистического понимания сути полипатий и, в частности, ОАМС.

## Список литературы / References

1. Алексеева Л.И., Таскина Е.А., Кашеварова Н.Г., Шарапова Е.П., Аникин С.Г., Стребкова Е.А., Короткова Т.А., Раскина Т.А., Зонова Е.В., Оттева Э.Н. Остеоартрит коленных суставов и метаболический синдром: новые подходы к терапии // Научно-практическая ревматология, 2018 Т. 56, № 2. С. 157-163. [Alekseeva L.I., Taskina E.A., Kashevarova N.G., Sharapova E.P., Anikin S.G., Strebkova E.A., Korotkova T.A., Raskina T.A., Zonova E.V., Otteva E.N. Knee osteoarthritis and metabolic syndrome: new approaches to therapy. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2018, Vol. 56, no. 2, pp. 157-163. (In Russ.)]
2. Алексеева Л.И. Новые представления о патогенезе остеоартрита, роль метаболических нарушений // Ожирение и метаболизм, 2019. Т. 16, № 2. С. 75-82. [Alekseeva L.I. New ideas about the pathogenesis of osteoarthritis, the role of metabolic disorders. *Ozhirenie i metabolism = Obesity and Metabolism*, 2019, Vol. 16, no. 2, pp. 75-82. (In Russ.)]
3. Балабанова Р.М., Дубинина Т.В., Эрдес Ш.Ф. Динамика заболеваемости ревматическими заболеваниями взрослого населения России за 2010-2014 гг. // Научно-практическая ревматология, 2016. Т. 54, № 3. С. 266-270. [Balabanova R.M., Dubinina T.V., Erdes S.F. Trends in the incidence of rheumatic diseases in the adult population of Russia over 2010-2014. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2016, Vol. 54, no. 3, pp. 266-270. (In Russ.)]
4. Головач И.Ю. Метаболический фенотип остеоартрита. Современные взгляды на патогенез, механизмы прогрессирования и подходы к лечению [Электронный ресурс] // Украинский ревматологический журнал, 2018. № 71 (1). Режим доступа: <http://www.rheumatology.kiev.ua/article/10652/metabolicheskij-fenotip-osteoartrita-sovremennye-vzglyady-na-patogenez-mexanizmy-progressirovaniya-i-podxody-k-lecheniyu>. [Golovach I.Yu. Metabolic phenotype of osteoarthritis. modern views on pathogenesis, mechanisms of progression and approaches to treatment [Electronic resource]. *Ukrainskiy revmatologicheskij zhurnal = Ukrainian Journal of Rheumatology*, 2018, no. 71 (1). (In Russ.)] Access mode: <http://www.rheumatology.kiev.ua/article/10652/metabolicheskij-fenotip-osteoartrita-sovremennye-vzglyady-na-patogenez-mexanizmy-progressirovaniya-i-podxody-k-lecheniyu>.
5. Диагностика и лечение метаболического синдрома. В кн.: Сборник национальных клинических рекомендаций. М.: Силиция-Полиграф, 2009. С. 106-143. [Diagnosis and treatment of metabolic syndrome. In: Collection of national clinical recommendations]. Moscow: Silitseya-Poligraf, 2009, pp. 106-143.
6. Казыгашева Е.В., Ширинский В.С., Ширинский И.В. Диабет-ассоциированный остеоартрит – синтропия? // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 317-330. [Kazygasheva E.V., Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Diabetes-associated osteoarthritis: a syntropy? *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 317-330. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-317-330.
7. Каратеев А.Е., Лиля А.М. Остеоартрит: современная клиническая концепция и некоторые перспективные терапевтические подходы // Научно-практическая ревматология, 2018. Т. 56, № 1. С. 70-81. [Karateev A.E., Lila A.M. Osteoarthritis: current clinical concept and some promising therapeutic approaches. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2018, Vol. 56, no. 1, pp. 70-81. (In Russ.)]
8. Коршунов Н.И., Речкина Е.В., Филатова Ю.С., Яльцева Н.В. Остеоартрит и депрессия // Научно-практическая ревматология, 2018. Т. 56, № 1. С. 93-98. [Korshunov N.I., Rechkina E.V., Filatova Yu.S., Yaltseva N.V. Osteoarthritis and depression. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2018, Vol. 56, no. 1, pp. 93-98. (In Russ.)]
9. Погосова Н.В., Довженко Т.В., Бабин А.Г., Курсаков А.А., Выгодин В.А. Русскоязычная версия опросников PHQ-2 и 9: чувствительность и специфичность при выявлении депрессии у пациентов общей медицинской амбулаторной практики // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2014. Т. 13, № 3. С. 18-24. [Pogosova N.V., Dovzhenko T.V., Babin A.G., Kursakov A.A., Vygodin V.A. Russian version of PHQ-2 and 9 questionnaires: sensitivity and specificity in detection of depression in outpatient general medical practice. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2014, Vol. 13, no. 3, pp. 18-24. (In Russ.)]
10. Пузырев В.П. Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии человека // Медицинская генетика, 2008. № 9. С. 3-9. [Puzirev V.P. Genetic view on the phenomenon of combined pathology in human. *Meditinskaya genetika = Medical Genetics*, 2008, no. 9, pp. 3-9. (In Russ.)]
11. Рудой О.В., Черныш О.В. Метаболический синдром: современный взгляд на проблему // Военная медицина, 2016. № 1. С. 107-114. [Rudoy A.S., Chernysh O.V. Metabolic syndrome: a modern view on the problem. *Voennaya meditsina = Military Medicine*, 2016, no. 1, pp. 107-114. (In Russ.)]
12. Стребкова Е.А., Алексеева Л.И. Остеоартроз и метаболический синдром // Фарматека, 2015. № 17. С. 15-19. [Strebkova E.A., Alekseeva L.I. Osteoarthrosis and metabolic syndrome. *Farmateka = Farmateka*, 2015, Vol. 17, pp. 15-19. (In Russ.)]

13. Ширинский В.С., Казыгашева Е.В., Ширинский И.В. Воспаление и иммунитет: роль в патогенезе остеоартрита // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 39-48. [Shirinsky V.S., Kazygasheva E.V., Shirinsky I.V. Inflammation and immunity: a role of pathogenesis of osteoarthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 39-48. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-39-48.
14. Barabási A.L. Network Medicine – from obesity to the “diseasome”. *N. Engl. J. Med.*, 2007, no. 357, pp. 404-407.
15. Bellamy N., Buchanan W.W., Goldsmith C.H., Campbell J., Stitt L.W. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J. Rheumatol.*, 1988, no. 15, pp. 1833-1840.
16. Berenbaum F., Griffin T.M., Liu-Bryan R. Metabolic regulation of inflammation in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 2017, Vol. 69, no. 1, pp. 9-21.
17. Bliddal H., Leeds A.R., Christensen R. Osteoarthritis, obesity and weight loss: evidence, hypotheses and horizons – a scoping review. *Obes Rev.*, 2014, Vol. 15, no. 7, pp. 578-586.
18. Calay E.S., Hotamisligil G.S. Turning off the inflammatory, but not the metabolic, flames. *Nat. Med.*, 2013, Vol. 19, no. 3, pp. 265-267.
19. Capettini L.S., Montecucco F., Mach F., Stergiopoulos N., Santos R.A., da Silva R.F. Role of renin-angiotensin system in inflammation, immunity and aging. *Curr. Pharm. Des.*, 2012, Vol. 18, no. 7, pp. 963-970.
20. Farnaghi S., Crawford R., Xiao Y., Prasad I. Cholesterol metabolism in pathogenesis of osteoarthritis disease. *Int. J. Rheum. Dis.*, 2017, Vol. 20, no. 2, pp. 131-140.
21. Han C.D., Yang I.H., Lee W.S. Correlation between metabolic syndrome and knee osteoarthritis: data from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES). *BMC Public Health*, 2013, Vol. 13, 603. doi: 10.1186/1471-2458-13-603.
22. Li H., George D.M., Jaarsma R.L., Mao X. Metabolic syndrome and components exacerbate osteoarthritis symptoms of pain, depression and reduced knee function. *Ann. Transl. Med.*, 2016, Vol. 4, no. 7, 133. doi: 10.21037/atm.2016.03.48.
23. Miller M.D., Paradis C.F., Honck P.R., Mazumdar S., Stack J.A., Rifai A.H. Rating chronic medical illness burden in geropsychiatric practice and research application of the Cumulative Illness Rating Scale. *Psychiatry Res.*, 1992, Vol. 41, no. 3, pp. 237-242.
24. Puenpatom R.A., Victor T.W. Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with osteoarthritis: an analysis of NHANES III data. *Postgrad. Med.*, 2009, Vol. 121, no. 6, pp. 9-20.
25. Roos E.M., Roos H.P., Lohmander L.S., Ek Dahl C., Beynon B.D. Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS) – development of a self-administered outcome measure. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, 1998, no. 28, pp. 88-96.
26. Ware J.E., Sherbourne C.D. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med. Care*, 1992, Vol. 30, no. 6, pp. 473-483.
27. Yoshimura N., Muraki S., Oka H. Association of knee osteoarthritis with the accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, dyslipidemia, and impaired glucose tolerance in Japanese men and women: the ROAD study. *J. Rheumatol.*, 2011, Vol. 38, no. 5, pp. 921-930.
28. Yoshimura N., Muraki S., Oka H. Accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, dyslipidaemia, and impaired glucose tolerance raises the risk of occurrence and progression of knee osteoarthritis: a 3-year follow-up of the ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, Vol. 20, no. 11, pp. 1217-1226.

**Авторы:**

**Ширинский В.С.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Калиновская Н.Ю.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Филатова К.Ю.** — клинический ординатор лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Ширинский И.В.** — д.м.н., врач-ревматолог, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Shirinsky V.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Kalinovskaya N.Yu.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Filatova K.Yu.**, Clinical Resident, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Shirinsky I.V.**, PhD, MD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Leading Research Associate, Head, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 31.10.2019  
Принята к печати 20.11.2019

Received 31.10.2019  
Accepted 20.11.2019

## ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ И МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ПРИ СИНДРОМЕ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА

Ермоленко Е.И.<sup>1,2</sup>, Кудрявцев И.В.<sup>1,4</sup>, Соловьева О.И.<sup>3</sup>,  
Карасева А.Б.<sup>1</sup>, Цапиева А.Н.<sup>1</sup>, Кондратенко Ю.Д.<sup>2</sup>, Котылева М.П.<sup>1</sup>,  
Серебрякова М.К.<sup>1</sup>, Шумихина И.А.<sup>3</sup>, Суворов А.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** При помощи метагеномного анализа (16 S rRNA) выявлены особенности состава кишечного микробиоценоза у больных синдромом раздраженного кишечника (СРК): 1) увеличение представительства *Actinobacteria*, в том числе *Bifidobacterium* spp., *Firmicutes*, в том числе принадлежащих к семействам *Streptococcaceae* (*Streptococcus*), *Lachnospiraceae* (*Dorea*), *Veillonellaceae* (*Dialister*), *Proteobacteria* (семейства *Enterobacteriaceae* и *Desulfovibrionaceae*); 2) уменьшение популяции *Bacteroidetes*, в том числе представителей семейств *Prevotellaceae* (*Prevotella* spp.), *Bacteroidaceae* (*Bacteroides* spp.), фирмикутных бактерий, относящихся к семействам *Clostridiaceae* и *Ruminococcaceae* (*Faecalibacterium* spp.). Проточная цитометрия при исследовании субпопуляционного состава Т-регуляторных (Трег) лимфоцитов выявила у больных СРК увеличение количества CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> клеток центральной памяти (СМ), способных регулировать процессы созревания и дифференцировки лимфоцитов в лимфоидной ткани. Обнаружено снижение экспрессии экзонуклеаз CD39 и CD73, что может оказывать существенное влияние на их активность. Отмечено снижение эффекторных клеток памяти (ЕМ) Трег.

Изменения в уровне экспрессии экзонуклеаз CD39 и CD73 находились в обратной корреляционной связи с содержанием протеобактерий и представительством родов *Bifidobacterium* и *Faecalibacterium*. Количественное содержание СМ Трег находилось в прямой корреляционной связи с содержанием *Dorea* spp.

Полученные результаты могут указывать на нарушения в процессах дифференцировки Трег, которые тесно связаны с изменениями ключевых компонентов кишечного микробиоценоза при СРК.

**Ключевые слова:** кишечный микробиоценоз, метагеномный анализ, проточная цитометрия субпопуляции Т-лимфоцитов

### Адрес для переписки:

Ермоленко Елена Игоревна  
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»  
197376, Россия, Санкт-Петербург,  
ул. Акад. Павлова, 12.  
Тел.: 8 (812) 234-68-68.  
Факс: 8 (812) 234-94-89.  
E-mail: Lermolenko1@yandex.ru

### Address for correspondence:

Ermolenko Elena I.  
Institute of Experimental Medicine  
197376, Russian Federation, St. Petersburg,  
Acad. Pavlov str., 12.  
Phone: 7 (812) 234-68-68.  
Fax: 7 (812) 234-94-89.  
E-mail: Lermolenko1@yandex.ru

### Образец цитирования:

Е.И. Ермоленко, И.В. Кудрявцев, О.И. Соловьева,  
А.Б. Карасева, А.Н. Цапиева, Ю.Д. Кондратенко,  
М.П. Котылева, М.К. Серебрякова, И.А. Шумихина,  
А.Н. Суворов «Особенности субпопуляционного состава  
регуляторных Т-лимфоцитов и микробиоты кишечника  
при синдроме раздраженного кишечника»  
// Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2.  
С. 335-346. doi: 10.15789/1563-0625-POS-1905  
© Ермоленко Е.И. и соавт., 2020

### For citation:

E.I. Ermolenko, I.V. Kudryavtsev, O.I. Solovyova,  
A.B. Karaseva, A.N. Tsapieva, Yu.D. Kondratenko,  
M.P. Kotyleva, M.K. Serebryakova, I.A. Shumikhina,  
A.N. Suvorov "Profile of subpopulation composition of  
regulatory T lymphocytes and intestinal microbiota in patients  
with irritable bowel syndrome", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2,  
pp. 335-346. doi: 10.15789/1563-0625-POS-1905  
DOI: 10.15789/1563-0625-POS-1905

# PROFILE OF SUBPOPULATION COMPOSITION OF REGULATORY T LYMPHOCYTES AND INTESTINAL MICROBIOTA IN PATIENTS WITH IRRITABLE BOWEL SYNDROME

Ermolenko E.I.<sup>a, b</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>a, d</sup>, Solovyova O.I.<sup>c</sup>,  
Karaseva A.B.<sup>a</sup>, Tsapieva A.N.<sup>a</sup>, Kondratenko Yu.D.<sup>b</sup>, Kotyleva M.P.<sup>a</sup>,  
Serebryakova M.K.<sup>a</sup>, Shumikhina I.A.<sup>c</sup>, Suvorov A.N.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> North-Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The following specific characteristics of the composition of intestinal microbiota in patients with irritable bowel syndrome (IBS) were identified using a metagenomic analysis (16 S rRNA): 1) an increase in the representation of *Actinobacteria*, including *Bifidobacterium* spp., *Firmicutes*, including representatives of *Streptococcaceae* (*Streptococcus*), *Lachnospiraceae* (*Dorea*), *Veillonellaceae* (*Dialister*), *Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae* and *Desulfovibrionaceae* families); 2) a decrease in the population of *Bacteroidetes*, including representatives of the families *Prevotellaceae* (*Prevotella* spp.), *Bacteroidaceae* (*Bacteroides* spp.). *Firmicutes* belonging to the families *Clostridiaceae* and *Ruminococcaceae* (*Faecalibacterium* spp.).

Flow cytometry in the study of the subpopulation composition of T regulatory (Treg) lymphocytes in patients with IBS revealed an increase in the number of CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> central memory cells (CM), which can regulate the processes of maturation and differentiation of lymphocytes in lymphoid tissue. A decrease in the expression of exonucleases CD39 and CD73 was detected, which can have a significant effect on their activity. A reduction in effector memory cells (EM) Treg was observed.

Changes in the expression level of exonucleases CD39 and CD73 were inversely correlated with the content of *Proteobacteria* and the representation of the genera *Bifidobacterium* spp. and *Faecalibacterium* spp. The content of CM Treg was directly correlated with the content of *Dorea* spp.

The results may be indicative of impairment in the processes of Treg differentiation, which are closely related to changes in key components of intestinal microbiocenosis in IBS.

**Keywords:** intestinal microbiocenosis, metagenomic analysis, flow cytometry of a subpopulation of T lymphocytes

The work is supported by the grant of RPF 16-15-10085.

## Introduction

Irritable bowel syndrome (IBS) is one of the most common functional diseases of the gastrointestinal tract, which affects more than 40% of gastroenterology patients. Significant heterogeneity of the disease is a predictor of the low effectiveness of treatments prescribed to these patients, which in turn leads to the progression of symptoms, a decrease in quality of life, and to an increase in time on sick leave [1, 5, 13, 19, 34].

Studies in recent years have revealed the multifactor nature of the pathogenesis IBS, the presence of disorders of neurohumoral mechanisms of the gastrointestinal tract and the whole body. The cellular composition and morphofunctional characteristics of the intestinal mucosa in IBS have been thoroughly studied. This

disease, a condition in the gastrointestinal tract, is more often interpreted not as dysbiosis, but as “low-grade inflammation” [4, 37]. The microbiota of IBS patients demonstrated an increase in the representation of phylum *Proteobacteria*, changes in the ratio of individual representatives of phylum *Bacteroidetes* and *Firmicutes*, a decrease in biodiversity [25, 26, 36]. Most often, IBS increased the population of enterobacteria [36], lipopolysaccharides (LPS) of the cell wall, which can have a direct effect on immunocompetent cells, interacting with TLR4 receptors on their surface [20, 29].

Also, unsaturated fatty acids (butyric, propionic and acetic), which are produced by other representatives of the intestinal microbiocenosis, including those of the *Bacteroidetes* and *Firmicutes* phyla, play an important role in regulating the immune response in patients with IBS [14, 21, 32, 33]. All of the above factors affect the polarization of the immune response.

In IBS, significant changes in the composition of immunocompetent cells at the local and system levels have been identified [3, 7, 17]. The content of mast cells, intraepithelial lymphocytes and enterochromaffin cells (endocrine cells producing 80% of all serotonin synthesized in the human body) is elevated in the cellular infiltrate in the intestine of IBS patients. Locally and in the peripheral blood of patients, there has been an increase in the number of inflammatory markers: C-reactive protein [11], proinflammatory cytokines – IL-1, IL-6 and TNF $\alpha$ , while the amount of regulatory and anti-inflammatory cytokine IL-10 is generally reduced [3]. These changes in the state of the mucosa, the composition of the microbiota, cytokine status in IBS are accompanied by activation of T lymphocytes [17] circulating in the blood of patients.

Previously, we have shown [18], that the relative content of follicular T helpers (Tfh) with the phenotypes CXCR3-CCR6-CCR4 decreased in IBS patients, while the level of Tfh populations with the properties of Th17 (DN Tfh17 and Tfh17.1) demonstrated a statistically significant increase. These changes in Tfh composition suggest there are changes in how the specific humoral immune response in IBS patients functions, which was supported by reports of an increase in the population of B-lymphocytes previously detected in IBS by other authors [7].

Despite the fact that the exact causes of development and pathogenesis of IBS remain unknown, the involvement of Treg in this pathological process is of interest, as it is the pool of Treg cells that is able to act as regulators of inflammation and as suppressors in the development of allergic and autoimmune reactions of the body.

**The main objective of this study** was to analyze the subpopulation composition of Treg lymphocytes in peripheral blood in patients with IBS, taking into account the analysis of the gut microbiome.

## Materials and methods

### Patient characteristics

Twenty-two patients fulfilling the Rome Criteria V for irritable bowel syndrome with diarrhea (IBS-D) were selected for this clinical trial. The subjects included 8 men (32%) and 17 women (68%). The mean age in the group was 37.0 $\pm$ 8.05 (24–52) years. Patients were monitored in the North-Western State I. Mechnikov

Medical University. All patients have signed an informed consent.

The control group was made up of 30 healthy volunteers of similar age and gender, and same proportion of male/ female subjects as in the group of subjects with IBS.

The object of the study was blood samples obtained by the peripheral vein puncture and collected in vacuum tubes with the addition of K<sub>3</sub>EDTA. All studies were performed with the informed consent of the subjects and in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association “Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects” with amendments from 2000 and “Rules of Clinical Practice in the Russian Federation” approved by the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation 19.06.2003 No. 266. All laboratory tests were carried out on the day of the blood collection.

### Study of the composition of the gut microbiota

The composition of intestinal lumen microbiota was identified in the samples of faeces frozen on the day of the material’s collection. Metagenomic analysis was used for the analysis. Libraries of hypervariable regions V3 and V4 of the 16S RNA gene were analyzed on MiSeq (Illumina, USA). DNA were isolated from faeces using the kit DNK-EKSPRESS by Litekh (Moscow, Russia). The standard method recommended by Illumina based employing two rounds of PCR was used to prepare the libraries. The first round was the amplification of a 16S RNA gene fragment, adding to the target fragment of the adapter nucleotide sequences included in the PCR primers (Table 1).

The second round of PCR, sample preparation, sequencing and bioinformatic processing was performed at the Resource Center “Biobank” of the St. Petersburg State University. The quality of raw DNA readings was assessed by Fastqc (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). The selection of operational taxonomic units (OTEs) based on similar sequences of 16S rRNA was carried out by the CD-HIT-OTU-Miseq software. CD-HIT-OTU-Miseq allows to select OTE by the sequence of terminal regions without the need to merge paired sequences. Clustering was carried out by comparing the DNA regions R1 and R2 with good reading quality of 200 and 180 nucleotide pairs, respectively, 97% of the homology of the selected sites and cut-

TABLE 1. SEQUENCE OF PRIMERS FOR ANALYSIS OF THE SEQUENCES OF 16S rRNA GENES

Sequence of the primers of V3 and V4 regions of 16S rRNA used		Amplicon size
Forward (341)	tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcctacggnggcwgcag	464
Reverse (785)	gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggactachvgggtatctaatcc	

offs 0.00001 by quantity. The OTE annotation was implemented using Greengenes database version 13.5. OTE presented in less than 5% of samples were dismissed as noise.

### Study of the phenotypes of immune cells

Phenotypes of immune cells were determined by flow cytometry in venous blood obtained by puncture of a peripheral vein and collected in vacuum tubes with the addition of K<sub>3</sub>EDTA. Blood samples were taken on the same day as the feces. The preparation of peripheral blood samples and the adjustment of the flow cytometer was carried out in accordance with the recommendations set forth by S.V. Khaidukov et al. [15]. The following panel of monoclonal antibodies conjugated with various fluorochromes was used to identify the main populations of regulatory T lymphocytes and assess their expression level of CD39 and CD73: CD39-FITC (clone A1, cat. 328206, BioLegend, Inc., USA), CD25-PE (clone B1.49.9, cat. A07774, Beckman Coulter), USACD62L-ECD (clone DREG56, cat. IM2713U, Beckman Coulter), USACD45R0-PC5.5 (clone UCHL1, cat. IM2712U, Beckman Coulter), USACD4-PC7 (clone SFC112T4D11 (T4), cat. 737660, Beckman Coulter), USACD8-APC (clone B9.11, cat. IM2469, Beckman Coulter), USACD3-APC-Alexa Fluor 750 (clone UCHT1, cat. A94680), CD73-Pacific Blue (clone AD2, cat. 344012, BioLegend, Inc.) and CD45-Krome Orange (clone J33, cat. ABeckman Coulter, USAUSA96416, Beckman Coulter, USA). This set of monoclonal antibodies was used to stain 100 µl of peripheral blood in accordance with the manufacturer's recommendations. To identify the main Treg populations, as well as to analyze their expression of CD39 and CD73, an algorithm (gating strategy) was used, which was described in detail earlier [24].

Removal of red blood cells from samples was carried out following a no-wash procedure using a lysing solution Versa Lyse (cat. No. No A09777), to 975 ml of which 25 ml of IOtest 3 Fixative Solution was added *ex tempore* (Cat. No A07800). After the destruction of red blood cells, the samples were once washed off with an excess of saline solution at 330g for 7 minutes, after which the supernatant was removed, and the cell sediment was resuspended in a saline solution with a pH of 7.2-7.4 containing 2% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, USA). The samples were analyzed on the Navios<sup>TM</sup> cytometer (Beckman Coulter, USA), equipped with three 405, 488 and 638 nm diode lasers.

### Statistical analysis

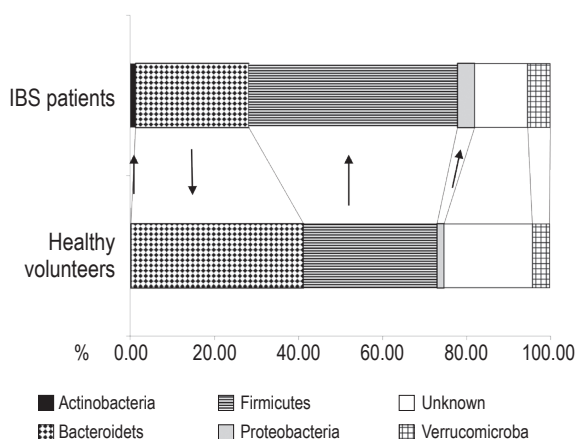
Comparative analysis was conducted using ANOVA with post hoc HSD test for unequal sample sizes in Program Statistica 8. Proportions were compared using the Yates correction. Spearman's correlation was used to define statistical relationships between the test parameters. Differences of  $p < 0.05$  were considered significant and reliable in all statistical analyses.

## Results

### Study of the features of the composition of the intestinal microbiocenosis

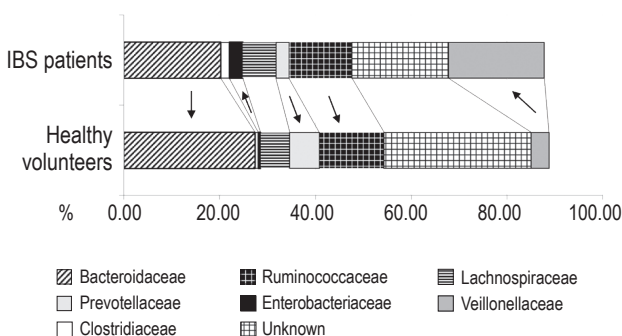
The analysis of the composition of the gastrointestinal microbiome in patients with IBS was carried out by comparing it with the microbiome of healthy volunteers with similar gender and age characteristics.

Metagenomic analysis showed that at the filum level there is an increase in the representation of *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. At the same time, a decrease in the *Bacteroidetes* population was noted (Figure 1).



**Figure 1. Features of the composition of the gut microbiota in IBS patients at the phylum level**

Note. The arrows indicate statistically significant differences in the representation of individual phyla. ↓ p, decrease; ↑, an increase compared to the group of healthy volunteers. The picture does not show values less than 1%.



**Figure 2. Features of the composition of the intestinal microbiota in IBS at the family level**

Note. The arrows indicate statistically significant differences in the representation of individual families. ↓, decrease; ↑, increase in comparison with the healthy volunteers group. The figure does not show values less than 1%.

An analysis of the representation of bacterial families present in the gut microbiota of healthy volunteers and IBS patients allowed to clarify the taxonomic features of the composition of the population. Thus, the phylum *Bacteroidetes* in healthy people was distinguished by a high content of *Bacteroides* and *Proteobacteria*. The representation of the families *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae* and *Veillonellaceae* in the intestine of patients with IBS was increased, together with a reduction in *Clostridiaceae*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae* and *Bacteroidaceae* (Figure 2, Table 2).

Analysis of the intestinal microbiome at the level of individual genera of bacteria revealed: a decrease in the representation of *Bacteroidetes* and *Faecalibacterium* spp. against the background of an increase in representatives of the genera *Dorea*, *Bifidobacterium*, *Desulfovibrio*, *Streptococcus* and *Dialister* (Table 2).

#### Analysis of subpopulation composition of peripheral blood T lymphocytes

##### Content of major populations of T lymphocytes of peripheral blood of IBS patients

The study of cluster differentiation of the main populations of T lymphocytes showed that peripheral blood samples obtained from IBS patients and healthy volunteers are not statistically different in terms of the absolute content of CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells (data not shown). The relative

content of regulatory T cells with the phenotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> also did not statistically differ between the groups (63 cells/μl (42–84) in patients with IBS and 57 cells/μl (44–73) in healthy volunteers (p = 0.658). The relative cell content of this population did not change within the general population of peripheral blood lymphocytes (3.09% (2.62–3.74) vs 3.38% (2.71–3.88) at the p = 0.213), and when analyzing the relative content of Tregs among CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T helpers 6.48% (5.86–7.80) vs 6.78% (6.05–8.34) at p = 0.335.

##### Analysis of subpopulation composition of regulatory T lymphocytes of peripheral blood of IBS patients by level of expression of CD45R0 and CD62L

In order to detect individual peripheral blood Treg subpopulations, the level of expression on the surface of cells of two antigens was evaluated: CD45R0 (short form of antigen CD45, indicating differentiation of T lymphocytes into central or effector memory cells) and CD62L (adhesion molecule allowing T lymphocytes to enter peripheral lymphoid organs through high endothelial venules) [24]. Based on this analysis three main populations of Treg were identified: naive or thymic cells with CD45R0<sup>–</sup>CD62L<sup>+</sup> phenotype and two populations of peripheral Treg – central and effector memory cells with CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> and CD45R0<sup>+</sup>CD62L<sup>–</sup> phenotypes, respectively. The analysis of the relative and absolute content of these cell populations is shown in Figure 3. Thus, there was

TABLE 2. REPRESENTATION OF STATISTICALLY SIGNIFICANT TAXA IN THE FAECES OF IBS PATIENTS AND HEALTHY VOLUNTEERS IN %

Taxons	Name of the taxons	Healthy volunteers	Patients with IBS	Changes as compared to the volunteers
Phylum	<i>Actinobacteria</i>	0.13	1.24	↑
	<i>Firmacutes</i>	31.71	49.69	↑
	<i>Proteobacteria</i>	1.68	4.02	↑
	<i>Bacteroidetes</i>	41.09	26.92	↓
Family	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.43	2.84	↑
	<i>Veillonellaceae</i>	3.74	20.0	↑
	<i>Clostridiaceae</i>	0.67	1.72	↓
	<i>Prevotellaceae</i>	6.19	2.71	↓
	<i>Ruminococcaceae</i>	13.52	13.16	↓
	<i>Bacteroidaceae</i>	27.44	20.24	↓
	<i>Streptococcaceae</i>	0.15	0.64	↑
Genus	<i>Faecalibacterium</i>	2.5	0.8	↓
	<i>Bacteroides</i>	39.1	21.2	↓
	<i>Dorea</i>	0.00085	0.00211	↑
	<i>Bifidobacterium</i>	0.00086	0.01475	↑
	<i>Desulfovibrio</i>	0.000291	0.002832	↑
	<i>Streptococcus</i>	0.00291	0.017398	↑
	<i>Dialister</i>	0.079716	0.11864	↑

a significant increase ( $p = 0.026$ ) in the proportion of Treg with phenotype  $CD45R0^+CD62L^+$  in IBS patients from 57.45% (49.57-60.15) to 63.24% (55.96-66.76), which was accompanied by a decrease in the level of  $CD45R0^+CD62L^-$  Treg in circulation ( $p < 0.001$ ), from 11.34% (9.15-14.77) to 6.88% (4.24-8.44).

**Analysis of the expression of effector molecules CD39 and CD73 by regulatory T lymphocytes of peripheral blood of IBS patients**

As a part of further studies of Treg phenotype in IBS patients the expression of two membrane-associated enzymes was analyzed: CD39 (or E-NTP Dase1, Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1) and CD73 (or Ecto5'NTase, ecto-5'-nucleotidase) with nucleotidase activity. It has been shown that in patients with IBS and in healthy volunteers there is not statistically significant difference in relative content of CD39 Treg (30.21% (8.49-47.02) and 40.10% (30.41-50.00), respectively, at  $p = 0.228$ ), respectively, and of CD73 Treg (4.46% (2.66-5.47) and 4.81% (3.53-6.01), respectively, at  $p = 0.220$ ).

However, in analyzing the expression of these surface molecules on various subpopulations of Treg of identified on the basis of  $CD45R0$  and  $CD62L$  coexpression, significant differences were found between the groups compared, which concerned naive or thymic  $CD45R0^+CD62L^+$  Treg (Figure 4). Thus, an almost twofold reduction in the content of  $CD39^+$  naive Treg and  $CD73$ -positive cells of this population in patients with IBS has been demonstrated: from 14.36% (6.34-18.78) to 6.25% (1.68-9.28,  $p < 0.001$ ) and from 5.44% (3.93-7.18) to 2.87% (0.88-3.98,  $p < 0.001$ ), respectively.

The summarized results obtained in the study of cluster differentiation of Treg lymphocytes are presented in the Table 3.

**Correlation between the indicators of cluster differentiation of lymphocytes and the representation of individual taxons of bacteria in IBS patients**

Spearman's correlation test used to analyze data for the the group of patients with IBS revealed a direct correlation ( $r = 0.483744$ ,  $p < 0.05$ ) between representatives of the *Dorea* spp. and  $CD45R0^+CD62L^+$  Treg lymphocytes of central memory (Figure 5).

A negative correlation was established between the representation of phylum *Proteobacteria*, genera *Faecalibacterium* and *Bifidobacterium*, and Treg lymphocytes of central memory, on which two or one of the following enzymes was expressed: diphosphohydrolase and nucleotidase ( $CD73^+$  and/or  $CD39^+$  molecules) (Figures 6-8).

## Discussion

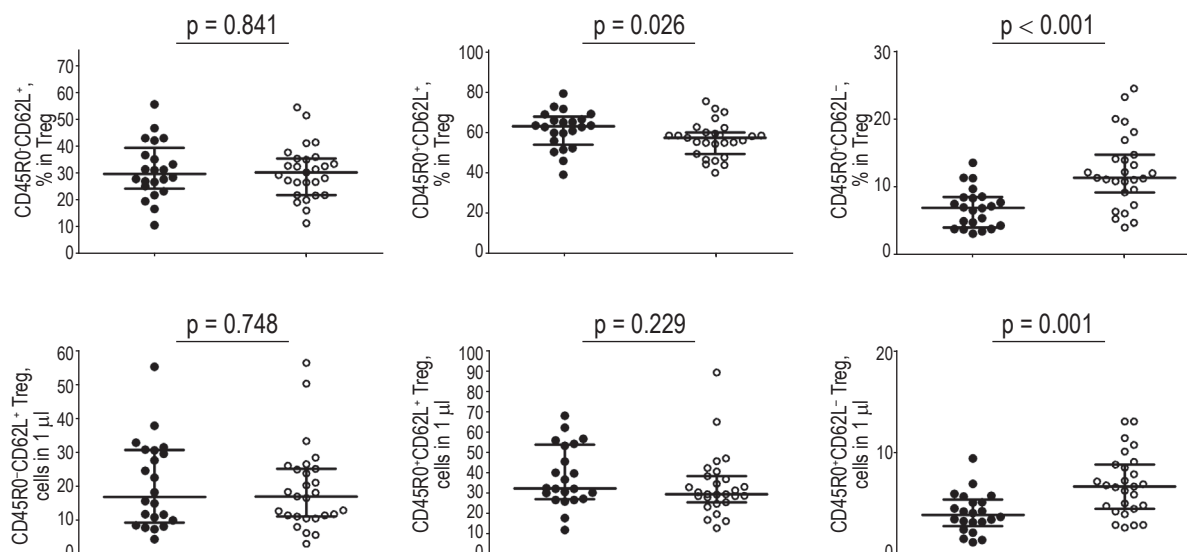
IBS is one of the most common human gastrointestinal diseases, at the same time it is difficult to diagnose since the intestinal pathology is closely associated with psycho-somatic disorders. For that reason it is extremely important to discover characteristic pathogenesis mechanisms and specific properties of innate immune cell differentiation. This work was used to trace the correlation between the expression of marker molecules on the surface of immunocompetent cells and changes in the composition of microbiocenosis. It is no secret that the microbiota of patients with IBS is subject to significant disbiotic changes, however, the available in the literature data on the structure of microbiota in patients with IBS are quite contradictory.

The increase of the *Proteobacteria* quantity, including the *Enterobacteriaceae* family, has previously been noted by many authors, [25, 26, 27, 28, 36]. This study showed that the growth of enterobacteriae population is accompanied by an increase in the content of *Deltaproteobacteria*, — *Desulfovibrio*, capable of partially neutralizing toxic and radioactive compounds as well as of causing superficial destruction of other bacteria [16, 35], as well as cause superficial destruction of other bacteria. In addition to the usual controlled shifts, an increase of bacteria belonging to the genera *Weilonella*, *Lahnospiria*, *Streptococcus*, *Bifidobacteria* and decrease of *Bacteroides* spp is present. Numerous studies of gut microbiota in IBS have noted an increase in some types of microorganisms with “pro-inflammatory” activity [24, 26], including representatives of the *Dorea*, *Ruminococcus* and *Clostridium* genera. It should be noted, that the presence of *Dorea* (a member of the *Lachnospiraceae* family) was closely associated with an increase in pro-inflammatory cytokine production.

**TABLE 3. REPRESENTATION OF STATISTICALLY SIGNIFICANT INDICATORS IN THE EVALUATION OF Treg SUBPOPULATIONS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH IBS AND HEALTHY VOLUNTEERS**

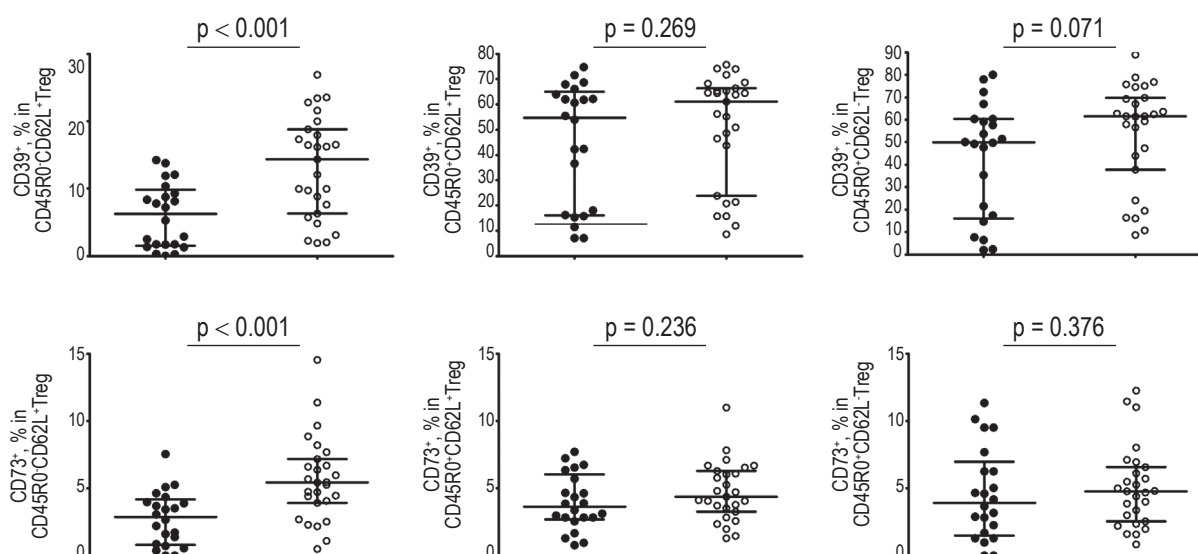
Indicator markers	Healthy volunteers	Patients with IBS	Change compared to healthy volunteers
$CD45R0^+CD62L^+$ , %	57.45*	63.24	↑
$CD45R0^+CD62L^-$ , %	11.34	6.88	↓
$CD45R0^+CD62L^+CD39^+$ , %	14.36	6.25	↓
$CD45R0^+CD62L^+CD73^+$ , %	5.44	2.78	↓

Note. \*, % from total amount of Treg.



**Figure 3. Changes in the subpopulation composition of peripheral blood regulatory T cells**

Note. The upper and lower rows of histograms (from left to right) are the relative and absolute contents of regulatory peripheral blood T lymphocytes with phenotypes CD45R0+CD62L+, CD45R0+CD62L- and CD45R0-CD62L-, respectively. Black, patients with IBS (n = 25); white, healthy volunteers (n = 30). The results are presented as median and interquartile range (Me (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>)). The nonparametric Mann-Whitney test was used to compare the samples.



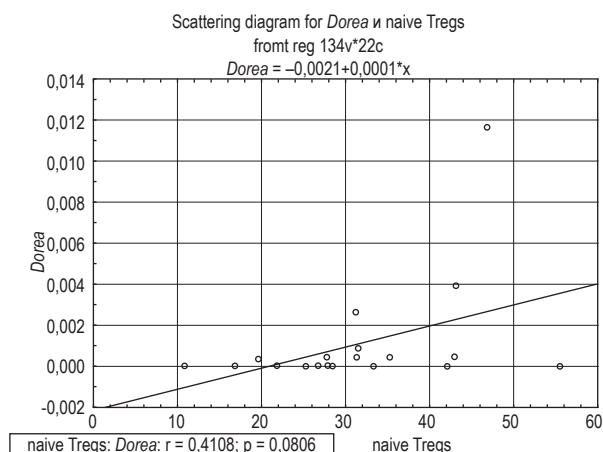
**Figure 4. Expression of CD39 and CD73 by various subpopulations of regulatory peripheral blood T cells in IBS patients**

Note. The upper row (from left to right) is the content of CD39+ cells relative to CD45R0+CD62L+, CD45R0+CD62L- and CD45R0-CD62L-Treg, respectively. The bottom row of histograms (from left to right) is the content of CD73+ cells relative to CD45R0+CD62L+, CD45R0+CD62L- and CD45R0-CD62L-Treg, respectively. Black, patients with IBS (n = 25); white, healthy volunteers (n = 30). The results are presented as median and interquartile range (Me (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>)). The nonparametric Mann-Whitney test was used to compare the samples.

The ability of these bacteria to metabolize sialic acids could be accompanied by increase of permeability and further development of inflammatory reactions in the intestine [31]. The ability of this kind of bacteria to form a significant compared to other representatives of the gut microbiota quantity of hydrogen and carbon

dioxide largely explains the symptoms of bloating and pain in the intestines characteristic of IBS [38].

It has been shown that the increase in streptococcus content led to stimulation of the production of pro-inflammatory cytokine IL-6 and the degradation of mucin [26], so the increase in the representation of



**Figure 5. Direct correlation ( $r = 0.483744$ ,  $p < 0.05$ ) between the content of naive Tregs (% of Treg) and the representation of *Dorea* spp. (%)**

Note. Naive or thymic cells (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>% relative to the total number of naive T helpers with phenotype CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>.

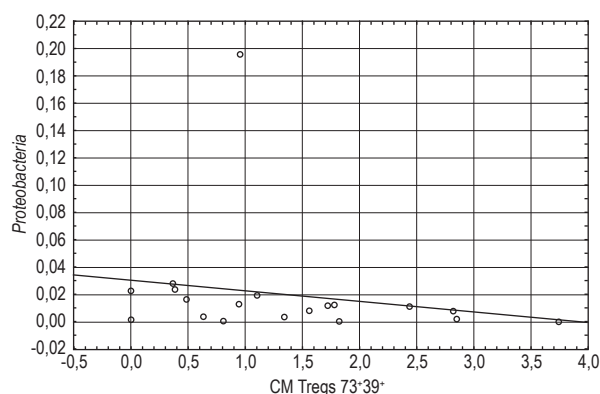
these bacteria in IBS patients, identified in this work, was predictable.

As in other reports on the composition of intestinal microbiota of patients with IBS a decrease in beneficial resident *F. prausnitzii* bacteria producing butyrate has been found in this work. Many authors associate the increase in these bacteria with a favorable prognosis for the progression and course of non-specific ulcerative colitis and Crohn's disease [2]. There is a correlation between the presence of *F. prausnitzii* (together with *Butyricococcus pullicaecorum* and other butyrate-producing bacteria) in the mammalian gastrointestinal tract and a decrease in TNF $\alpha$  and IL-8 levels, as well as an increase in production of IL-10 [6, 9, 22].

The excessive increase in bifidobacteria, as well as the increase in the representation of *Actinobacteria* was unexpected. However, these changes can be associated with the launch of a compensatory reaction of the organism to the formation of a low-grade inflammation site in the intestine of patients with IBS. Further studies may involve an analysis of species and strains of *Bifidobacterium* spp.

Treg play a leading role in regulating the functional activity of immune system cells in both peripheral lymphoid and in inflamed tissues [10]. The analysis of the relative and absolute content of Treg in the peripheral blood of IBS patients did not demonstrate any differences in these indicators when compared with the control group, which is fully consistent with the results given in the literary sources [12].

The analysis of our results, based on the study of the subpopulation composition of Treg, has identified a statistically significant increase in the population of CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CM cells, which can regulate the maturation and differentiation of lymphocytes in



**Figure 6. Correlation ( $r = -0.459851$ ,  $p < 0.05$ ) between the cluster differentiation indices of CD45RA-62L<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> lymphocytes (% relative to the total number of T helper cells) and *Proteobacteria* representation (%) in patients with IBS**

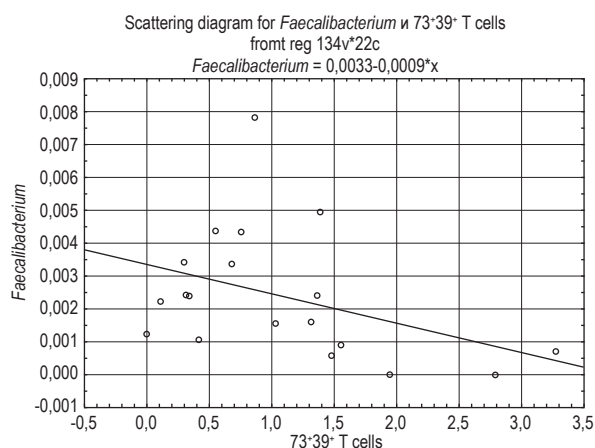
lymphoid tissue, including lymph nodes and Peyer's patches.

At the same time, we have noted a significant decrease in both the relative and absolute content of EM Tregs, the main function of which is believed to be regulating immune reactions occurring in peripheral tissues, including connective tissue of the intrastibial wall. A drop in the circulation of these cells may be related both to an increase of their migration to inflamed tissues and to abnormalities in the mechanisms of their differentiation in lymphoid organs related to a decrease in mature and Tregs capable of systematic migration to the periphery.

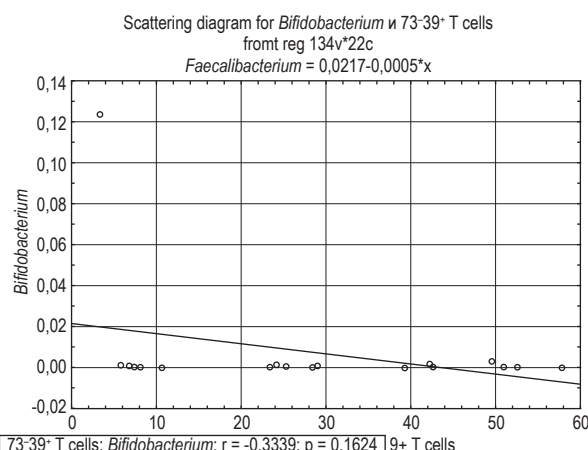
Moreover, sources indicate that the expression of homing molecules on CD4<sup>+</sup> lymphocytes in IBS increases, which are associated with an increase in CD levels of 62L and  $\alpha$ 4-7-integrin [23]. However, the changes described by the authors also seem to apply to Treg, as we have shown in the course of the study.

One of the most important mechanisms of suppression of inflammation, which is realized by Treg both in lymphoid tissue and in the site of inflammation, is the degradation of pro-inflammatory extracellular ATP to adenosine, which has a wide spectrum of anti-inflammatory action and acts on the effector cells of innate and acquired immunity [8]. When comparing CD39<sup>+</sup> and CD39-Treg *in vitro*, it was shown that the presence of CD39 is closely related to the high ability of these cells to show their suppressor properties due to the efficient expression of the transcription factor FoxP3, as well as the regulatory molecules CTLA4, GARP, and LAP [28].

In the course of our research we found a decrease in the density of CD39 and CD73 expression on the surface of "naive" Treg, which can significantly affect the functions performed by these cells. It



**Figure 7. Correlation ( $r = -0.460728$ ,  $p < 0.05$ ) between the indicators of cluster differentiation of lymphocytes CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> of T cells and representation of the genus *Faecalibacterium* in patients with IBS**



**Figure 8. Correlation ( $r = -0.456460$ ,  $p < 0.05$ ) between the indicators of cluster differentiation of lymphocytes CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> of T cells and the representation of *Bifidobacterium* (%) in patients with IBS**

should be especially noted that CD45R0-Treg, which have passed only the stage of antigen-independent differentiation in the thymus, is capable of recognizing only the body's own antigens and not the antigens of exogenous origin [30]. Apparently, this very population of cells plays a leading role in maintaining tolerance to autoantigens and prevents the development of autoimmune processes in the body. The results obtained may indicate abnormalities in the processes of Treg differentiation, which may lead to the disruption of peripheral tolerance in IBS.

The composition of the intestinal microbiota and the characteristics of cluster differentiation of subpopulations of T lymphocytes were evaluated in patients of IBS simultaneously. Therefore, the negative correlations between the decrease in CM lymphocytes functioning as suppressors of the inflammatory response and the increase in proteobacteria and the main producers of the genus *Dorea* spp. seems very significant and important.

On the other hand, the identified negative correlations between regulatory cell populations and bifidobacteria and fecal bacteria, which are usually correlated with positive changes in the state of intestinal microbiota are difficult to explain. It is possible that in the latter case there is a compensatory

reaction of the intestinal microbiota to the chronic inflammation developing in the gut.

The discovered tendency to trigger inflammatory reactions, noted earlier [18], and the discovered abnormalities in systematic and local regulation of immunological processes associated with intestinal dysbiosis create the preconditions for the possible development of an autoimmune pathology associated with an increase in the number of naive thymic lymphocytes and possible deficiencies of immunological tolerance to their own antigens and antigens to representatives of resident microbiota.

The results of the study suggest that changes in the level of individual microorganisms in the microbiota and the subpopulation composition of Treg cells are related, and the correction of the abnormal composition of microbiota of the intestine may represent a new strategy to change the immune status of patients with IBS. In addition, the identified patterns open up new diagnostic possibilities to determine the degree of progression of dysbiosis in IBS using flow cytometry. On the other hand, the identified new features of the microbiota of patients with IBS can also contribute to a more accurate diagnosis of the disease, opening up additional prospects for controlling its course.

## Список литературы / References

1. Akehurst R.L., Brazier J.E., Mathers N., O'Keefe C., Kaltenthaler E., Morgan A., Platts M., Walters S.J. Health-related quality of life and cost impact of irritable bowel syndrome in a UK primary care setting. *Pharmacoeconomics*, 2002, Vol. 20, no. 7, pp. 455-462.
2. Averina O.V., Ermolenko E.I., Ratushniy A.Yu., Tarasova E.A., Borschev Yu.Yu., Leontieva G.F., Kramskaya T.A., Kotyleva M.P., Danilenko V.N., Suvorov A.N. Effect of probiotics on the production of cytokines in the systems *in vitro*. *Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 443-454. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-443-454.
3. Belmer S.V. Immunological aspects of irritable bowel syndrome. *Physician*, 2016, no. 8, pp. 14-18.

4. Chong P.P., Chin V.K., Looi C.Y., Wong W.F., Madhavan P., Yong V.C. The Microbiome and irritable bowel syndrome – a review on the pathophysiology, current research and future therapy. *Front. Microbiol.*, 2019, Vol. 10, 1136. doi: 10.3389/fmicb.2019.01136.
5. Drossman D.A., Hasler W.L. Rome IV – Functional GI disorders: disorders of gut-brain interaction. *Gastroenterology*, 2016, Vol. 150, no. 6, pp. 1257-1261.
6. Eeckhaut V., Machiels K., Perrier C., Romero C., Maes S., Flahou B., Steppe M., Haesebrouck F., Sas B., Ducatelle R., Vermeire S., van Immerseel F. Butyricicoccus pullicaecorum in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2013, Vol. 62, no. 12, pp. 1745-1752.
7. Forshammar J., Isaksson S., Strid H., Stotzer P.O., Sjövall H., Simrén M., Ohman L. A pilot study of colonic B cell pattern in irritable bowel syndrome. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2008, Vol. 43, no. 12, pp. 1461-1466.
8. Golovkin A.S., Asadullina I.A., Kudryavtsev I.V. Purinergic regulation of basic physiological and pathological processes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 463-476. doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-463-476.
9. Gonsalkorale W.M., Perrey C., Pravica V., Whorwell P.J., Hutchinson I.V. Interleukin 10 genotypes in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component? *Gut*, 2003, Vol. 52, no. 1, pp. 91-93.
10. Grant C.R., Liberal R., Mieli-Vergani G., Vergani D., Longhi M.S. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and – yet – unanswered questions. *Autoimmun. Rev.*, 2015, Vol. 14, pp. 105-116.
11. Hod K., Ringel-Kulka T., Martin C.F., Maharshak N., Ringel Y. High-sensitive C-reactive protein as a marker for inflammation in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2016, Vol. 50, no. 3, pp. 227-232.
12. Holmén N., Isaksson S., Simrén M., Sjövall H., Ohman L. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol. Motil.*, 2007, Vol. 19, no. 2, pp. 119-125.
13. Ivashkin V.T., Maev I.V., Sheptulin A.A., Trukhmanov A.S., Alexeyeva O.P., Baranskaya E.K., Ivashkin K.V., Kalinin A.V., Korochanskaya N.V., Kucherya Y.A., Lapina T.L., Plotnikova E.Y., Poluektova E.A., Simanenkova V.I., Partova, A.V. Tkachev O.A., Shifrin O.S., Tarasova L.V., Khlynov I.B. Resolution of Advisory council “How to improve treatment results functional dyspepsia and irritable bowel syndrome”? *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2016, no. 2, pp. 101-104.
14. Kassinen A., Krogius-Kurikka L., Mäkiyuokko H., Rinttilä T., Paulin L., Corander J., Malinen E., Apajalahti J., Palva A. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology*, 2007, Vol. 133, no. 1, pp. 24-33.
15. Kim H.Y., Kim T.S., Kim B.H. Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide by *Desulfovibrio desulfuricans* M6. *Biotechnol. Lett.*, 1990, Vol. 12, no. 10, pp. 761-764.
16. Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology “Research of subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using pro-tread cytofluorimeters-analyzers” (Project). *Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
17. Kindt S., van Oudenhove L., Broekaert D., Kasran A., Ceuppens J.L., Bossuyt X., Fischler B., Tack J. Immune dysfunction in patients with functional gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol. Motil.*, 2009, Vol. 21, no. 4, pp. 389-398.
18. Kudryavtsev I.V., Ermolenko E.I., Solovyova O.I., Serebryakova M.K., Shumikhina I.A., Suvorov A.N. Subpopulation composition of t-lymphocytes in irritable bowel syndrome. *Experimental and Clinical Gastroenterology (Russia)*, 2019, no. 5, pp. 22-28.
19. Lovell R.M., Ford A.C. Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012, Vol. 10, no. 7, pp. 712-721.
20. Lucas K. Role of the Toll like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol. Neurobiol.*, 2013, Vol. 48, pp. 190-204.
21. Mazmanian S.K. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 2008, Vol. 453, pp. 620-625.
22. Miquel S., Martín R., Rossi O., Bermúdez-Humarán L., Chatel J., Sokol H., Thomas M., Wells J., Langella P. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2013, Vol. 16, no. 3, pp. 255-261.
23. Nasser Y., Petes C., Simmers C., Basso L., Altier C., Gee K., Vanner S.J.. Activation of peripheral blood CD4<sup>+</sup> T-cells in IBS is not associated with gastrointestinal or psychological symptoms. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, no. 1, 3710. doi: 10.1038/s41598-019-40124-5.
24. Nurkhametova D., Kudryavtsev I., Khayrutdinova O., Serebryakova M., Altunbaev R., Malm T., Giniatullin R. Purinergic profiling of regulatory T-cells in patients with episodic migraine. *Front. Cell. Neurosci.*, 2018, Vol. 12, 326. doi: 10.3389/fncel.2018.00326.
25. Pozuelo M., Panda S., Santiago A., Mendez S., Accarino A., Santos J., Guarner F., Azpiroz F., Manichanh C. Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 12693. doi: 10.1038/srep12693.
26. Rajilić-Stojanović M., Biagi E., Heilig H.G., Kajander K., Kekkonen R.A., Tims S., de Vos W.M. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 2011, Vol. 141, no. 5, pp. 1792-1801.
27. Rigsbee L., Agans R., Shankar V., Kenche H., Khamis H.J., Michail S., Paliy O. Quantitative profiling of gut microbiota of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 107, no. 11, pp. 1740-1751.

28. Rissiek A., Baumann I., Cuapio A., Mautner A., Kolster M., Arck P.C., Dodge-Khatami A., Mittrucker H.W., Koch-Nolte F., Haag F., Tolosa E. The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. *J. Autoimmun.*, 2015, Vol. 58, pp. 12-20.
29. Rodes L., Khan A., Paul A., Coussa-Charley M., Marinescu D., Tomaro-Duchesneau C., Shao W., Kahouli I., Prakash S. Effect of probiotics Lactobacillus and Bifidobacterium on gut-derived lipopolysaccharides and inflammatory cytokines: an *in vitro* study using a human colonic microbiota model. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, Vol. 23, pp. 518-526.
30. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C.M., Hafler D.A. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, pp. 490-500.
31. Schirmer M., Smeekens S.P., Vlamakis H., Jaeger M., Oosting M., Franzosa E.A., Ter Horst R., Jansen T., Jacobs L., Bonder M.J., Kurilshikov A., Fu J., Joosten L.A.B., Zhernakova A., Huttenhower C., Wijmenga C., Netea M.G., Xavier R.J. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. *Cell*, 2016, Vol. 167, no. 4, pp. 1125-1136.
32. Sitkin S.I., Tkachenko E.I., Vakhitov T.Ya. Metabolic bowel dysbiosis and its biomarkers. *Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2015, no. 12, pp. 6-29.
33. Smith P.M., Howitt M.R., Panikov N., Michaud M., Gallini C.A., Bohlooly-Y M., Glickman J.N., Garrett W.S. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 2013, Vol. 341, pp. 569-573.
34. Solovyova O.I., Simanenkova V.I., Suvorov A.N., Ermolenko E.I., Shumihina I.A., Svirido D.A. Use of probiotics and pre-probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *Experimental and Clinical Gastroenterology (Russia)*, 2017, no. 7, pp. 115-120.
35. Suzuki D., Ueki A., Amaishi A., Ueki K. Desulfovibrio portus sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium in the class Deltaproteobacteria isolated from an estuarine sediment. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2009, Vol. 55, no. 2, pp. 125-133.
36. Tana C., Umesaki Y., Imaoka A., Handa T., Kanazawa M., Fukudo S. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.*, 2010, Vol. 22, no. 5, pp. 512-519.
37. Tap J., Derrien M., Törnblom H., Brazeilles R., Cools-Portier S., Doré J., Störsrud S., le Névé B., Öhman L., Simré M. Identification of an intestinal microbiota signature associated with severity of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 2017, Vol. 152, pp. 111-123.
38. Taras D., Simmering R., Collins M.D., Lawson P.A., Blaut M. Reclassification of Eubacterium formicigenerans Holdeman and Moore 1974 as Dorea formicigenerans gen. nov., comb. nov., and description of Dorea longicatena sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, Vol. 52, Pt 2, pp. 423-428.

**Авторы:**

**Ермоленко Е.И.** — д.м.н., доцент, заведующая лабораторией биомедицинской микроэкологии отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; профессор кафедры физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

**Кудрявцев И.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Соловьева О.И.** — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней, клинической фармакологии и нефрологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Authors:**

**Ermolenko E.I.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Laboratory of Biomedical Microecology, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine; Professor, Department of Physiology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Kudryavtsev I.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Solovyova O.I.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases, Clinical Pharmacology and Nephrology, North-Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Карасева А.Б.** — научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Цапиева А.Н.** — научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Кондратенко Ю.Д.** — программист лаборатории «Центр алгоритмической биотехнологии», Институт трансляционной биомедицины ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

**Котылева М.П.** — научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Серебрякова М.К.** — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Шумихина И.А.** — старший лаборант кафедры внутренних болезней, клинической фармакологии и нефрологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Суворова А.Н.** — д.м.н., член-корр. РАН, заведующий отделом молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; заведующий кафедрой фундаментальных проблем медицины и медицинской технологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

**Karaseva A.B.**, Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Tsapieva A.N.**, Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Kondratenko Yu.D.**, Software Engineer, Center for Algorithmic Biotechnology, Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Kotyleva M.P.**, Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Serebryakova M.K.**, Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Shumikhina I.A.**, Senior Laboratory Assistant, Department of Internal Diseases, Clinical Pharmacology and Nephrology, North-Western State I. Mechnikov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Suvorov A.N.**, PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine; Head, Department of Fundamental Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 20.11.2019  
Принята к печати 11.12.2019

Received 20.11.2019  
Accepted 11.12.2019

## ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПА И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ ОТ КОЛИЧЕСТВА Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОЧКИ

Савченко А.А.<sup>1</sup>, Борисов А.Г.<sup>1</sup>, Кудрявцев И.В.<sup>2,3</sup>, Мошев А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Целью данного исследования явилось изучение зависимости фенотипа и активности респираторного взрыва моноцитов от количества Т-регуляторных клеток (Tregs) у больных с раком почки (РП). Больные с РП (Т3N0M0, светлоклеточный тип) были обследованы до хирургического лечения. Фенотип Tregs и моноцитов крови изучали методом проточной цитометрии. Исследование состояния респираторного взрыва моноцитов проводилось путем определения активности люцигенин- и люминол-зависимой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции. Установлено, что количество Tregs в крови больных с РП было увеличено относительно контрольных значений (у пациентов с РП —  $Me = 6,3\%$ ). Все обследованные пациенты были разделены на две группы в соответствии с медианой по Tregs (менее и более  $6,3\%$ ). Наиболее выраженные изменения в фенотипе моноцитов и их хемилюминесцентной активности были обнаружены у больных с РП с уровнем Tregs менее  $6,3\%$ . Только эта группа пациентов имела перераспределение в субпопуляционном составе моноцитов: уменьшение относительного количества классических моноцитов и увеличение относительного содержания неклассических (провоспалительных) моноцитов. Увеличение абсолютного количества общих моноцитов и уменьшение процентного содержания HLA-DR<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup> моноцитов было обнаружено у больных РП независимо от количества Tregs в крови. Изменения в фенотипе моноцитов у больных РП сопровождались изменением состояния их респираторного взрыва. Спонтанный синтез супероксид-радикала (первичная активная форма кислорода — АФК) моноцитами у больных РП с низким уровнем Tregs в крови характеризовался более коротким временем активации НАДФН-оксидазы и более высоким уровнем ее активности, чем у пациентов с высоким содержанием Tregs в крови. Индекс активации люцигенин-зависимой хемилюминесценции у больных РП был снижен, не зависел от количества Tregs в крови и определялся, по-видимому, недостаточностью метаболических резервов. Спонтанный синтез вторичных АФК в моноцитах у больных РП был снижен и не зависел от количества Tregs в крови. Индуцированный синтез вторичных АФК и индекс активации их синтеза в моноцитах были снижены только у больных РП с пониженным количеством Tregs в крови. В целом характеристики хемилюминесцентной реакции моноцитов у больных РП определяют наличие дисбаланса между синтезом первичного и вторичного АФК в моноцитах крови. Моноциты

### Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович  
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»  
197376, Россия, Санкт-Петербург,  
ул. Акад. Павлова, 12.  
Тел.: 8 (812) 234-16-69.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

### Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.  
Institute of Experimental Medicine  
197376, Russian Federation, St. Petersburg,  
Acad. Pavlov str., 12.  
Phone: 7 (812) 234-16-69.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

### Образец цитирования:

А.А. Савченко, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев, А.В. Мошев «Зависимость фенотипа и хемилюминесцентной активности моноцитов от количества Т-регуляторных клеток у больных раком почки» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 347-356. doi: 10.15789/1563-0625-DOP-1890  
© Савченко А.А. и соавт., 2020

### For citation:

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, I.V. Kudryavtsev, A.V. Moshev "Dependence of phenotype and chemiluminescent activity of monocytes on the T regulatory cells content in patients with kidney cancer", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 347-356. doi: 10.15789/1563-0625-DOP-1890  
DOI: 10.15789/1563-0625-DOP-1890

у больных РП с низким уровнем Tregs в крови характеризуются большей провоспалительной активностью благодаря быстрой активации и интенсивности синтеза первичных АФК.

*Ключевые слова:* моноциты, регуляторные Т-лимфоциты, рак почки, фенотип, хемилюминесцентная активность, респираторный взрыв

## DEPENDENCE OF PHENOTYPE AND CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF MONOCYTES ON THE T REGULATORY CELLS CONTENT IN PATIENTS WITH KIDNEY CANCER

Savchenko A.A.<sup>a</sup>, Borisov A.G.<sup>a</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>b, c</sup>, Moshev A.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The aim of this work was to reveal the interrelations between the number of T regulatory cells (Tregs) in patients with kidney cancer (KC) and phenotype of peripheral blood monocytes and their capacities to produce ROS. Patients with KC (T3N0M0, clear cell type) were examined prior to surgical treatment. Tregs phenotype and blood monocytes were identified by flow cytometry. ROS production of purified monocytes was carried out through the determination of lucigenin- and luminol-dependent spontaneous and zymosan-induced chemiluminescence activity. It has been found that the relative number of Tregs within total lymphocyte subset in KC patients was increased if compared to control values (in KC patients – Me = 6.3%). Then the patients were divided into two groups according to the median of Tregs number (less and more than 6.3%). The most pronounced changes in the phenotype of monocytes and their chemiluminescent activity were found in KC patients with the Tregs count of less than 6.3%. Our findings suggest that low frequency of Tregs in the periphery was associated with increased relative numbers of “intermediate” and “non-classical” (“pro-inflammatory”) monocytes as it was shown on the samples from patients with KC with a low level of Tregs. According to our data, both groups of KC patients had low levels of HLA-DR expression when comparing to control group. Furthermore, both groups of patients had decreased rates of HLA-DR and CD64 co-expressing cells. Changes in the phenotype of monocytes in patients with KC were closely linked with imbalance in ROS production. Thus, the monocytes spontaneous superoxide radical (primary ROS) synthesis in KC patients with a low Treg numbers were characterized by reduced NADPH-oxidase activation time and increased level of its activity if compared to patients with a high Treg rates in peripheral blood. Next, the activation index for lucigenin-dependent chemiluminescence in KC patients was reduced, as well as it was independent of circulating Tregs rates and was determined apparently by the insufficiency of metabolic reserves. Similarly, spontaneous secondary ROS production by the monocytes in KC patients was lower then in healthy controls and was also independent of circulating Tregs rates. Finally, the induced secondary ROS synthesis and activation index for their synthesis in monocytes were reduced only in patients with KC with a low number of Tregs in the blood. In general, the characteristics of the chemiluminescent reaction of monocytes in patients with KC determined the imbalance in peripheral blood monocytes primary and secondary ROS production. Monocytes in patients with KC with a low number of Tregs in the blood were characterized by more pro-inflammatory activity due to the rapid activation and intensity of the synthesis of primary ROS.

*Keywords:* monocytes, T regulatory cells, kidney cancer, phenotype, chemiluminescent activity, respiratory burst

The study was performed as part of the project “Mechanisms of metabolic reprogramming of the innate immune cells during tumor growth” was funded by Krasnoyarsk Regional Fund of Science.

### Introduction

Monocytes are innate immunity cells that play an important part in cancer development

and progression. During cancer, these cells were involved in systemic inflammatory reactions that develops with the progression of the tumor in an organism [8, 27]. The most recent study by Komala A.S. et al. (2018) have shown that the intensity of the inflammatory reactions as well as the number of circulating blood monocytes were increased during nasopharyngeal carcinoma progression [11]. Thus,

the inflammatory reaction was defined as one of the most important pro-tumoral factors. Accordingly, circulating monocytes and tumor-associated macrophages could perform functions that contribute to pro-tumoral activity. For example, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) was defined as one of the key factors stimulating the breast cancer development and progression [5]. MCP-1 stimulated up-regulated macrophages migration to the tumor microenvironment.

Next, monocytes were the key regulators of the immune reactions during tumor growth [15, 26]. The most important monocyte-derived immunoregulatory factors were the cytokines as well as reactive oxygen species (ROS) and nitrogen forms that modulated the functional activity of different immune cells [12, 25]. Furthermore, monocyte differentiation into tumor-associated macrophages and dendritic cells – subsets of antigen-presenting cells that were required for effective adaptive immune responses – also played an important part in cancer development and progression [10, 32, 39]. However, depending on the phenotype both macrophages and dendritic cells could take part in anti- and pro-tumorigenic processes.

Currently, monocytes are a heterogeneous population with phenotypical and functional differences. Thus, human circulating monocytes consisted at least of two subpopulations that could be identified based on surface expression of two molecules – CD14 and CD16. The cells expressing only the high affinity receptor for bacterial lipopolysaccharide and lipopolysaccharide-binding proteins (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) were defined as “classical” monocytes [23, 37]. This subset exhibited high phagocytosis rate but didn't take part in augmenting of inflammation. Next, monocytes expressing both CD14 and CD16 (the low-affinity receptor for IgG – FcγRIII) were termed as “non-classical” or “pro-inflammatory” [13, 19]. It was shown that the increased number of “non-classical” monocytes was strongly associated with several infectious and inflammatory diseases [4, 20]. Part of the difficulty in monocyte nomenclature arises from the fact that “classical” monocytes under the influence of regulatory factors could differentiate into “non-classical” ones [2, 21]. The heterogeneity of monocytes was also confirmed by the presence of cells with intermediate – CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> – phenotype, thus, they were defined as “intermediate” monocytes [21, 34]. Accordingly, different subsets of peripheral blood monocytes that penetrate the site of inflammation could acquire either macrophage or dendritic cell phenotypes with different functional activities.

In its turn, cancer cells were also able to edit immune system response via downregulation of antitumor activity [6, 22, 36]. This editing is carried

out through the receptor-ligand interactions as well as the synthesis of soluble factors production by tumor cells. Consistent with that evidence, not only the nearest microenvironment was edited but also the state of the immune system cells at the system level. Consequently, the phenotype and functional activity of blood monocytes was also changing with tumor progression. We have previously underlined that the number of circulating CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes were increased in patients with kidney cancer [29]. Furthermore, we demonstrated the imbalance in monocytes activation markers expression and the decrease in reactive oxygen species production within this leucocytes subset in these patients.

Finally, T regulatory cells (Tregs) are a separate fraction of CD4<sup>+</sup>T cells that are able to inhibit anti-tumor immune response, implied their involvement in tumor pathogenesis and disease progression. Tregs constitutively express the  $\alpha$ -chain of interleukin-2 receptor (CD25) and inhibit the T lymphocytes proliferation and cytokines production [24, 33].

**The aim of this study** was to analyze the dependence of the phenotype and the activity of the respiratory burst of monocytes on the number of Tregs in patients with kidney cancer (KC).

In the current study we report that peripheral blood monocytes phenotype as well as their ability to produce ROS was dependent on the number of Tregs in patients with KC.

## Materials and methods

### Study participants

Patients (n = 74, age – 40-60 years) with KC (T3N0M0, clear cell type) were examined prior to surgical treatment on the basis of the Krasnoyarsk Regional Oncology Center. The diagnosis of KC of all patients was verified histologically. Peripheral blood samples from 63 healthy volunteers with the same age range were used as a control group. All studies were performed with the informed consent of the patients and in accordance with the Helsinki Declaration of the World Association “Ethical principles of scientific medical research involving human” as amended in 2013 and “Rules of clinical practice in the Russian Federation” approved by the Order of the Ministry of Health of Russia of 19.06.2003 (No. 266).

### Flow cytometry

The phenotype of Treg and blood monocytes were studied by direct immunofluorescence using monoclonal antibodies (Beckman Coulter, USA) labeled with FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) in the following panels: CD62L-FITC/CD127-PE/CD3-ECD/CD25-PC5/CD4-PC7 and HLA-DR-FITC/CD14-PE/CD45-ECD/CD64-PC5/CD16-PC7. The distribution of

antibodies in fluorescence channels was carried out in accordance with the principles of panel formation for the multicolor cytofluorimetric investigations [14]. Sample preparation was performed according to the standard procedure [16]. Erythrocyte lysis was carried out by a washout-free technology using the reagent VersaLyse (Beckman Coulter, USA). The analysis of stained cells was performed on a flow cytometer Navios (Beckman Coulter, USA) of the Center of collective usage Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences". Not less than 50 000 lymphocytes or monocytes were analyzed in each sample.

#### Chemiluminescent activity

Blood monocytes were obtained by standard adhesion method from a suspension of mononuclear cells isolated from blood with heparin in a density gradient ficoll-urografin ( $\rho = 1.077$ ) [7]. The study of the state of respiratory burst of monocytes was carried out through the determination of the activity of lucigenin- and luminol-dependent spontaneous and zymosan-induced chemiluminescence [31]. The chemiluminescent activity was evaluated for 90 minutes on a 36-channel biochemiluminescence analyzer BLM-3607 (MedBioTech Ltd, Russia). The following characteristics of the chemiluminescent reaction were identified: time to maximum (Tmax), maximum intensity (Imax) and area under chemiluminescence curve (S). The enhancement of chemiluminescence induced by zymosan was evaluated by the ratio of the induced chemiluminescence area to the spontaneous

area and characterized as an activation index (Sind/Sspont).

#### Statistical analysis

Statistical description was performed by counting the median (Me) and the inter-quarter span in the form of 25 and 75 percentiles ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ ). Significance of differences between indicators was assessed by nonparametric criterion Mann-Whitney U test. Statistical analysis was performed in an application package Statistica 6.1 (StatSoft Inc.).

## Results

First, we found that the number of Tregs in the blood of the KC patients was increased relative to control values (in KC patients – Me = 6.3%,  $Q_{0.25} = 4.3\%$  and  $Q_{0.75} = 8.3\%$ ,  $p = 0.043$ ). Based on the relative number of Tregs within total lymphocytes subset, all patients were divided into two groups according to the median of Tregs number (less and more than 6.3%). Next, our findings demonstrated that the relative and absolute number of Tregs as well as activated Tregs in patients with low number of Tregs were reduced if compared with the control indicators (Table 1). Accordingly, an increase in the number of Tregs and activated Tregs in comparison with the control values was detected in patients with high level of Tregs. The absolute number of CD4<sup>+</sup>T lymphocytes in patients of this group was also increased if compared with patients with low levels of Tregs.

We further measured the relative numbers of main monocytes subsets with different patterns of CD14

TABLE 1. PERCENTAGE AND ABSOLUTE NUMBER OF T REGULATORY CELLS IN PATIENTS WITH KC, Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ )

Parameters	Control n = 32	Patients with KC	
		Treg < 6.3% n = 15	Treg > 6.3% n = 15
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /l	0.92 (0.56-1.16)	0.75 (0.52-0.90)	0.92 (0.68-1.11) $p_2 = 0.016$
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> CD25 <sup>high</sup> , %	5.5 (4.1-6.7)	4.4 (2.9-5.4) $p_1 = 0.002$	8.4 (7.0-10.4) $p_{1,2} < 0.001$
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> CD25 <sup>high</sup> , 10 <sup>9</sup> /l	0.100 (0.070-0.140)	0.073 (0.052-0.091) $p_1 < 0.001$	0.151 (0.119-0.202) $p_1 = 0.003$ $p_2 < 0.001$
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> CD25 <sup>high</sup> CD62L <sup>+</sup> , %	3.8 (2.9-4.9)	3.0 (1.8-3.7) $p_1 = 0.001$	5.8 (4.5-7.4) $p_{1,2} < 0.001$
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> CD25 <sup>high</sup> CD62L <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /l	0.071 (0.052-0.099)	0.045 (0.031-0.066) $p_1 < 0.001$	0.115 (0.067-0.147) $p_1 = 0.021$ $p_2 < 0.001$

Note.  $p_1$ , statistically significant differences with the control group;  $p_2$ , -/- between patients with high and low Treg.

**TABLE 2. FEATURES OF THE BLOOD MONOCYTE PHENOTYPE IN PATIENTS WITH KC IN DEPENDING ON THE NUMBER OF T REGULATORY CELLS, Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ )**

Parameters	Control n = 32	Patients with KC	
		Treg < 6.3% n = 15	Treg > 6.3% n = 15
Monocytes, 10 <sup>9</sup> /l	0.35 (0.18-0.51)	0.45 (0.35-0.64) $p_1 = 0.003$	0.52 (0.32-0.73) $p_1 < 0.001$
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>	62.7 (42.3-72.3)	34.7 (22.7-55.4) $p_1 = 0.014$	52.4 (21.7- 62.3)
CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> , %	34.4 (16.2-52.2)	54.3 (46.0-70.4) $p_1 = 0.043$	40.9 (32.7- 51.6)
CD14 <sup>low</sup> CD16 <sup>+</sup> , %	5.8 (4.1-11.1)	7.1 (4.7-10.1)	6.0 (2.3-11.2)
HLA-DR <sup>+</sup> , %	90.8 (84.5-95.8)	83.5 (75.6-88.2) $p_1 = 0.011$	74.9 (5.2-85.7) $p_1 = 0.004$
CD64 <sup>+</sup> , %	90.0 (82.9-93.6)	87.7 (78.6-94.5)	91.0 (87.3-94.9)
HLA-DR <sup>+</sup> CD64 <sup>+</sup> , %	90.3 (81.5-98.9)	70.7 (56.6-81.6) $p_1 < 0.001$	76.5 (63.3-87.8) $p_1 < 0.001$

Note. As for Table 1.

and CD16 expression and showed that the percentage of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes was decreased while CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> cells were increased in patients with a low number of Tregs compared to healthy control (Table 2). In addition, we analyzed the HLA-DR and CD64 expression within total monocyte subset. It was found out that in peripheral blood from both groups of KC patients the levels of HLA-DR-positive and HLA-DR<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup> were reduced if compared with control.

Additionally, the time to the maximum of the spontaneous lucigenin-dependent monocyte chemiluminescence was reduced in KC patients with a low number of Tregs in the blood in comparison with control values (Table 3). The maximum and area under the curve of this type of monocyte chemiluminescence in patients with KC in both groups were higher then in healthy subjects. However, the maximum of this chemiluminescence type with a high level of circulating Tregs was elevated less pronounced relative to control values than with a low number of them. Both groups of patients with KC exhibited decreased levels of the activation index of luminol-dependent chemiluminescence of monocytes if compared with the control group. Next, the maximum and area under the curve of spontaneous luminol-dependent chemiluminescence of monocytes in patients with KC were lower then in control values regardless the number of Tregs in circulation. Finally, KC patients with a low level of circulating Tregs exhibited low maximum and area under the curve of the zymosan-

induced luminol-dependent chemiluminescence of monocytes as well as an activation index for luminol.

## Discussion

The functional activity of monocytes is determined by their quantitative composition, phenotype and complex regulatory effects. Here, we describe for the first time that in patients with kidney cancer changes in Tregs frequency in circulation were closely linked with disturbances in monocytes subsets and their functional activity. The patients with a low number of Tregs had a quantitative redistribution between “classical” and “non-classical” monocytes: reducing the percentage of “classical” monocytes and increasing “non-classical”. The subset of “classical” monocytes consists of large cells with expressed phagocytic properties and high levels respiratory burst enzymes. They also characterized by an increased levels of cell-surface CD36, CD62L, CD64, CCR2 and low capacity of IL-1 and TNF $\alpha$  production [7, 23, 37]. “Non-classical” (or “pro-inflammatory”) monocytes were relatively small cells with decreased phagocytic activity and low reactive oxygen species production [13, 19, 21]. This type of cell expressed high levels of CD11c, HLA-DR, and CX3CR1, while the expression of CD62L and CD64 were low [4, 20, 34]. Thus, monocyte subsets in KC patients with low Tregs level in circulation exhibited pro-inflammatory alteration if compared with the patients showed the high level of Tregs. It

**TABLE 3. CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF THE MONOCYTES IN PATIENTS WITH KC IN DEPENDING ON THE NUMBER OF T REGULATORY CELLS, Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ )**

Parameters	Control n = 32	Patients with KC	
		Treg < 6.3% n = 15	Treg > 6.3% n = 15
Spontaneous lucigenin-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec.	2014 (1452-2604)	1421 (850-1892) p <sub>1</sub> = 0.045	2385 (943-2465)
Imax, r.u. × 10 <sup>3</sup>	0.67 (0.40-1.51)	8.49 (3.05-19.31) p <sub>1</sub> < 0.001	2.16 (0.94-4.38) p <sub>1</sub> = 0.045 p <sub>2</sub> = 0.019
S, r.u. × sec. × 10 <sup>6</sup>	2.83 (1.77-7.02)	27.69 (5.74-59.47) p <sub>1</sub> = 0.009	7.73 (3.58-12.51) p <sub>1</sub> = 0.008
Zymosan-induced lucigenin-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec.	1835 (1576-2842)	2930 (1755-3357)	2086 (255-2109)
Imax, r.u. × 10 <sup>3</sup>	2.89 (1.12-8.42)	3.77 (2.70-4.60)	2.86 (1.54-3.02)
S, r.u. × sec. × 10 <sup>6</sup>	15.24 (4.11-24.55)	15.50 (8.66-18.83)	7.26 (1.01-11.49)
Sind/Sspont	3.61 (1.65-8.03)	0.93 (0.27-1.90) p <sub>1</sub> = 0.012	1.21 (0.12-2.65) p <sub>1</sub> = 0.027
Spontaneous luminol-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec.	1810 (660-2575)	1489 (1167-2505)	1341 (151-1671)
Imax, r.u. × 10 <sup>3</sup>	6.29 (1.52-15.10)	2.51 (1.24-9.60) p <sub>1</sub> = 0.039	3.06 (1.68-4.86) p <sub>1</sub> = 0.044
S, r.u. × sec. × 10 <sup>6</sup>	24.79 (6.11-47.57)	8.88 (3.99-22.87) p <sub>1</sub> = 0.028	12.18 (5.17-17.45) p <sub>1</sub> = 0.039
Zymosan-induced luminol-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec.	1150 (973-1808)	1178 (555-2171)	1034 (677-1507)
Imax, r.u. × 10 <sup>3</sup>	11.60 (5.85-45.20)	3.10 (2.56-6.94) p <sub>1</sub> = 0.020	9.20 (2.11-22.67) p <sub>2</sub> = 0.042
S, r.u. × sec. × 10 <sup>6</sup>	41.49 (16.18-143.49)	8.35 (3.93-22.18) p <sub>1</sub> = 0.011	33.62 (15.49-80.07) p <sub>2</sub> = 0.035
Sind/Sspont	2.89 (1.72-3.80)	0.55 (0.33-3.45) p <sub>1</sub> = 0.017	1.67 (1.05-4.16) p <sub>2</sub> = 0.028

Note. sec., seconds; r.u., relative units;  $p_1$ , statistically significant differences with the control group;  $p_2$ , -/- between patients with high and low Treg.

is known that Tregs have suppressive activity during inflammation [9, 38]. Our findings suggest that low frequency of Tregs in the periphery was associated with increased relative numbers of “intermediate” and “non-classical” monocytes as it was shown on the samples from patients with KC with a low level of Tregs. These data also indicate the inability of Tregs to effectively suppress inflammation and inhibit antigen presentation as well as all other monocytes functions. However, the revealed imbalance in monocyte subsets in patients with a low level of Tregs and the absence of significant differences between healthy control and KC patients with high rates of Tregs did not lead to any peculiarities on HLA-DR expression by monocytes. The HLA-DR belongs to major histocompatibility class II complex and takes part in antigen presentation [17]. It has been shown that monocytes with low HLA-DR expression could not effectively respond to stimulating signals, as well as exhibited low antigen presentation capacity and decreased proinflammatory cytokines production [40]. According to our data, both groups of KC patients had low levels of HLA-DR expression when comparing to control group. Furthermore, both groups of patients had decreased rates of HLA-DR and CD64 co-expressing cells. It is known that CD64 consists of a signal peptide and 3 extracellular immunoglobulin domains of type C2 forming a glycoprotein which is a high affinity IgG receptor [1, 17]. Consequently, the functional activity of monocytes in patients with kidney cancer was reduced, yet this imbalance was not associated with the number of Tregs in peripheral blood.

Chemiluminescent activity of monocytes characterizes the state of their respiratory burst [3, 30]. We used two chemiluminescent indicators: lucigenin and luminol. The lucigenin luminescence appears only after superoxide radical – the primary ROS which is formed by membrane NADPH-oxidase (Nox) – generation [18, 30]. Luminol can penetrate through the cell membrane and reveals its luminescence properties after interaction with secondary ROS such as hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen, etc [30, 31]. The chemiluminescent curve is characterized by three parameters: time to attain the maximum (Tmax), the maximum intensity (Imax) and the area under the chemiluminescence curve (S). “Tmax” characterizes the time required for the maximum activation of ROS production including the period from the perception of a functional or regulatory signal to the maximum activity of enzymes of ROS synthesis (kinetic characteristic of the respiratory burst). “Imax” reflects the maximum level of ROS synthesis. While “S” integrally characterizes the level of ROS synthesis for 90 minutes of measuring chemiluminescence [30].

The special feature of lucigenin-dependent chemiluminescence of monocytes in KC patients with low Tregs count in the blood was the reduction of Tmax during spontaneous superoxide radical synthesis. Upregulation of spontaneous superoxide radical synthesis by monocytes was observed in both groups of patients with KC. However, the maximum intensity of primary ROS synthesis by monocytes was significantly higher in KC patients with low Treg numbers vs. KC patients with high level of Tregs. Next, zymosan-induced superoxide radical synthesis by monocytes in patients with KC corresponded to control indicators and didn’t differ within patients groups. At the same time, the lucigenin-dependent chemiluminescence activation index was decreased in patients with KC. The activation index characterizes the level of metabolic reserves that are necessary for ROS synthesis during the functional activation of cells [30]. Accordingly, monocytes metabolic reserve in patients with kidney cancer was lower than in healthy controls and was independent of circulating Tregs rates.

Finally, our findings on luminol-dependent chemiluminescence of monocytes made it possible to establish that the spontaneous secondary ROS production in patients with kidney cancer was reduced and independent on Treg numbers. Only kidney cancer patients with the decreased number of Tregs showed low levels of induced secondary ROS synthesis as well as a lower value of the activation index by luminol-dependent chemiluminescence.

In line with these findings, we propose that blood monocytes in patients with KC had an imbalance in the synthesis of primary and secondary ROS that were related with relative numbers of Tregs in peripheral blood. In summary, monocytes from KC exhibited an increased level of primary ROS synthesis, while monocytes secondary ROS production was decreased. Monocytes from kidney cancer patients with reduced Treg levels showed pro-inflammatory shift due accelerated activation and increased level of superoxide radical synthesis. At the same time, metabolic reserves for the induced ROS synthesis in monocytes were minimal in patients with KC with the low blood Treg counts. It should also be noted that in the literature there are publications not only about the effect of Tregs on inflammatory processes but also about the effect of ROS on the proliferation of Tregs [28, 35]. Thus, the relationship between ROS production and Tregs should be analyzed regarding their mutual regulation.

## Conclusion

We describe for the first time that the levels of monocyte subsets as well as the state of their respiratory explosion in KC patients was depended on the number of circulating Tregs. The most pronounced changes in

monocytes phenotype and their chemiluminescent activity were found in KC patients with the Tregs count of less than 6.3%. Only this group of patients had pronounced imbalance of monocyte subsets: a decrease in the relative number of "classical" monocytes and an increase in the relative content of "non-classical" (or "pro-inflammatory") monocytes. At the same time, an increase in the absolute number of total monocytes and a decrease in the percentages of HLA-DR<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup> monocytes were described for patients with KC in regardless of the Treg rates. It is assumed that the decrease in the effect of Tregs on monocytes in patients with KC could lead to a more pronounced participation of monocytes in inflammatory reactions that are realized during tumor progression. The imbalance of peripheral blood monocyte subsets in KC patients with a low number of Tregs as well as the migration of cells from the blood leads to a decrease in the number of monocytes expressing activation receptors. At the same time, the reduction of HLA-DR<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup> monocytes in patients with KC with a high Treg levels may have a regulatory nature and could be associated with a general inhibitory effect of tumor growth (which is implemented including through Tregs). Alterations in monocytes phenotype of in patients with KC were accompanied by shifts in their abilities to produce ROS. It has been found that monocyte spontaneous superoxide radical (primary ROS) synthesis in KC patients with a low number of Tregs was characterized

by diminishment of Nox activation time and increased level of its activity vs. the patients with a high Treg rates. Monocyte total spontaneous superoxide radical production in patients with KC was higher than in healthy people and was not linked with number of Tregs in peripheral blood. Next, in both groups of KC patients the activation index for lucigenin-dependent chemiluminescence was significantly lower then in healthy control, it didn't depend on the number of blood Tregs and was determined apparently by the insufficiency of metabolic reserves. Furthermore, monocyte spontaneous secondary ROS synthesis in patients with KC was reduced and also was not related with Tregs frequency in circulation. Interestingly, the induced secondary ROS synthesis and activation index of the current assay in monocytes were reduced only in patients with KC with a low number of Tregs. In general, the characteristics of the chemiluminescent reaction of monocytes in patients with KC determined the imbalance between the synthesis of primary and secondary ROS in blood monocytes. These findings suggest that monocytes in patients with KC with a low number of Tregs in the blood were characterized by more pro-inflammatory activity due to the rapid activation and intensity of the synthesis of primary ROS. A better understanding of how various tumor growth factors influence monocyte functions are promising in the development of new effective mechanisms for stimulating immune system antitumor activity in cancer patients.

## Список литературы / References

1. Akinrinmade O.A., Chetty S., Daramola A.K., Islam M.U., Thepen T., Barth S. CD64: an attractive immunotherapeutic target for m1-type macrophage mediated chronic inflammatory diseases. *Biomedicines*, 2017, Vol. 5, no. 3, pii: E56. doi: 10.3390/biomedicines5030056.
2. Bharat A., McQuattie-Pimentel A.C., Budinger G.R.S. Non-classical monocytes in tissue injury and cancer. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 63, pp. 106171-106172.
3. Biller J.D., Takahashi L.S. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2018, Vol. 90, no. 4, pp. 3403-3414.
4. Buscher K., Marcovecchio P., Hedrick C.C., Ley K. Patrolling mechanics of non-classical monocytes in vascular inflammation. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2017, Vol. 4, 80. doi: 10.3389/fcvm.2017.00080.
5. Cranford T.L., Velázquez K.T., Enos R.T., Bader J.E., Carson M.S., Chatzistamou I., Nagarkatti M., Murphy E.A. Loss of monocyte chemoattractant protein-1 expression delays mammary tumorigenesis and reduces localized inflammation in the C3(1)/SV40Tag triple negative breast cancer model. *Cancer Biol. Ther.*, 2017, Vol. 18, no. 2, pp. 85-93.
6. Fridman W.H. From cancer immune surveillance to cancer immunoediting: birth of modern immunoncology. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 201, no. 3, pp. 825-826.
7. Gordon S. Targeting a monocyte subset to reduce inflammation. *Circ. Res.*, 2012, Vol. 110, no. 12, pp. 1546-1548.
8. Jan H.C., Yang W.H., Ou C.H. Combination of the Preoperative systemic immune-inflammation index and monocyte-lymphocyte ratio as a novel prognostic factor in patients with upper-tract urothelial carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*, 2019, Vol. 26, no. 2, pp. 669-684.
9. Jones M.B., Alvarez C.A., Johnson J.L., Zhou J.Y., Morris N., Cobb B.A. CD45Rb-low effector T cells require IL-4 to induce IL-10 in FoxP3 Tregs and to protect mice from inflammation. *PLoS ONE*, 2019, Vol. 14, no. 5, e0216893. doi: 10.1371/journal.pone.0216893
10. Juhas U., Ryba-Stanisławowska M., Brandt-Varma A., Myśliwiec M., Myśliwska J. Monocytes of newly diagnosed juvenile DM1 patients are prone to differentiate into regulatory IL-10(+) M2 macrophages. *Immunol. Res.*, 2019, Vol. 67, no. 1, pp. 58-69.

11. Komala A.S., Rachman A. Association of peripheral monocyte count with soluble P-selectin and advanced stages in nasopharyngeal carcinoma. *Adv. Hematol.*, 2018, Vol. 2018, 3864398. doi: 10.1155/2018/3864398.
12. Komura T., Sakai Y., Harada K., Kawaguchi K., Takabatake H., Kitagawa H., Wada T., Honda M., Ohta T., Nakanuma Y., Kaneko S. Inflammatory features of pancreatic cancer highlighted by monocytes/macrophages and CD4<sup>+</sup> T cells with clinical impact. *Cancer Sci.*, 2015, Vol. 106, no. 6, pp. 672-686.
13. Kong B.S., Kim Y., Kim G.Y., Hyun J.W., Kim S.H., Jeong A., Kim H.J. Increased frequency of IL-6-producing non-classical monocytes in neuromyelitis optica spectrum disorder. *J. Neuroinflammation*, 2017, Vol. 14, no. 1, 191. doi: 10.1186/s12974-017-0961-z.
14. Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
15. Li X., Chen Y., Liu X., Zhang J., He X., Teng G., Yu D. Tim3/Gal9 interactions between T cells and monocytes result in an immunosuppressive feedback loop that inhibits Th1 responses in osteosarcoma patients. *Int. Immunopharmacol.*, 2017, Vol. 44, pp. 153-159.
16. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
17. Mahmoodpoor A., Paknezhad S., Shadvar K., Hamishehkar H., Movassaghpour A.A., Sanaie S., Ghamari A.A., Soleimanpour H. Flow cytometry of CD64, HLA-DR, CD25, and TLRs for diagnosis and prognosis of sepsis in critically ill patients admitted to the intensive care unit: a review article. *Anesth. Pain Med.*, 2018, Vol. 8, no. 6, e83128. doi: 10.5812/aapm.83128.
18. Moreau R., Périanin A., Arroyo V. Review of defective NADPH oxidase activity and myeloperoxidase release in neutrophils from patients with cirrhosis. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1044. doi: 10.3389/fimmu.2019.01044.
19. Mukherjee R., Kanti Barman P., Kumar Thatoi P., Tripathy R., Kumar Das B., Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 13886. doi: 10.1038/srep13886.
20. Naranjo-Gómez J.S., Castillo J.A., Rojas M., Restrepo B.N., Diaz F.J., Velilla P.A., Castaño D. Different phenotypes of non-classical monocytes associated with systemic inflammation, endothelial alteration and hepatic compromise in patients with dengue. *Immunology*, 2019, Vol. 156, no. 2, pp. 147-163.
21. Narasimhan P.B., Marcovecchio P., Hamers A.A.J., Hedrick C.C. Nonclassical monocytes in health and disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2019, Vol. 37, pp. 439-456.
22. O'Donnell J.S., Teng M.W.L., Smyth M.J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2019, Vol. 16, no. 3, pp. 151-167.
23. Pence B.D., Yarbro J.R. Classical monocytes maintain *ex vivo* glycolytic metabolism and early but not later inflammatory responses in older adults. *Immun. Ageing*, 2019, Vol. 16, 3. doi: 10.1186/s12979-019-0143-1.
24. Pohar J., Simon Q., Fillatreau S. Antigen-specificity in the thymic development and peripheral activity of CD4(+)FOXP3(+) T regulatory cells. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1701. doi: 10.3389/fimmu.2018.01701.
25. Ramello M.C., Tosello Boari J., Canale F.P., Mena H.A., Negrotto S., Gastman B., Gruppi A., Acosta Rodríguez E.V., Montes C.L. Tumor-induced senescent T cells promote the secretion of pro-inflammatory cytokines and angiogenic factors by human monocytes/macrophages through a mechanism that involves Tim-3 and CD40L. *Cell Death Dis.*, 2014, Vol. 5, e1507. doi: 10.1038/cddis.2014.451.
26. Romano E., Kusio-Kobialka M., Foukas P.G., Baumgaertner P., Meyer C., Ballabeni P., Michielin O., Weide B., Romero P., Speiser D.E. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells *ex vivo* by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 19, pp. 6140-6145.
27. Sabir F., Farooq R.K., Asim Ur. Rehman, Ahmed N. Monocyte as an emerging tool for targeted drug delivery: a review. *Curr. Pharm. Des.*, 2018, Vol. 24, no. 44, pp. 5296-5312.
28. Salminen A., Kauppinen A., Kaarniranta K. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): an important partner in cellular/tissue senescence. *Biogerontology*, 2018, Vol. 19, no. 5, pp. 325-339.
29. Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Moshev A.V., Kudryavtsev I.V., Tonacheva O.G., Koshcheev V.N. Monocytes subpopulations and chemiluminescent activity in patients with renal cell carcinoma. *Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 141-150. doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-141-150.
30. Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. Methods of estimation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 4, pp. 327-340. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340.
31. Savchenko A.A., Zdzitovetskii D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Chemiluminescent and enzyme activity of neutrophils in patients with widespread purulent peritonitis depending on the outcome of disease. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2014, Vol. 69, no. 5-6, pp. 23-28.
32. Schierer S., Ostalecki C., Zinser E., Lamprecht R., Plosnita B., Stich L., Dörrie J., Lutz M.B., Schuler G., Baur A.S. Extracellular vesicles from mature dendritic cells (DC) differentiate monocytes into immature DC. *Life Sci. Alliance*, 2018, Vol. 1, no. 6, e201800093. doi: 10.26508/lsa.201800093.
33. Shevach E.M. Foxp3(+) T Regulatory cells: still many unanswered questions – a perspective after 20 years of study. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1048. doi: 10.3389/fimmu.2018.01048.
34. Stansfield B.K., Ingram D.A. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin. Transl. Med.*, 2015, Vol. 4, 5. doi: 10.1186/s40169-014-0040-3.

35. van de Geer A., Cuadrado E., Slot M.C., van Bruggen R., Amsen D., Kuijpers T.W. Regulatory T cell features in chronic granulomatous disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2019, Vol. 197, no. 2, pp. 222-229.
36. Wagner M., Koyasu S. Cancer immunoediting by innate lymphoid cells. *Trends Immunol.*, 2019, Vol. 40, no. 5, pp. 415-430.
37. Wouters K., Gaens K., Bijnen M., Verboven K., Jocken J., Wetzels S., Wijnands E., Hansen D., van Greevenbroek M., Duijvestijn A., Biessen E.A., Blaak E.E., Stehouwer C.D., Schalkwijk C.G. Circulating classical monocytes are associated with CD11c(+) macrophages in human visceral adipose tissue. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 42665. doi: 10.1038/srep42665.
38. Yu C.X., Bai L.Y., Lin J.J., Li S.B., Chen J.Y., He W.J., Yu X.M., Cui X.P., Wang H.L., Chen Y.Z., Zhu L. rhPLD2 inhibits airway inflammation in an asthmatic murine model through induction of stable CD25(+) Foxp3(+) Tregs. *Mol. Immunol.*, 2018, Vol. 101, pp. 539-549.
39. Zarif J.C., Hernandez J.R., Verdone J.E., Campbell S.P., Drake C.G., Pienta K.J. A phased strategy to differentiate human CD14<sup>+</sup> monocytes into classically and alternatively activated macrophages and dendritic cells. *Biotechniques*, 2016, Vol. 61, no. 1, pp. 33-41.
40. Zhuang Y., Peng H., Chen Y., Zhou S., Chen Y. Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, 2017, Vol. 22, pp. 1344-1354.

---

**Авторы:**

**Савченко А.А.** — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

**Борисов А.Г.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

**Кудрявцев И.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Мошев А.В.** — младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

---

**Authors:**

**Savchenko A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Borisov A.G.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Kudryavtsev I.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Moshev A.V.**, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

---

Поступила 31.10.2019  
Принята к печати 20.11.2019

---

Received 31.10.2019  
Accepted 20.11.2019

# ИНТРАНАЗАЛЬНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ НА ОСНОВЕ M2e-ПЕПТИДА И ФРАГМЕНТА ВТОРОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСОВ ГРИППА А ИНДУЦИРУЕТ КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ И Т-КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ У МЫШЕЙ

Шуклина М.А., Степанова Л.А., Ковалева А.А., Коротков А.В., Шалджян А.А., Зайцева М.В., Елецкая Е.И., Цыбалова Л.М.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Создание вакцин с широким спектром защиты является одной из приоритетных задач в области профилактики гриппа. В последнее время интерес исследователей вызывают консервативные фрагменты белков вируса гриппа (M1, M2, NP, вторая субъединица гемагглютинаина HA2) как объект разработки рекомбинантных вакцин широкого спектра действия. Сложность в разработке вакцин на основе таких фрагментов заключается в их низкой иммуногенности. Однако присоединение слабоиммуногенных антигенов к белку-носителю позволяет значительно усилить их иммуногенность. Был разработан кандидатный вакцинный белок Flg-HA2-2-4M2e, содержащий два высококонсервативных вирусных антигена (эктодомен белка M2 – M2e и участок 76-130 второй субъединицы HA2), слитых с белком-носителем флагеллином. Флагеллин – белок жгутиков бактерий, является естественным лигандом Toll-подобного рецептора 5 (TLR-5) и обладает сильной адъювантной активностью при различных способах введения. Цель настоящего исследования состояла в оценке формирования гуморального и Т-клеточного иммунного ответа и широты протективного действия кандидатного вакцинного белка Flg-HA2-2-4M2e при введении мышам. Мышей иммунизировали трехкратно интраназально с двухнедельными интервалами. Через две недели после последней иммунизации животных заражали летальной дозой (5 LD<sub>50</sub>) вирусов, относящихся к обоим филогенетическим группам (A/California/07/09 (H1N1)pdm09 или A/Shanghai/2/2013 (H7N9)). Полученные результаты показали формирование выраженного M2e-специфического гуморального ответа (сывороточных IgG и IgA) у иммунизированных мышей. Иммунизация приводила также к формированию M2e- и вирус-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток в легких, которые продуцировали TNFα и IFNγ. Выявлено формирование антиген-специфических эффекторных и центральных Т-клеток памяти в легких мышей опытной группы. Формирование кросс-протективного защитного иммунитета у иммунизированных

## Адрес для переписки:

Шуклина Марина Александровна  
ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ  
195030, Россия, Санкт-Петербург, пр. Энтузиастов, 46, корп. 1, кв. 313.  
Тел.: 8 (812) 526-72-25.  
E-mail: ma.shuklina@yandex.ru

## Address for correspondence:

Shuklina Marina A.  
Smorodintsev Research Institute of Influenza,  
Ministry of Health of the Russian Federation  
195030, Russian Federation, St. Petersburg, Enthusiasts ave., 46, bldg 1, apt 313.  
Phone: 7 (812) 526-72-25.  
E-mail: ma.shuklina@yandex.ru

## Образец цитирования:

М.А. Шуклина, Л.А. Степанова, А.А. Ковалева, А.В. Коротков, А.А. Шалджян, М.В. Зайцева, Е.И. Елецкая, Л.М. Цыбалова «Интраназальная иммунизация рекомбинантным белком на основе M2e-пептида и фрагмента второй субъединицы гемагглютинаина вирусов гриппа А индуцирует кросс-протективный гуморальный и Т-клеточный ответ у мышей» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 357-370. doi: 10.15789/1563-0625-IIW-1584  
© Шуклина М.А. и соавт., 2020

## For citation:

M.A. Shuklina, L.A. Stepanova, A.A. Kovaleva, A.V. Korotkov, A.A. Shaldzhyan, M.V. Zaitseva, E.I. Eletsckaya, L.M. Tsybalova "Intranasal immunization with a recombinant protein based on the M2e peptide and second subunit of influenza A viral hemagglutinin fragment induces a cross-protective humoral and T cell response in mice", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 357-370.  
doi: 10.15789/1563-0625-IIW-1584  
DOI: 10.15789/1563-0625-IIW-1584

мышей было продемонстрировано на модели летальной гриппозной инфекции. Опытные животные были практически полностью защищены (90-100% выживаемость) от высокой дозы пандемического вируса A/H1N1pdm09 и высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H7N9. Второй задачей была оценка иммунного ответа на сублетальную инфекцию вирусом гриппа у иммунизированных животных. Мыши контрольной и опытной групп были инфицированы дозой MID<sub>100</sub> вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Было показано, что у иммунизированных мышей, по сравнению с контрольными, в ответ на сублетальное инфицирование изменился профиль иммунного ответа иммуноглобулинами — в 10 раз увеличилась доля IgG2a, более оптимальных в защите от инфекции. Полученные результаты показали, что рекомбинантный белок Flg-HA2-2-4M2e является перспективным кандидатом для разработки универсальной вакцины нового поколения, формирующий протективный гуморальный и Т-клеточный ответ на консервативные вирусные эпитопы и защищающий от вирусов гриппа А обеих филогенетических групп.

*Ключевые слова:* вирус гриппа, рекомбинантная вакцина, эктодомен белка M2, HA2, иммунный ответ, гемагглютинин

## INTRANASAL IMMUNIZATION WITH A RECOMBINANT PROTEIN BASED ON THE M2e PEPTIDE AND SECOND SUBUNIT OF INFLUENZA A VIRAL HEMAGGLUTININ FRAGMENT INDUCES A CROSS-PROTECTIVE HUMORAL AND T CELL RESPONSE IN MICE

Shuklina M.A., Stepanova L.A., Kovaleva A.A., Korotkov A.V., Shaldzhyan A.A., Zaitseva M.V., Eletskaia E.I., Tsybalova L.M.

*Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** Development of vaccines with a broad-spectrum of protection is one of the priorities in the programs of influenza prevention. Recently, the conserved fragments of influenza virus proteins (M1, M2, NP, the second subunit of the hemagglutinin HA2) provoke interest of investigators as the object of the development a broad-spectrum vaccines. Low immunogenicity present a problem when developing vaccines based on such conserved fragments. However, fusion of low immunogenic antigens into the high immunogenic carrier protein may significantly enhance their immunogenicity. The candidate vaccine protein Flg-HA2-2-4M2e was developed which contains two highly conserved viral antigens (the ectodomain of the M2 protein (M2e), 76-130 region of the second subunit of HA2), fused with flagellin as a carrier protein. Flagellin (bacterial flagella protein) is a natural ligand of TLR-5, and has a strong adjuvant activity at different ways of its administration. The purpose of this study was to assess development of humoral and T cell immune response, along with broad-spectrum protection after mice immunization with the candidate Flg-HA2-2-4M2e vaccine protein. Mice were immunized intranasally three times with two-week intervals. Two weeks after the final immunization, the mice were challenged at the 5 LD<sub>50</sub> dose with influenza viruses A/California/07/09 (H1N1) pdm09 (phylogenetic group I), or A/Shanghai/2/2013 (H7N9) (phylogenetic group II). The results obtained in this study showed induction of strong M2e-specific humoral response (serum IgG and A) in the immunized mice. Immunization with recombinant protein stimulated formation of M2e-specific and virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T cells in lung which produced TNFα or IFNγ. Production of antigen-specific effector and central memory T cells was also detected in lungs of immunized mice. The formation of cross-protective immunity in immunized mice was demonstrated in a model of lethal influenza infection. The experimental animals were almost completely protected from the high dose of the pandemic virus A/H1N1pdm09, and highly pathogenic avian influenza A/H7N9 (90-100% survival). We also evaluated the changes of antigen-specific immune response in immunized mice after sublethal infection with A/H3N2 influenza virus. Mice of control and experimental groups were infected with MID<sub>100</sub> of influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2). It was shown that the M2e-specific response (IgG, IgA) was significantly increased in immunized mice after sublethal infection with influenza virus A/H3N2, and we detected the changes in profile of M2e-specific IgG subclasses. Following sublethal infection

in immunized mice, the proportion of M2e-specific IgG2a was increased 10-fold. The results showed that the recombinant protein Flg-HA2-2-4M2e is a promising candidate for development of universal vaccines, which induces a protective humoral and T-cell response to conserved viral epitopes and protects against influenza A viruses of both phylogenetic groups.

*Keywords: influenza virus, recombinant vaccine, M2e ectodomain, HA2, immune response, hemagglutinin*

## Введение

Наиболее эффективным способом предупреждения гриппозной инфекции является вакцинопрофилактика. Эффективность применяемых в настоящее время гриппозных вакцин определяется способностью к формированию нейтрализующих антител к поверхностным гликопротеинам вируса гриппа: гемагглютинину (HA) и нейраминидазе (NA), которые обеспечивают полную защиту против инфекции штаммом вируса гриппа, аналогичным вакцинному. Однако варианты вирусов гриппа с мутациями в антигенных сайтах легко избегают нейтрализации существующими антителами хозяина, приводя к ежегодным вспышкам и эпидемиям гриппа. Несмотря на глобальный мониторинг антигенной изменчивости вирусов гриппа, проводимый Национальными центрами ВОЗ, нацеленный на выбор вакцинных штаммов, последние нередко не совпадают с циркулирующими штаммами, что снижает эпидемиологическую эффективность вакцинации традиционными живыми или инактивированными вакцинами. Двумя главными факторами, которые снижают ценность традиционных вакцин, являются необходимость ежегодного обновления вакцинных штаммов и длительный период, который требуется для наработки вакцин к эпидемическому сезону. В связи с этим создание вакцин с широким спектром защиты и коротким периодом производства является одной из приоритетных задач в области профилактики гриппа.

Консервативные белки вируса гриппа (M1, M2, NP, вторая субъединица гемагглютиниона HA2) вызывают интерес исследователей как объект разработки рекомбинантных вакцин, которые могут обеспечить иммунитет против широкого спектра вирусов гриппа типа А, в том числе пандемических.

На сегодняшний день разработан ряд кандидатных вакцин на основе эктодомена белка M2 (M2e) и показана их способность индуцировать выраженный M2e-специфический гуморальный ответ и обеспечивать защиту экспериментальных животных от заражения вирусами гриппа А [21, 26, 34, 37, 40]. Показана безопасность и иммуногенность таких вакцин у человека [34, 39, 41]. Другой перспективный целевой антиген для разработки вакцины — консервативные

участки второй субъединицы гемагглютиниона HA2. Был выделен ряд моноклональных антител (от мышей, человека), которые реагируют с эпитопами, локализованными в стеблевой части гемагглютиниона (HA2). Такие антитела являются кросс-реактивными и обладают нейтрализующим эффектом в пределах филогенетической группы [11, 42, 45]. Показано, что кандидатные вакцины на основе HA2 способны индуцировать гуморальный и Т-клеточный ответ у мышей и обеспечивать защиту от гомологичных и гетерологичных вирусов одной филогенетической группы [2, 5, 15, 36, 43]. Однако сами по себе консервативные участки вирусных белков являются слабоиммуногенными пептидами [14, 24, 25], что преодолевается использованием адъювантов [35, 46], высокоиммуногенных носителей [4, 10, 22, 23, 29, 31], увеличением числа копий пептида, слитого с носителем.

Одним из таких белков-носителей для слабоиммуногенных антигенов является белок жгутиков бактерий — флагеллин. Он является естественным лигандом Toll-подобного рецептора 5 (TLR-5). Флагеллин обладает сильной адъювантной активностью при различных способах введения (парентеральный, подкожный, мукозальный) [3, 20]. Способность флагеллина служить одновременно белком-носителем и адъювантом при разработке вакцин показана на различных моделях инфекционных заболеваний, включая грипп [21, 28].

**Цель настоящего исследования** состояла в оценке формирования гуморального и Т-клеточного иммунного ответа и широты протективного действия кандидатного вакцинного белка Flg-HA2-2-4M2e, содержащего два высококонсервативных вирусных антигена (M2e и HA2) при интраназальном введении мышам.

## Материалы и методы

### Рекомбинантный белок

Конструирование, экспрессия и очистка рекомбинантного белка Flg-HA2-2-4M2e были описаны нами ранее [38]. Был создан химерный ген, кодирующий гибридный белок Flg-HA2-2-4M2e. Схема рекомбинантного белка Flg-HA2-2-4M2e представлена на рисунке 1. Белок Flg-HA2-2-4M2e содержит последовательность флагеллина, к которой на С-конце присоединен фрагмент

второй субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа второй филогенетической группы, за которым следуют 4 копии M2e (M2h-M2s-M2h-M2s). Все фрагменты отделены друг от друга глицин-богатыми линкерами. Нуклеотидная последовательность, кодирующая гибридный белок Flg-HA2-2-4M2e, была клонирована в вектор pQE30 и экспрессирована в штамме *E. coli* DLT1270.

#### Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ)

SDS-ПААГ электрофорез в восстанавливающих условиях проводили по стандартной методике [27]. Электрофорез проводили при 12 мА до достижения фронта красителя (бромфенолового синего) нижнего края геля. Гель окрашивали в растворе Кумасси G-250 в течение ночи при качении. После окрашивания гель отмывали в бидистиллированной воде. Гель документировали при помощи системы ChemiDoc MP System (Bio-Rad, США).

#### Вестерн-блот

Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США). Затем мембрану блокировали в 3% растворе БСА (бычий сывороточный альбумин) в течение ночи при комнатной температуре. Белки определяли окрашиванием мембраны мышинными моноклональными антителами к белку M2 вируса гриппа А (14C2, ab5416: Abcam, Великобритания) в разведении 1:16000 и кроличьими поликлональными антителами к флагеллину (ab93713, Abcam, Великобритания) в разведении 1:8000. Мембрану инкубировали 1 ч при комнатной температуре с антителами, разведенными в PBS с 0,1% твин 20 (PBS-T) и 3% БСА, затем отмывали в PBS-T. Белок определяли окрашиванием мембраны в течение 1 ч при комнатной температуре козьими антимышиными или антикроличьими IgG, меченными пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания) в разведении 1:2000 и последующей инкубацией 5 мин в TMB (тетраметилбензидин) Immunoblot solution (Invitrogen, США).

#### Лабораторные животные

В исследовании были использованы линейные мыши (самки) Balb/c массой 16-18 г (возраст 6-8 недель), полученные из сертифицированного питомника Столбовая ГУ «Научный центр биоме-

дицинских технологий РАН». Животных содержали в виварии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России в соответствии с действующими правилами. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, изложенным в ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Протокол опыта был утвержден Комиссией по биоэтике ФГБУ «НИИ гриппа».

#### Иммунизация

Мышей иммунизировали интраназально (и/н) рекомбинантным белком в дозе 10 мкг/0,02 мл трехкратно с интервалом 2 недели. Иммунизацию проводили после ингаляционной анестезии смесью 2-3% изофлюран, 30% O<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>O. Контрольным мышам вводили и/н 0,02 мл PBS.

#### Получение сывороток крови

Образцы крови получали от пяти мышей каждой группы через 2 недели после третьей иммунизации, после эвтаназии в CO<sub>2</sub>-камере (VetTech Solutions, Великобритания). Для получения сыворотки кровь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С. После образования сгустков крови образцы помещали на поверхность льда и охлаждали в течение 1 ч с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 400 g. Аликвоты сыворотки крови (по 30 мкл) замораживали при температуре -20 °С.

#### Получение суспензии клеток легких

Мышечные легкие удаляли асептически и помещали в эппендорф со средой RPMI-1640, содержащей 0,5 мг/мл коллагеназы (Sigma, C2674) и 25 мкг/мл ДНКазы (Sigma, D4263). Легкие гомогенизировали с использованием TissueLyser II, помещали в термоблок (45 мин, 37 °С) и избавлялись от дебриса путем фильтрации (syringe filters с диаметром пор 70 мкм, BD Biosciences, США). Эритроциты лизировали АСК буфером (0,15M NH<sub>4</sub>Cl, 1,0M KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,2-7,4) и отмывали спленоциты полной средой RPMI-1640 с 10% ЭТС, 2 mM L-глутамина, 100 IU/ml пенициллина, 100 mg/ml стрептомицина. Концентрацию клеток доводили до 5 × 10<sup>6</sup> кл/мл.

#### Иммуноферментный анализ

Сыворотки исследовали в ИФА с использованием 96-луночных планшетов (Greiner, Германия). Титры антител определяли индивиду-

Flg-HA2-2-4M2ehs:



Рисунок 1. Схема рекомбинантного белка Flg-HA2-2-4M2e

Figure 1. Scheme of Flg-HA2-2-4M2e recombinant protein

ально у 5 мышей каждой группы. В качестве твердой фазы использовали синтетический пептид M2e (5 мкг/мл), синтезированный в «НПО Верта» (Санкт-Петербург), а также вирусы A/Shanghai/2/2013 (H7N9) и A/California/07/09 (H1N1) (2 мкг/мл). Использовали поликлональные овечьи антимышинные IgG, IgA (Abcam, Великобритания) меченые пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали ТМБ (тетраметилбензидин) (BD Bioscience) – инкубация 15 мин. Учет реакции проводили при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность, по крайней мере в 2 раза больше, чем бланк.

#### **Мультипараметрическая проточная цитометрия**

Мультипараметрическую проточную цитометрию выполняли в соответствии с протоколом BD Pharmingen™. Определяли способность исследуемого рекомбинантного белка индуцировать в легких образование специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокины. Клетки легких стимулировали (в течение 6 ч при 37 °С) 10 мкг пептида M2e (G-37) или 1 мкг вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в присутствии брэфелдина А (1 мкг/мл) (BD Bioscience, США). Клетки отмывали полной средой RPMI, Fc-рецепторы блокировали антителами CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, BD Pharmingen, США), затем инкубировали с Zombie Aqua (Zombie Aqua Fixable Viability Kit, Biolegend, США) для выявления живых клеток и окрашивали CD3a-FITC, CD4 PerCP, CD8-APC-Cy7, CD62L-PE-Cy7, CD44-APC (BD Pharmingen, США) при +2 – +8 °С в течение 30 мин. Затем клетки пермеабilizировали в соответствии с Протоколом тест-системы Cytofix/Cytoperm Plus (BD Bioscience, США) и окрашивали TNFα-BV421, IFNγ-PE (BD Pharmingen, США). Сбор данных (собирали 100 000 живых CD3<sup>+</sup> лимфоцитов) выполняли на проточном цитометре BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Данные анализировали в программном пакете Kaluza версия 1.5a (Beckman Coulter, США).

#### **Вирусы и заражение мышей**

На 14-й день после последней иммунизации мышей Balb/c (по 10 мышей в опытных и контрольных группах) заражали адаптированными к мышам вирусами гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 и A/Shanghai/2/2013 (H7N9) в дозе 5LD<sub>50</sub>, а также сублетальной дозой (MID100) вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Вирусы получены из Коллекции вирусов гриппа и ОРЗ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Вирус вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии. В качестве отрицательного контроля

в эксперименте использовали мышей, которым вводили PBS. После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными. Протективное действие рекомбинантных белков оценивали по динамике падения массы тела, выживаемости мышей после заражения. В течение этого периода времени ежедневно (в одно и то же время) регистрировали гибель животных в опытных и контрольных группах, измеряли массу тела животных.

#### **Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)**

Для постановки РТГА сыворотку, предварительно обработанную RDE и разведенную PBS, вносили в первый ряд 96-луночного микропланшета для иммунологических реакций с U-образными лунками. Далее готовили ряд последовательных двукратных разведений сыворотки на физиологическом растворе в объеме 50 мкл и добавляли по 50 мкл вируса в стандартной концентрации 4 ГАЕ/50 мкл. Планшет инкубировали 1 час при комнатной температуре, после чего во все лунки вносили по 100 мкл 0,5% взвеси эритроцитов. Через 30 минут проводили учет результатов реакции. Титр антигемагглютинирующих антител выражали как величину, обратную наибольшему заведению сыворотки, при котором наблюдалось торможение агглютинации.

#### **Статистическая обработка**

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism v. 6.0. Статистическую значимость различий титров антител и антиген-специфических Т-клеток оценивали с использованием t-критерия Стьюдента, при сравнении показателей выживаемости применяли критерий Мантеля–Кокса. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## **Результаты**

При разработке кандидатной вакцины широкого спектра действия против вирусов гриппа А в качестве таргетных антигенов были выбраны консервативные фрагменты M2 белка и HA2 вирусов гриппа А: консенсусная последовательность M2e-вирусов гриппа А человека (M2eh); M2e пандемического штамма A/California/07/09 H1N1pdm09 (M2es); консенсусная последовательность HA2 (76-130) вирусов гриппа А второй филогенетической группы (HA2-2) (табл. 1). Аминокислотная последовательность M2e пандемического вируса гриппа (M2es) A/California/07/09 H1N1pdm09 по сравнению с консенсусной последовательностью M2e-вирусов гриппа А человека (M2eh) отличается в 4 положениях 11, 13, 16 и 20 (табл. 1). Предполагалось, что введение в состав рекомбинантного белка двух различных по аминокислотному составу последовательностей M2e позволит расширить спектр защит-

ного действия кандидатной вакцины, включая высокопатогенные штаммы вирусов гриппа субтипа А/Н5N1, так как аминокислотная последовательность M2es имеет отличие от M2e-вируса гриппа А/Н5N1 лишь в одном положении (N13S). Фрагмент HA2-2 (ак76-130) представляет собой большую  $\alpha$ -спираль второй субъединицы HA, частично доступную с поверхности молекулы. Консенсусные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа филогенетической группы II (подтипы H3 и H7) в участке HA2 (76-130) идентичны на 63,6%. С учетом замен аминокислотных остатков на близкие по свойствам гомология составляет 80%. В таблице представлены также аминокислотные последовательности M2e и HA2 (76-130) вирусов гриппа А, использованных в данном исследовании.

Теоретически рассчитанная молекулярная масса белка составляла 73,9 кДа, что совпадало с величиной, определенной по электрофоретической подвижности белка в ПААГ. Очищенный белок Flg-HA2-2-4M2e взаимодействовал в вестерн-блот с моноклональными анти-M2 антителами (14C2) и поликлональными анти-flg антителами (рис. 2), что подтверждает его подлинность.

Иммуноферментный анализ сывороток крови мышей, иммунизированных вакцинным белком Flg-HA2-2-4M2e, показал значительный уровень анти-M2e IgG и IgA в сыворотке мышей после 3-й иммунизации (рис. 3А, Б). Также был показан прирост антивирусных IgG в сыворотках иммунизированных мышей к вирусам пер-

вой (А/Н1N1) и второй филогенетических групп (А/Н7N9) (рис. 3В).

В связи с тем, что таргетные антигены содержат CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеточные эпитопы [38], мы исследовали антиген-специфический CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеточный ответ на 14-й день после иммунизации.

Иммунизация рекомбинантным белком Flg-HA2-2-4M2e индуцировала образование M2e-специфических CD4<sup>+</sup>Т-клеток в легких мышей (0,154% по сравнению с контролем 0,03%), большинство из которых являлись монопродуктами TNF $\alpha$  (0,12%) (рис. 4А). Доля M2e-специфических CD4<sup>+</sup>Т-клеток, продуцирующих IFN $\gamma$ , была незначительна, и отмечалось почти полное отсутствие мультифункциональных клеток (TNF $\alpha$ <sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>). Среди M2e-специфических CD8<sup>+</sup>Т-клеток (0,11% по сравнению с контролем 0,03%) преобладали IFN $\gamma$ -продуцирующие клетки (0,062%) над продуцентами TNF $\alpha$  (0,028%) (рис. 4Б).

Интраназальная иммунизация мышей приводила к формированию значительного числа вирус-специфических (А/Aichi/2/68) CD4<sup>+</sup> в легких: 0,22% в опытной группе против 0,03% в контроле. При этом отмечалось доминирование клеток-продуцентов TNF $\alpha$  (0,15% по сравнению с клетками, продуцирующими IFN $\gamma$  0,064%) (рис. 4В). CD4<sup>+</sup> клетки, продуцирующие оба цитокина, практически не выявлялись. Аналогичные результаты были получены при характеристике вирус-специфических CD8<sup>+</sup>Т-клеток легких — 0,27% в опытной группе против 0,04% в контроле

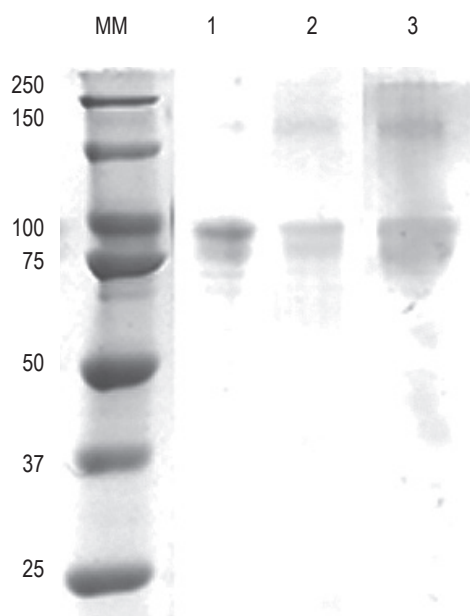
**ТАБЛИЦА 1. АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ КОНСЕРВАТИВНЫХ ФРАГМЕНТОВ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСОВ ГРИППА А: ЭКТОДОМЕН БЕЛКА M2 (2-24) (M2e) И HA2 (76-130)**

TABLE 1. AMINO ACID SEQUENCES OF CONSERVED FRAGMENTS OF SURFACE PROTEINS OF INFLUENZA A VIRUSES: THE ECTODOMAIN OF THE PROTEIN M2 (2-24) (M2e) AND HA2 (76-130)

Таргетный антиген Target antigen	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence
M2eh*	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
M2es**	SLLTEVETPIRSEWECRCSDSSD
M2e A/H5N1***	SLLTEVETPIRNEWECRCSDSSD
M2e A/H7N9•	SLLTEVETPIRTGWECNCSGSSE
HA2-2••	RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSMNKLFETRRLRENA
HA2-1 A/H1N1pdm***	RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKLNNA

Примечание. \* – консенсусная последовательность M2e вирусов гриппа А человека; \*\* – последовательность M2e вируса гриппа A/California/07/09 H1N1pdm09; \*\*\* – последовательность M2e вируса гриппа птиц подтипа А/Н5N1. • – последовательность M2e вируса гриппа подтипа А/Н7N9; •• – консенсусная последовательность фрагмента 76-130 второй субъединицы HA для вирусов гриппа второй филогенетической группы субтипов А/Н3N2 и А/Н7N9; \*\*\* – последовательность фрагмента 76-130 второй субъединицы HA для вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09.

Note. \*, M2e consensus sequence of human influenza A viruses; \*\*, M2e sequence of A/California/07/09 H1N1pdm09; \*\*\*, M2e sequence of A/H5N1 subtype. •, M2e sequence of A/H7N9 subtype; ••, HA2 (76-130) consensus fragment from phylogenetic group II influenza viruses subtype A/H3N2 and A/H7N9; \*\*\*, HA2 (76-130) fragment from A/California/07/09 (H1N1)pdm09 influenza virus.



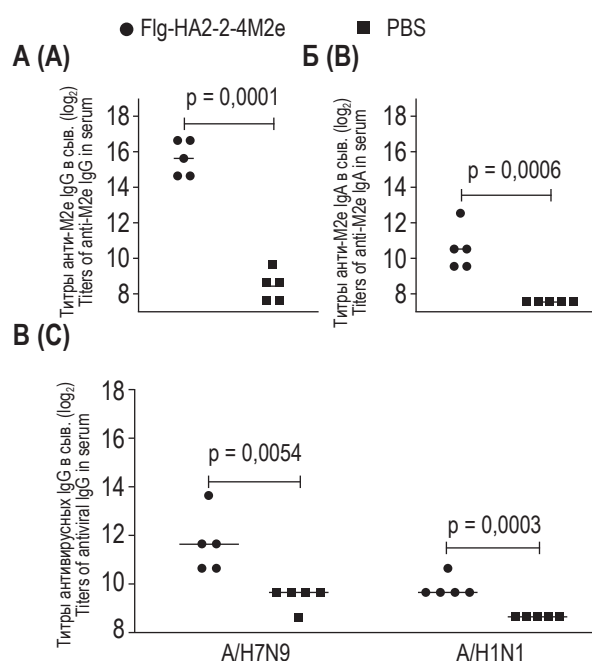
**Рисунок 2. Электрофореграмма и вестерн-блот рекомбинантного белка Flg-HA2-2-4M2e**  
Примечание. 1 – электрофорез белка Flg-HA2-2-4M2e, окрашивание Кумасси; 2 – вестерн-блот, окрашивание анти-flg антителами; 3 – вестерн-блот, окрашивание анти-M2 антителами.

Figure 2. Electrophoresis and western blot of recombinant protein Flg-HA2-2-4M2e

Note. 1, electrophoresis; 2, western blot with anti-flg antibodies; 3, western blot with anti-M2 antibodies.

(рис. 4Г). Показано формирование вирус-специфических продуцентов  $\text{TNF}\alpha$  (0,142%) и  $\text{IFN}\gamma$  (0,11%) при отсутствии двойных продуцентов.

Уровень специфических цитокин-продуцирующих эффекторных ( $\text{Tem}$ ,  $\text{CD44}^+\text{CD62L}^-$ ) и центральных ( $\text{Tcm}$ ,  $\text{CD44}^+\text{CD62L}^+$ )  $\text{CD4}^+$  и  $\text{CD8}^+$ -T-клеток памяти оценивали после стимуляции клеток легких M2e-пептидом и вирусом A/Aichi/2/68 (H3N2) (рис. 4Д, Е). После иммунизации мышей рекомбинантным белком Flg-HA2-2-4M2e выявлено значимое количество M2e-специфических цитокин-продуцирующих  $\text{CD4}^+\text{Tem}$  (0,3%) по сравнению с контрольной группой (0,07%) (рис. 4Д). Число M2e-специфических  $\text{CD4}^+\text{Tcm}$  и  $\text{CD8}^+\text{Tem}$  также возрастало среди иммунизированных мышей (0,08 и 0,15% соответственно) по сравнению с контрольной группой (в среднем 0,03%), хотя достоверно значимых различий не было обнаружено. Среди иммунизированных мышей выявлялось статистически значимое количество вирус-специфических  $\text{CD4}^+\text{Tem}$  (0,3%) по сравнению с контрольной группой (0,04%), а также вирус-специфических  $\text{CD8}^+\text{Tem}$  и  $\text{Tcm}$  (0,4 и 0,27%) (рис. 4Е). Уровень  $\text{CD4}^+\text{Tcm}$  также возрос



**Рисунок 3. Титры ( $\log_2$ ) специфических антител в сыворотках мышей после интраназальной иммунизации рекомбинантным белком Flg-H2-2-4M2e**

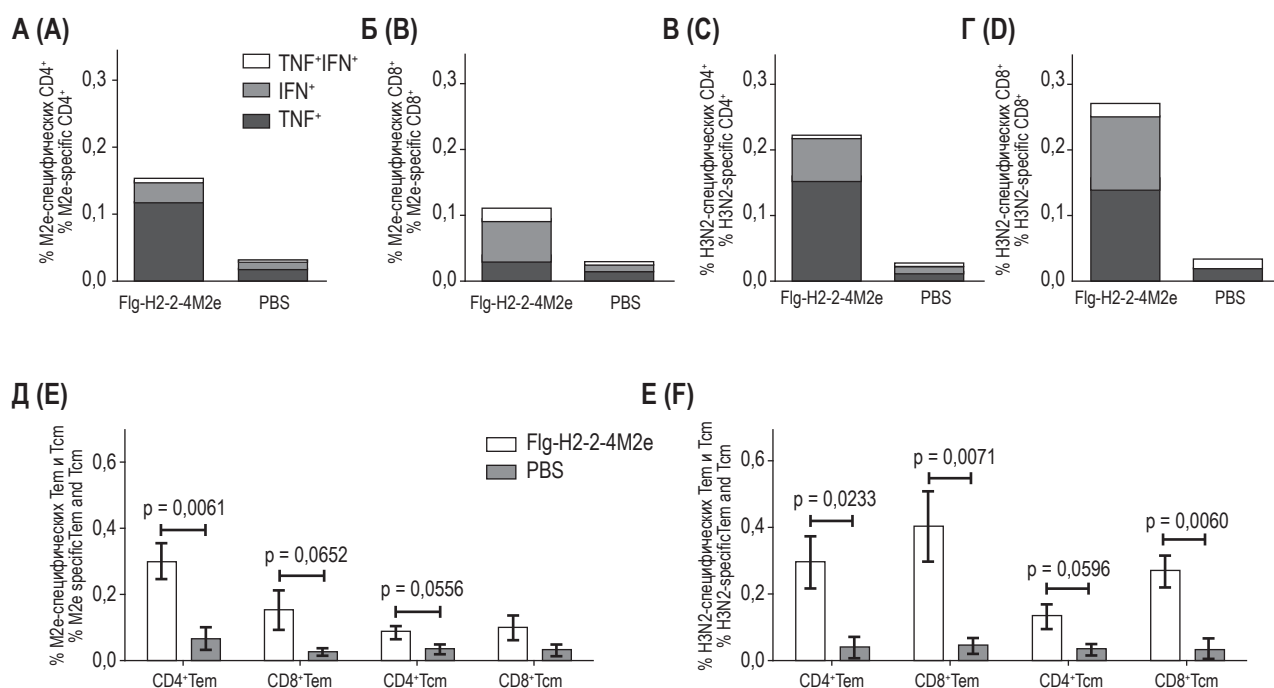
Примечание. А – титры анти-M2e IgG в сыворотке. Б – титры анти-M2e IgA в сыворотке. В – титры IgG в сыворотке к вирусам A/Shanghai/2/2013 (H7N9) и A/California/07/09 (H1N1) pdm09. Для расчета p-значений использован t-критерий Стьюдента.

Figure 3. Titers ( $\log_2$ ) of specific antibodies in serum after intranasal immunization

Note. A, titers of anti-M2e IgG in serum. B, titers of anti-M2e IgA in serum. C, titers of antiviral IgG in serum. To calculate the p-values used Student's t-test.

(0,13%) по сравнению с контрольной группой (0,03%).

Для оценки кросс-протективного эффекта рекомбинантного белка Flg-HA2-2-4M2e, через две недели после 3-й иммунизации, мышей заражали летальными дозами вирусов гриппа обеих филогенетических групп: A/California/07/09 (H1N1) pdm09 и A/Shanghai/2/2013 (H7N9) в дозе 5LD50. Как показано на рисунке 5А, мыши, иммунизированные рекомбинантным белком Flg-HA2-2-4M2, были практически полностью защищены от заражения вирусами гриппа разных филогенетических групп A/Shanghai/2/2013 (H7N9) (филогенетическая группа II) и A/California/07/09 (H1N1) pdm09 (филогенетическая группа I) (выживаемость составила 90-100%). Максимальная потеря массы тела иммунизированных мышей после заражения гетерологичным по гемагглютиниру вирусом гриппа A/H1N1 pdm09 составила 16%, а вирусом гриппа A/H7N9 – не более 10%,



**Рисунок 4. Специфический Т-клеточный ответ в легких после интраназальной иммунизации**

**Примечание.** Суммарный % M2e-специфических CD4+ (А) и CD8+ (Б) Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокины IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  или оба одновременно. Суммарный % H3N2-специфических цитокин-продуцирующих CD4+ (В) и CD8+ (Г) Т-лимфоцитов. Суммарный % цитокин-продуцирующих (IFN $\gamma$ +, TNF $\alpha$ +, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ +) M2e-специфических (Д) и H3N2-специфических (Е) эффекторных (Tem) и центральных (Tcm) CD4+ и CD8+ клеток памяти. Для расчета р-значений использован t-критерий Стьюдента.

Figure 4. Specific T-cell response in lung after intranasal immunization. Summary % of M2e-specific cytokine-producing CD4+ (A) and CD8+ (B)

Note. Summary % of H3N2-specific cytokine-producing CD4+ (C) and CD8+ (D). Summary % of M2e-specific (E) and H3N2-specific (F) cytokine-producing (IFN $\gamma$ +, TNF $\alpha$ +, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ +) CD4+ and CD8+ effector (Tem) and central (Tcm) memory T cells. To calculate the p-values used Student's t-test.

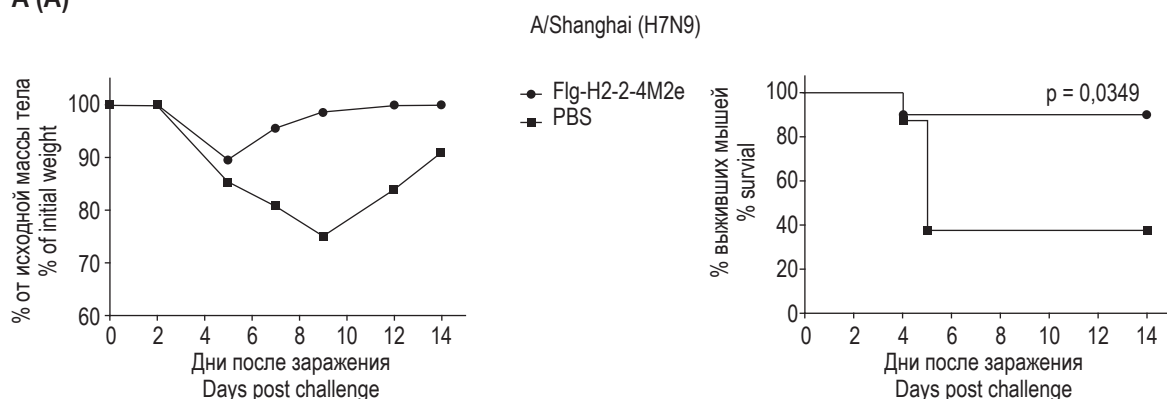
тогда как в контрольной группе потеря массы тела животных достигала 30% (рис. 5А, Б). Вместе с тем после заражения иммунизированных животных вирусом гриппа А/Н7N9, гомологичным по фрагменту НА2 (76-130) вакцинному компоненту, инфекция протекала с меньшей потерей массы тела и более ранним и быстрым ее восстановлением, чем при заражении вирусом А/California/07/09 (H1N1)pdm09, гетерологичным по НА2 вакцинному белку.

На 6-й день после заражения у 5 мышей обеих групп были взяты легкие на вирусывыделение. Иммунизация рекомбинантным белком достоверно снижала (в 3,2 раза) вирусные титры в легких при заражении вирусом гриппа А/Н7N9 (p = 0,0041). При заражении вирусом А/Н1N1pdm09 вирусные титры в легких опытных мышей снижались в меньшей степени (в 1,2 раза).

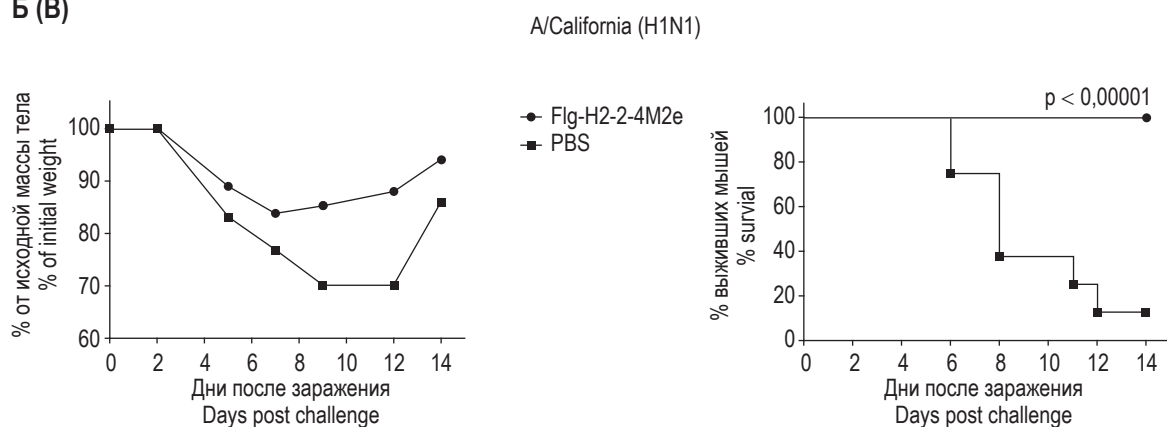
Для того чтобы оценить влияние последующей гриппозной инфекции на характер серологического ответа мышей опытной и контрольной

групп на 14 день после 3-й иммунизации заражали сублетальной дозой (MID100) вируса гриппа А/Aichi/2/68. В течение 14 дней после сублетального заражения потеря массы тела у мышей обеих групп была менее 10%. Кровь у мышей забирали до заражения и на 14-й день после заражения и оценивали динамику изменения уровня M2e-специфических IgG, IgA, подклассов IgG и титры антител в РТГА (рис. 6А, Б, В). Сублетальная инфекция стимулировала значительное увеличение титров M2e-специфических IgG (p = 0,0138) и IgA (p = 0,0006) (рис. 6А, Б). Наличие M2e-специфических антител у животных не влияло на формирование гемагглютинирующих антител. Так, титры антител в РТГА достоверно не отличались у мышей опытной и контрольной групп (рис. 6В). Кроме того, сублетальная инфекция изменяла соотношение IgG1/IgG2a у иммунизированных мышей. Если после иммунизации рекомбинантным белком Flg-H2-2-4M2e доля M2e-специфических IgG2a составляла всего 2,1%, то после сублетальной инфекции произо-

### А (А)



### Б (В)



### В (С)

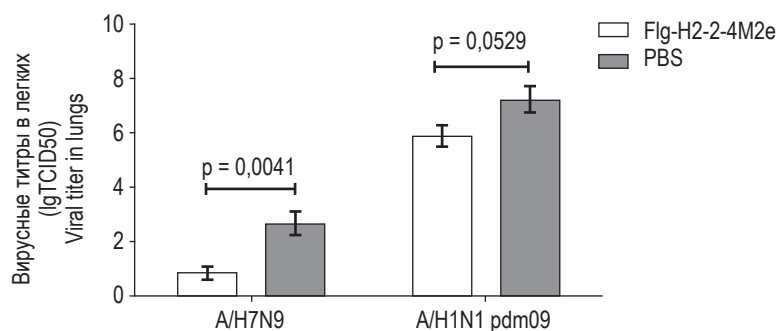


Рисунок 5. Динамика массы тела и выживаемость мышей после заражения вирусами A/Shanghai/2/2013 (H7N9) (А) и A/California/07/09 (H1N1)pdm09 (Б)

Примечание. Для расчета р-значений для данных выживаемости использован критерий Мантеля–Кокса. Вирусные титры в легких (В). Для расчета р-значений использован t-критерий Стьюдента.

Figure 5. Weight loss and survival after lethal challenge with viruses A/Shanghai/2/2013 (H7N9) (A) and A/California/07/09 (H1N1) pdm09 (B)

Note. To calculate the p value for survival rates used Mantel–Cox test. Viral titers in lungs (C). To calculate the p-values used Student's t-test.

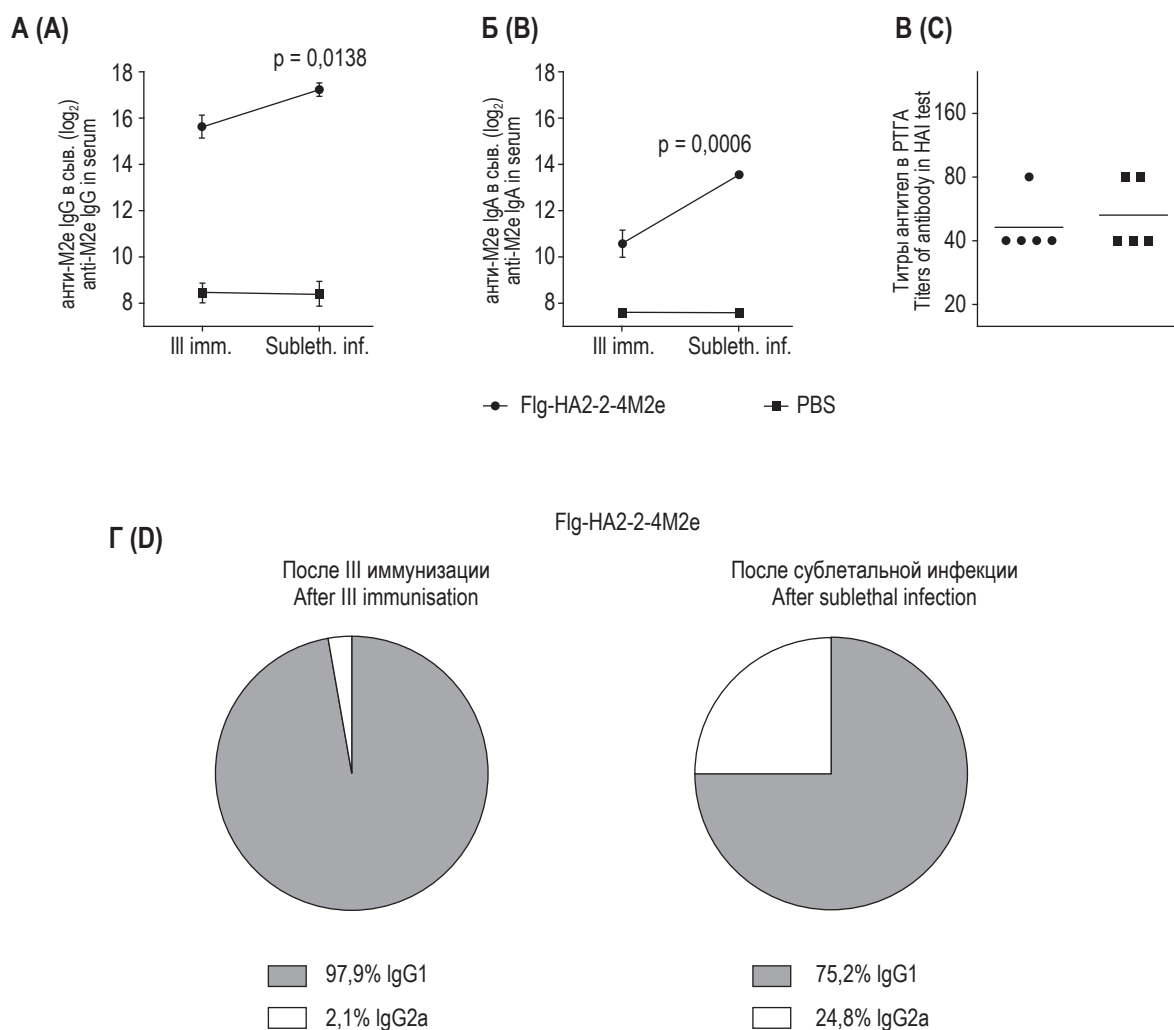
шел сдвиг в сторону увеличения доли этого под-класса до 24,8% (рис. 6Г).

## Обсуждение

Ряд исследователей показали, что включение нескольких консервативных эпитопов в реком-

бинантный белок ведет к усилению защитных свойств [2, 9, 16, 47].

В данной работе мы изучали формирование гуморального и Т-клеточного ответа к таргетным антигенам (M2e, HA2-2) рекомбинантного белка, а также динамику изменения уровня специфиче-



**Рисунок 6. Титры антител в сыворотке мышей после 3-й иммунизации и после сублетальной инфекции**

Примечание. А – средние значения титров (log<sub>2</sub>) анти-M2e IgG в сыворотке мышей после 3-й иммунизации (III imm.) и после сублетальной инфекции (Subleth. inf.). Б – средние значения титров анти-M2e IgA в сыворотке мышей после 3-й иммунизации (III imm.) и после сублетальной инфекции (Subleth. inf.). В – титры антител к A/Aichi/2/68 в РТГА после сублетальной инфекции. Г – соотношение подклассов IgG после 3-й иммунизации и после сублетальной инфекции. Для расчета р-значений использован t-критерий Стьюдента.

Figure 6. Titers of antibodies in serum after third immunization and after sublethal infection

Note. A, mean values of anti-M2e IgG titers in serum (log<sub>2</sub>) after third immunization (III imm.) and after sublethal infection (Subleth. inf.). B, mean values of anti-M2e IgA titers in serum (log<sub>2</sub>) after third immunization (III imm.) and after sublethal infection (Subleth. inf.). C, titers of antibodies in serum in HAI test. D, the ratio of IgG subclasses after the third immunization and after sublethal infection. To calculate the p-values used Student's t-test.

ских антител у иммунизированных животных после сублетальной гриппозной инфекции.

Рекомбинантный белок Flg-HA2-2-4M2e включает 4 копии M2e-пептида: 2 копии консенсусной последовательности M2e-вирусов гриппа А человека и 2 копии M2e пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Их последовательности отличаются друг от друга на 4 аминокислоты, включая одну (в положении 11), которая является критической для связывания антител [6]. Пред-

полагается, что введение в состав рекомбинантного белка двух различных по аминокислотному составу последовательностей M2e способствует расширению спектра защитного действия кандидатной вакцины.

Вторым таргетным антигеном рекомбинантного белка Flg-HA2-2-4M2e является консервативный участок HA2 (ак76-130) вирусов гриппа второй филогенетической группы (HA2-2) – консенсусная последовательность вирусов грип-

па А двух субтипов А/Н3N2 и А/Н7N9. Вирусы гриппа субтипа А/Н3N2 циркулируют в человеческой популяции с 1968г. и почти ежегодно вызывают эпидемии. Вирусы субтипа А/Н7N9 вызвали пять эпизоотий в Китае начиная с февраля 2013 года [44, 48] и считаются возможным генетическим донором для будущих пандемических вирусов.

Результаты оценки иммуногенности рекомбинантного белка при интраназальном введении мышам показывают формирование выраженного М2е-специфического гуморального ответа (сывороточных IgG и IgA), который значительно возрастает после сублетальной инфекции. Кроме того, иммунитет к таргетным антигенам (М2е и HA2-2) у мышей не оказывает влияния на выработку антител к гемагглюнину (по сравнению с контролем) после сублетального заражения.

М2е-иммунитет, как известно, обусловлен элиминацией инфицированных клеток с помощью механизма антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплемент-зависимым фагоцитозом, где ведущую роль играют естественные киллеры, альвеолярные макрофаги и дендритные клетки [12, 24]. Мышиные подклассы IgG2a/c обладают сильными эффекторными функциями и преимущественно участвуют в АЗКЦ благодаря их способности связываться со всеми тремя типами Fc-рецепторов (FcγRI, FcγRIII, FcγRIV) [32]. Сообщалось, что защита мышей, иммунизированных конструкциями на основе М2е коррелирует с высоким уровнем IgG2a [7, 30]. Тем не менее высокий уровень М2е-специфических IgG1 может компенсировать их низкую способность активировать эффекторные клетки [8]. Показано, что макрофаги фагоцитируют инфицированные вирусом гриппа клетки [14, 33], фагоцитоз IgG1-опсонизированных клеток макрофагами зависит от FcγRIII [18] и альвеолярные макрофаги играют ключевую роль в защите от гриппа в случае анти-М2е IgG1 [12].

Полученные нами результаты показывают, что интраназальная иммунизация белком Flg-HA2-2-4M2e приводит к превалированию анти-М2е подкласса IgG1. Однако после сублетального заражения у М2е-иммунных мышей происходит сдвиг в сторону увеличения доли анти-М2е подкласса IgG2a, что мы считаем положительным моментом, так как сбалансированное соотношение антиген-специфических подклассов IgG способствует более полной защите при последующем инфицировании.

Помимо специфического гуморального ответа, важную роль в защите от гриппа играет и Т-клеточный ответ. Известно, что выраженный вирус-специфический CD4<sup>+</sup>Т-клеточный ответ коррелирует с защитой у человека [13].

Исследования Т-клеточного ответа у мышей демонстрировали, что вирус-специфические CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>Т-клетки памяти достаточны для защиты против гетеросубтипического заражения [13, 19]. Важность CD8<sup>+</sup>Т-клеток в контроле за гриппозной инфекцией была показана на различных животных моделях [1, 19]. Комбинация не нейтрализующих антител с CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клетками может обеспечить полную защиту от летальной гриппозной инфекции, и кросс-протективные вакцины нового типа должны быть способны эффективно формировать не только антитела к консервативным антигенам, но и кросс-протективный Т-клеточный ответ.

Иммунизация рекомбинантным белком приводила к формированию М2е- и вирус-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-клеток в легких, которые продуцировали TNFα (преимущественно) и IFNγ (в меньшей степени). Кроме того, показано формирование антиген-специфических эффекторных и центральных Т-клеток памяти в легких иммунизированных мышей.

Таким образом, результаты по оценке иммуногенности рекомбинантного белка Flg-HA2-2-4M2e показывают формирование как антиген-специфического гуморального, так и Т-клеточного иммунного ответа. Для оценки кросс-протективного потенциала рекомбинантного белка мышей заражали высокими дозами вирусов гриппа, относящихся к разным филогенетическим группам (А/Н7N9 и А/Н1N1pdm09). Мыши, иммунизированные рекомбинантным белком Flg-HA2-2-4M2, были практически полностью защищены от заражения вирусами гриппа обеих филогенетических групп. Выраженный защитный эффект белка Flg-HA2-2-4M2е подтверждался также незначительным снижением массы тела, ее быстрым восстановлением и достоверным снижением репродукции вирусов в легких по сравнению с контрольными животными.

Полученные результаты показали, что рекомбинантный белок Flg-HA2-2-4M2е является перспективным кандидатом для разработки универсальной вакцины нового поколения, формирует протективный гуморальный и Т-клеточный ответ на консервативные вирусные эпитопы и защищает от вирусов гриппа А обеих филогенетических групп.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность Российскому научному фонду, при поддержке которого проводились данные исследования (Соглашение № 15-14-00043-П).

## Список литературы / References

1. Altenburg A.F., Rimmelzwaan G.F., de Vries R.D. Virus-specific T cells as correlate of (cross-) protective immunity against influenza. *Vaccine*, 2015, Vol. 33, pp. 500-506.
2. Ameghi A. Protective immunity against homologous and heterologous influenza virus lethal challenge by immunization with new recombinant chimeric HA2-M2e fusion protein in balb/c mice. *Viral Immunol.*, 2016, Vol. 29, pp. 228-234.
3. Bates J.T. Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice. *Mech. Ageing Dev.*, 2008, Vol. 129, pp. 271-281.
4. Bessa J., Schmitz N., Hinton H.J. Efficient induction of mucosal and systemic immune responses by virus-like particles administered intranasally: implications for vaccine design. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 1, pp. 114-126.
5. Bommakanti G. Design of an HA2-based *Escherichia coli* expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2010, Vol. 107, pp. 13701-13706.
6. Cho K.J., Schepens B., Seok J.H., Kim S., Roose K., Lee J.H. Structure of the extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus in complex with a protective monoclonal antibody. *J. Virol.*, 2015 Vol. 89, pp. 3700-3711.
7. Cunningham A.F., Khan M., Ball J., Toellner K.M., Serre K., Mohr E. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on *Salmonella* are Th1. *Eur. J. Immunol.*, 2004, Vol. 34, pp. 2986-2995.
8. Delaney K.N., Phipps J.P., Johnson J.B., Mizel S.B. A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice. *Viral Immunol.*, 2010, Vol. 23, pp. 201-210.
9. Deng L., Kim J.R., Chang T.Z., Zhang H., Mohan T., Champion J.A., Wang B-Z. Protein nanoparticle vaccine based on flagellin carrier fused to influenza conserved epitopes confers full protection against influenza A virus challenge. *Virology*, 2017, Vol. 509, pp. 82-89.
10. Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 27-28, pp. 3395-3403.
11. Ekiert D.C. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science*, 2011, Vol. 333, pp. 843-850.
12. el Bakkouri K., Descamps F., de Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, pp. 1022-1031.
13. Eliasson D.G., Omokanye A., SchoEn K. M2e tetramer-specific memory CD4 T cells are broadly protective against influenza infection. *Mucosal Immunol.*, 2017, Vol. 11, pp. 273-289.
14. Feng J. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virol. J.*, 2006, Vol. 3, p. 102.
15. Gong X. Conserved stem fragment from H3 influenza hemagglutinin elicits cross-clade neutralizing antibodies through stalk-targeted blocking of conformational change during membrane fusion. *Immunol. Lett.*, 2016, Vol. 172, pp. 11-20.
16. Guo Y., He L., Song N., Li P., Sun S., Zhao G., Tai W., Jiang S., Du L., Zhou Y. Highly conserved M2e and hemagglutinin epitope-based recombinant proteins induce protection against influenza virus infection. *Microbes Infect.*, 2017, Vol. 19, pp. 641-647.
17. Hashimoto Y., Moki T., Takizawa T., Shiratsuchi A., Nakanishi Y. Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, pp. 2448-2457.
18. Hazenbos W.L., Gessner J.E., Hofhuis F.M. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity*, 1996, Vol. 5, pp. 181-188.
19. Hillaire M.L., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, Vol. 2011, 939860. doi: 10.1155/2011/939860.
20. Honko A.N. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.*, 2006, Vol. 74, pp. 1113-1120.
21. Huleatt J.W. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, pp. 201-214.
22. Ingrole R.S., Tao W., Tripathy J.N., Gill H.S. Synthesis and Immunogenicity assessment of elastin-like polypeptide-M2e construct as an influenza antigen. *Nano LIFE*, 2014, Vol. 4, no. 2, 1450004. doi: 10.1142/s1793984414500044.
23. Ionescu R.M., Przysiecki C.T., Liang X. Pharmaceutical and immunological evaluation of human papillomavirus viruslike particle as an antigen carrier. *J. Pharm. Sci.*, 2006, Vol. 95, no. 1, pp. 70-79.
24. Jegerlehner A. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, pp. 5598-5605.

25. Khanna M. Protective immunity based on the conserved hemagglutinin stalk domain and its prospects for universal influenza vaccine development. *BioMed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 546274. doi: 10.1155/2014/546274.
26. Kim M.-C. Virus-like particles containing multiple M2 extracellular domains confer improved cross-protection against various subtypes of influenza virus. *Mol. Ther.*, 2013, Vol. 21, pp. 485-492.
27. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, Vol. 227, pp. 680-685.
28. Liu G. Flagellin-HA vaccines protect ferrets and mice against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) infections. *Vaccine*, 2012, Vol. 30, pp. 6833-6838.
29. Liu W., Peng Z., Liu Z. High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity. *Vaccine*, 2004, Vol. 23, no. 3, pp. 366-371.
30. Mozdzanovska K., Zharikova D., Cudic M., Otvos L., Gerhard W. Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered by a synthetic matrix protein 2-based influenza A virus vaccine in the mouse. *Virol. J.*, 2007, Vol. 4, p. 118.
31. Neirynck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat. Med.*, 1999, Vol. 5, no. 10, pp. 1157-1163.
32. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Divergent immunoglobulin G subclasses activity through selective Fc receptor binding. *Science*, 2005, Vol. 310, pp. 1510-1512.
33. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Fc-gamma receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 2006, Vol. 24, pp. 19-28.
34. Schotsaert M. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert. Rev. Vaccines.*, 2009, Vol. 8, pp. 499-508.
35. Slepishkin V.A., Katz J.M., Black R.A. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine*, 1995, Vol. 13, no. 15, pp. 1399-1402.
36. Stepanova L.A. A fusion protein based on the second subunit of hemagglutinin of influenza A/H2N2 viruses provides cross immunity. *Acta Naturae*, 2016, Vol. 8, pp. 116-126.
37. Stepanova L.A. Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, e0119520. doi: 10.1371/journal.pone.0119520.
38. Stepanova L.A., Mardanova E.S., Shuklina M.A. Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses a subtypes. *J. Biomed. Sci.*, 2018, Vol. 25, no. 1, p. 33.
39. Taylor D.N. Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI). *Vaccine*, 2011, Vol. 29, pp. 4897-4902.
40. Tsybalova L.M. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: Broad protective efficacy of particles carrying four copies of M2e. *Vaccine*, 2015, Vol. 33, pp. 3398-3406.
41. Turley C.B. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*, 2011, Vol. 29, pp. 5145-5152.
42. Wang T.T. Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins. *PLoS Pathog.*, 2010, Vol. 6, e1000796. doi: 10.1371/journal.ppat.1000796.
43. Wang T.T. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2010, Vol. 107, pp. 18979-18984.
44. World Health Organization [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <http://www.who.int/entity/csr/don/26-october-2017-ah7n9-china/en>. [World Health Organization [Electronic resource]. Access mode: [www.who.int/entity/csr/don/26-october-2017-ah7n9-china/en](http://www.who.int/entity/csr/don/26-october-2017-ah7n9-china/en).]
45. Wrammert J. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, pp. 181-193.
46. Wu F., Huang J.H., Yuan X.Y. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine*, 2007, Vol. 25, no. 52, pp. 8868-8873.
47. Zhang H., Wang L., Compans R.W., Wang B.Z. Universal influenza vaccines, a dream to be realized soon. *Viruses*, 2014, Vol. 6, pp. 1974-1991.
48. Zhou L., Ren R., Yang L., Bao C., Wu J., Wang D. Sudden increase in human infection with avian influenza A(H7N9) virus in China, September-December 2016. *Western Pac Surveill Response J.*, 2017, Vol. 8, pp. 6-14.

**Авторы:**

**Шуклина М.А.** — младший научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Степанова Л.А.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Ковалева А.А.** — научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Коротков А.В.** — научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Шалджян А.А.** — лаборант-исследователь ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Зайцева М.В.** — младший научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Елецкая Е.И.** — лаборант-исследователь ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Цыбалова Л.М.** — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе, заведующий отделом вакцинологии, заведующий лабораторией гриппозных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Authors:**

**Shuklina M.A.**, Junior Research Associate, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

**Stepanova L.A.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

**Kovaleva A.A.**, Research Associate, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

**Korotkov A.V.**, Research Associate, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

**Shaldzhyan A.A.**, Research Assistant, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

**Zaitseva M.V.**, Junior Research Associate, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

**Eletskaya E.I.**, Research Technical Assistant, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

**Tsybalova L.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Research, Head, Vaccinology Department, Chief, Influenza Vaccinal Laboratory, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 20.07.2018  
Принята к печати 19.09.2018

Received 20.07.2018  
Accepted 19.09.2018

# ПОЛУЧЕНИЕ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ С ПОВЫШЕННОЙ ПРОДУКЦИЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ОБОЛОЧЕЧНЫХ ВИРИОНОВ И НАПРАВЛЯЮЩИМ СИНТЕЗОМ GM-CSF КАК ПЕРСПЕКТИВНОЙ ОСНОВЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Бауэр Т.В., Трегубчак Т.В., Щелкунов С.Н., Максютлов Р.А.,  
Гаврилова Е.В.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора,  
р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Резюме.** На современном этапе развития науки проблема лечения онкологических заболеваний не теряет своей актуальности. В настоящее время становится все более очевидным, что монотерапия с помощью любого метода лечения не является столь же эффективной, как применение комбинированной терапии. Это обуславливает появление работ, посвященных совершенствованию уже существующих методов лечения и разработке новых, среди которых онколитическая иммунотерапия является одной из наиболее стремительно развивающихся. Благодаря современным методам генетической инженерии, открываются новые возможности использования онколитических вирусов в комбинированной терапии рака, что обусловлено их способностью, помимо прямого цитодеструктивного действия, влиять как на чувствительность опухолевых клеток к терапевтическому воздействию, так и на организм в целом, обеспечивая преодоление механизмов, обеспечивающих иммунорезистентность опухоли. Данная работа посвящена получению рекомбинантного вируса осповакцины, являющегося перспективной основой для создания противоопухолевых препаратов. При помощи генно-инженерных методов произведены модификации вирусного генома: в область гена, кодирующего вирусную тимидинкиназу, произведена встройка гена, кодирующего гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека, вирусный ген A34R, кодирующий мембранный гликопротеин, заменен на ген A34R с двумя нуклеотидными заменами, приводящими к аминокислотным заменам D110N и K151E и обуславливающими увеличение доли внеклеточных оболочечных вирионов при репродукции вируса. Кроме того, были изучены свойства полученного вируса в экспериментах *in vitro*: показаны продукция гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, отсутствие влияния проведенных модификаций вирусного генома на репродуктивные свойства вируса, усиленная способность вируса образовывать внеклеточные оболочечные вирионы.

**Ключевые слова:** вирус осповакцины, внеклеточные оболочечные формы вируса, рак, онколитический вирус, иммунотерапия, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

## Адрес для переписки:

Трегубчак Татьяна Владимировна  
ФБУН «Государственный научный центр вирусологии  
и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора  
630559, Россия, Новосибирская обл., р. п. Кольцово.  
Тел.: 8 (383) 363-47-00 (доб. 23-09).  
E-mail: tregubchak\_tv@vector.nsc.ru

## Address for correspondence:

Tregubchak Tatyana V.  
State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector"  
630559, Russian Federation, Novosibirsk Region, Koltsovo.  
Phone: 7 (383) 363-47-00 (add. 2309).  
E-mail: tregubchak\_tv@vector.nsc.ru

## Образец цитирования:

Т.В. Бауэр, Т.В. Трегубчак, С.Н. Щелкунов,  
Р.А. Максютлов, Е.В. Гаврилова «Получение вируса  
осповакцины с повышенной продукцией внеклеточных  
оболочечных вирионов и направляющим синтезом  
GM-CSF как перспективной основы для создания  
противоопухолевых препаратов» // Медицинская  
иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 371-378.  
doi: 10.15789/1563-0625-OVV-1594

© Бауэр Т.В. и соавт., 2020

## For citation:

T.V. Bauer, T.V. Tregubchak, S.N. Shchekunov,  
R.A. Maksyutov, E.V. Gavrilova "Obtaining vaccinia virus  
with increased production of extracellular enveloped virions  
and directing GM-CSF synthesis as a promising basis for  
development of antitumor drug", Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2,  
pp. 371-378. doi: 10.15789/1563-0625-OVV-1594

DOI: 10.15789/1563-0625-OVV-1594

# OBTAINING VACCINIA VIRUS WITH INCREASED PRODUCTION OF EXTRACELLULAR ENVELOPED VIRIONS AND DIRECTING GM-CSF SYNTHESIS AS A PROMISING BASIS FOR DEVELOPMENT OF ANTITUMOR DRUG

Bauer T.V., Tregubchak T.V., Shchelkunov S.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V.

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Abstract.** The problems of oncological disease treatment are considered relevant and timely issues of the current research programs. Since monotherapy is increasingly clear to be less effective than combination therapy, the novel studies seek for advancement of current treatments and development of new ones employing oncolytic immunotherapy being among the most rapidly evolving approaches. Modern genetic engineering techniques enable new applications of oncolytic viruses in the frames of combined cancer therapy. These applications are feasible, due to the abilities of oncolytic viruses to destruct tumor cells, like as by changing susceptibility of cancer cells to anti-tumor drug, and upon the whole body, thus overcoming the mechanisms conferring immunoresistance of tumor cells. In the present work, we have developed a recombinant vaccinia virus which is a promising platform for designing the antitumor drugs. The following modifications of viral genome were made by means of genetic engineering: gene encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor was inserted into the region of viral thymidine kinase gene; viral A34R gene encoding a membrane glycoprotein, was replaced by A34R gene with two nucleotide substitutions resulting into D110N and K151E mutations which cause increased proportion of extracellular enveloped virions during the virus reproduction. Some properties of the recombinant virus were studied *in vitro*. The virus was shown to produce granulocyte-macrophage colony stimulating factor, and high numbers of extracellular enveloped virions. The genome modifications had no effect upon viral replication.

**Keywords:** vaccinia virus, extracellular envelope form, cancer, oncolytic virus, immunotherapy, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-10101).

## Введение

Стремительное развитие иммунологии и экспериментальной иммунотерапии позволило применять новые подходы в лечении злокачественных новообразований, основанные на принципах стимуляции гуморального и клеточного противоопухолевого иммунитета [12]. Наряду с цитокинами, дендритными клетками, полиэпитопными ДНК-вакцинами и моноклональными антителами, активно проводят исследования в области создания онколитических препаратов на основе вирусов [8]. Преимущество последних заключается в возможности адресной доставки терапевтических генетических конструкций в клеточные компартменты и способности стимулировать иммунную систему организма-хозяина.

Одним из перспективных направлений онколитической иммунотерапии является разработка препаратов на основе вируса осповакцины (ВОВ), который интересен в первую очередь

тем, что репликация его двухцепочечного ДНК-генома происходит в цитоплазме клетки, что исключает возможность рекомбинации между вирусным и клеточным геномами. Кроме того, ВОВ в ходе жизненного цикла способен формировать различные по антигенным свойствам вирионы. Основные виды инфекционных вирусных частиц ВОВ: внутриклеточный зрелый вирус (IMV – internal mature virus) и внеклеточный покрытый оболочкой вирус (EEV – external enveloped virus). Последний наиболее интересен при создании препарата, направленного на борьбу со злокачественными новообразованиями, поскольку EEV-вирионы способны обеспечить большую эффективность распространения вируса в межклеточном пространстве и по кровеносному руслу в целом, так как обладают низкой иммуногенностью. Штаммы ВОВ различаются по эффективности формирования EEV (например, штамм ВОВ IND-J продуцирует в 40 раз больше EEV по сравнению со штаммом WR). Данное различие обусловлено аминокислотными заменами K151E и D110N в составе мембранного гликопротеина A34 [2]. Введение таких замен

в аминокислотную последовательность белка А34 может усилить онколитический потенциал ВОВ относительно первичных опухолей и метастазов, а также частично решить проблему снижения эффективности терапии онколитическим вирусом, обусловленной иммунными реакциями организма при длительном или повторном применении препарата.

Кроме того, ранее было показано, что создание онколитических вирусов на основе ВОВ, экспрессирующих иммуностимулирующие и противораковые терапевтические молекулы, является перспективным направлением в области терапии онкологических заболеваний [17]. Большое количество публикаций посвящено изучению онколитического потенциала штаммов ВОВ с нарушенными генами, кодирующими тимидинкиназу и вирусный фактор роста. Еще одним распространенным для онколитических разработок явлением служит инсерция в состав вирусного генома гена, продуктом которого является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), используемый для активации естественного противоопухолевого иммунитета организма [7].

Таким образом, получение ВОВ с повышенной продукцией внеклеточных оболочечных вирионов, в геном которого произведена встройка гена, кодирующего GM-CSF, позволит создать перспективный вирус-основу для получения эффективных противоопухолевых препаратов, поскольку высокая емкость вирусного ДНК-генома позволяет производить встройку генов, кодирующих терапевтические факторы различной направленности, обеспечивающих стимуляцию цитотоксических Т-лимфоцитов относительно опухолевых антигенов, активацию апоптоза, ингибирование молекул контрольных точек.

## Материалы и методы

### Получение рекомбинантного ВОВ<sub>TK(-)</sub>GM-CSF(+)<sub>A34R</sub>(D110N<sub>K151E</sub>)

В качестве основы для получения рекомбинантного ВОВ использовали клонированный вариант вируса штамм ЛИВП из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. При помощи метода временной доминантной селекции проводили последовательные модификации вирусного генома [10]. На первом этапе работы осуществляли встройку гена, кодирующего GM-CSF, в район вирусного гена, кодирующего тимидинкиназу. Для этого использовали полученную ранее плазмиду интеграции рΔTK/GMCSF(+) [13]. Далее проводили заражение перевиваемой культуры клеток CV-1 (из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) клонированным вариантом ВОВ штамм ЛИВП с множественностью зара-

жения 1 БОЕ/клетка, через час после заражения проводили трансфекцию клеток плазмидой интеграции с помощью липофектамина (Invitrogen, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Затем проводили шесть последующих пассажей вируса на культуре клеток CV-1 в селективной питательной среде DMEM (Биолот, Россия) с 2% эмбриональной сывороткой коров (HyClone, США) в присутствии ксантина (250 мкг/мл), гипоксантина (15 мкг/мл) и микофеноловой кислоты (25 мкг/мл). После снятия селективного давления клонирование рекомбинантных ВОВ проводили методом бляшек на монослое клеток CV-1 под твердым агарозным покрытием. Выделение вирусной ДНК независимых клонов проводили с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) с последующим ПЦР-анализом с использованием специфичных праймеров для скрининга клонов по району генома, содержащего целевую последовательность. Правильность нуклеотидной последовательности встроенного в вирусный геном гена, кодирующего GM-CSF, подтверждали фрагментарным секвенированием на автоматическом секвенаторе 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием реагента BigDye-v.3.1 (Applied Biosystems, США). В полученном таким образом вирусе производили замену гена А34R на ген А34R с двумя нуклеотидными заменами, приводящими к аминокислотным заменам K151E и D110N. Процесс получения идентичен вышеописанному, за исключением используемой плазмиды интеграции. Для конструирования плазмиды интеграции, предназначенной для замены гена А34R, методом ПЦР-мутагенеза получали фрагмент вирусного генома, длиной 915 п. н., содержащий ген А34R с нуклеотидными заменами и нуклеотидные последовательности, фланкирующие ген справа и слева. В качестве матрицы использовали ДНК исходного клонированного варианта ВОВ штамм ЛИВП и олигонуклеотидные праймеры:

A34R\_L\_upper 5' GAGCTCTTGACATTAAT  
AAATGAAATCGC 3'

A34R\_R\_lower 5' AAGCTTGAATAGATAAAA  
TGGCTGATGTTT 3'

A34R\_L\_110:D-N\_lower 5' CATTTATTATTGG  
TCTTTTAAAC 3'

A34R\_R\_110:D-N\_upper 5' AAGTTTAAAAAAG  
ACCAATAATAAAT 3'

A34R\_L\_151:K-E\_lower 5' TTACATACTGTTTC  
AACCAGTTT 3'

A34R\_R\_110:K-E\_upper 5' CTGGAAACTGG  
TTGAAACAG 3'

Полученный ПЦР-фрагмент гидролизовали эндонуклеазами рестрикции и лигировали с плазмидным вектором рMGCgpt, содержащим доминантный селективный маркер [13], и про-

водили последующее подтверждение правильности нуклеотидных последовательностей секвенированием на автоматическом секвенаторе 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

**Оценка изменения уровня продукции внеклеточных оболочечных вирионов BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E)**

Изучение уровня продукции внеклеточных оболочечных вирионов BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) проводили на 90% монослое клеток линий CV-1, полученном на 6-луночных планшетах. Монослой клеток CV-1 заражали исследуемым вирусом с множественностью заражения 10 БОЕ/клетка в трех повторах, после чего каждые 3 ч в течение 24 ч отбирали аликвоты надклеточной жидкости, а оставшиеся клетки вместе с надклеточной жидкостью подвергали трем циклам размораживания-оттаивания. После чего определяли титр вируса в надклеточной жидкости и в суспензии лизированных клеток. В качестве контроля для сравнения использовали вариант вируса, не содержащего аминокислотные замены в белке A34.

**Оценка динамики роста рекомбинантного BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) *in vitro***

Изучение динамики роста рекомбинантного BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) проводили на 90% монослое клеток линий CV-1, полученном на 12-луночных планшетах. Инфицировали монослой клеток с множественностью заражения 0,1 БОЕ/клетка исследуемым вирусом в трех повторах и инкубировали 0, 24, 48 или 72 ч при 37 °С в условиях 5% CO<sub>2</sub>. После трехкратного замораживания-оттаивания содержащие вирус препараты титровали методом бляшек в монослое клеток CV-1.

**Оценка наличия продукции GM-CSF *in vitro* при заражении эукариотических клеток BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E)**

Оценку наличия продукции GM-CSF при заражении эукариотических клеток BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) проводили на 90% монослое клеток линии CV-1, полученном на 6-луночных планшетах. Инфицировали монослой клеток с множественностью заражения 1 БОЕ/клетка исследуемым вирусом и инкубировали 24 или 48 ч при 37 °С в условиях 5% CO<sub>2</sub>, после чего осаждали зараженные клетки центрифугированием при 800 g 5 мин. Лизировали клетки трехкратным замораживанием-оттаиванием и в буфере для нанесения образцов (50 mM Трис-HCl, pH 6,8; 4% додецилсульфат натрия; 0,2% бромфенолового синего; 20% глицерина; 0,2 M β-меркаптоэтанол) фракционировали в 12,5% ПААГ [5]. Электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Schleicher &

Schuell Inc., США) осуществляли с помощью аппарата фирмы BioRad (США). Центры неспецифического связывания блокировали инкубацией нитроцеллюлозной мембраны в 0,5% растворе бычьего сывороточного альбумина в PBST. В качестве первичных антител использовали иммунную сыворотку, полученную иммунизацией кроликов GM-CSF. Конъюгат пероксидазы хрена с антителами козы против иммуноглобулинов кролика (BioRad, США) использовали в разведении 1:10000. Проявление иммунных комплексов проводили окрашиванием раствором 4-хлор-1-нафтола (Aldrich, США) в 0,1 M фосфатно-цитратном буфере pH 4,7 с концентрацией 500 мкг/мл, содержащем 0,0015% перекиси водорода.

## Результаты

### Получение вируса

При помощи вирусологических и генно-инженерных методов был получен рекомбинантный BOB, в геноме которого произведена замена гена A34R, кодирующего поверхностный гликопротеин, на ген A34R с двумя нуклеотидными заменами, приводящими к аминокислотным заменам D110N и K151E. Кроме того, в вирусе нарушен ген, кодирующий тимидинкиназу, в область которого произведена встройка гена, кодирующего GM-CSF (BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E)). Секвенирование нуклеотидных последовательностей вирусного генома в районе гена, кодирующего тимидинкиназу, и A34R подтвердило наличие проводимых модификаций в вирусном геноме и соответствие нуклеотидных последовательностей с теоретическими последовательностями.

### Морфология бляшек

Показано, что при заражении культуры клеток CV-1, полученным рекомбинантным BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E), увеличивается количество бляшек, имеющих кометообразную форму (рис. 1), в отличие от BOB со встройкой гена, кодирующего GM-CSF, в область гена тимидинкиназы BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+). Для каждого отдельного вируса анализировали морфологию всех бляшек, которые образовывались в результате вирусного заражения монослоя клеток CV-1 на 24-х лунках (6-луночные планшеты) с множественностью заражения 10 БОЕ/лунка. Доля кометообразных бляшек составила: 0,64±0,10 для BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) и 0,25±0,05 для BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+) (результаты представлены как среднее значение ± средняя квадратичная ошибка). Таким образом, выявлено, что эффективность формирования кометообразных бляшек BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) выше, чем у BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+).

K151E) повысилась в 2,5 раза по сравнению с BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+), не содержащим целые аминокислотные замены в составе мембранного гликопротеина A34, что может свидетельствовать о повышении продукции EEV.

#### Уровень продукции внеклеточных оболочечных вирионов

Внеклеточные оболочечные формы вируса выходят из клетки до того, как произойдет лизис зараженной клетки и все антигенные формы вируса окажутся в межклеточном пространстве [2]. Результаты эксперимента по оценке уровня продукции внеклеточных оболочечных вирионов, отображенные на рисунке 2, свидетельствуют о том, что введение замен D110N, K151E в состав мембранного гликопротеина A34 BOB обеспечило более ранний выход EEV из клеток, а также повышение титра данных форм вируса. Следует отметить, что результаты 21 ч, 24 ч после заражения могут являться недостоверными, так как возможно, что уже происходил лизис исходно зараженных клеток и титр мог формироваться за счет остальных антигенных форм вирусных частиц.

Кроме того, показано, что общие титры (включают все антигенные формы вирионов) исследуемых вирусов значимо не отличаются (рис. 3).

#### Динамика роста вируса

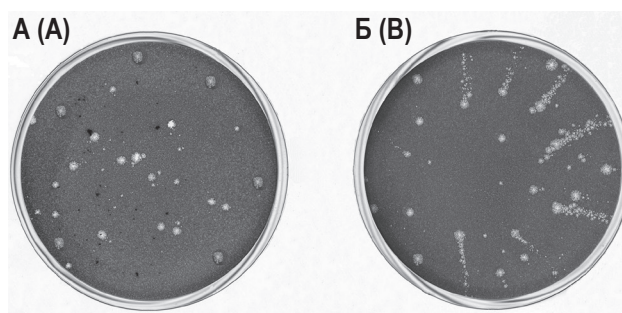
Проведенный эксперимент не выявил значимых различий в ростовых характеристиках исследуемых рекомбинантных вариантов BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) в сравнении с исходным вариантом вируса в культуре клеток CV-1 (рис. 4).

#### Продукция GM-CSF полученным рекомбинантным вирусом

При помощи вестерн-блот анализа показано, что белок детектируется на первые и вторые сутки после заражения в лизате клеток CV-1, зараженных BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E), отсутствует положительный сигнал в культуральной среде, также отсутствует сигнал в лизате клеток, зараженных исходным клоновым вариантом BOB, и в среде, в которой культивировались зараженные клетки.

## Обсуждение

За последнее десятилетие появляется все больше работ, свидетельствующих о целесообразности использования онколитических вирусов в терапии опухолей, не чувствительных к традиционным методам лечения [3, 11, 15]. В связи с этим многие представители вирусных семейств рассматриваются в качестве потенциальных основ для создания онколитических препаратов [18]. Как правило, каждый из таких вирусов имеет свои преимущества и недостатки

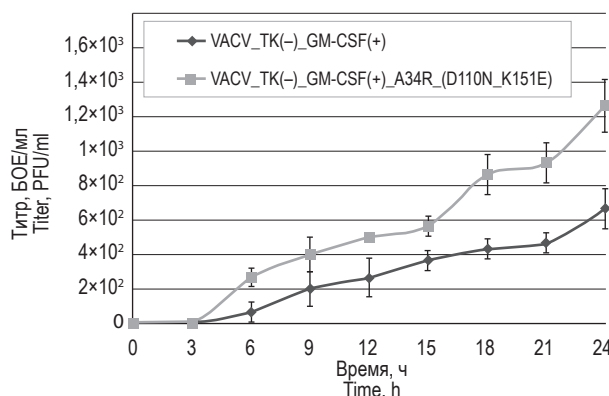


**Рисунок 1. Морфология бляшек, образованных в результате заражения монослоя клеток CV-1 A) BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+); Б) BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E)**

**Примечание.** Монослой клеток окрашен кристалвиолетом после 72 ч инкубации с вирусным материалом.

Figure 1. Morphology of plaques formed as a result of infection of the monolayer of cells CV-1 A) VACV\_TK(-)\_GM-CSF(+); B) VACV\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E)

Note. The monolayer of the cells is stained with crystal violet after 72 h of incubation with the viral material.

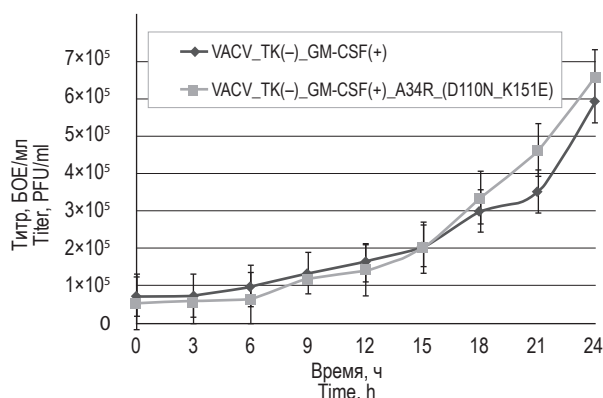


**Рисунок 2. Динамика увеличения титра внеклеточных оболочечных форм вируса для BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) и BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+) в надклеточной жидкости в зависимости от длительности инкубации после заражения культуры клеток CV-1 указанными вирусами**

Figure 2. Dynamics of the titer increase of extracellular envelope forms of VACV\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) and VACV\_TK(-)\_GM-CSF(+) in the extracellular fluid depending on the duration of incubation after virus infection of the cell culture CV-1

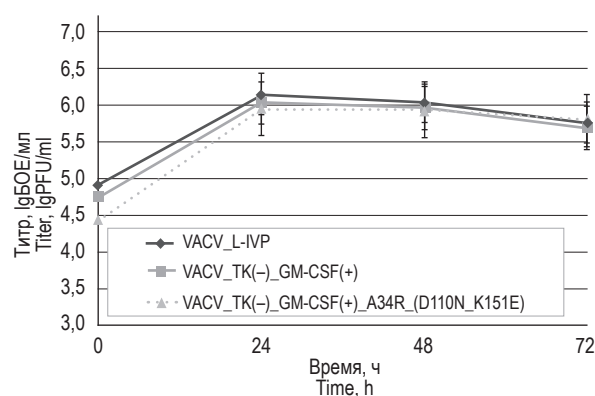
в контексте применения такого препарата для человека.

Одним из наиболее перспективных кандидатов на роль онколитического агента является BOB, поскольку он имеет ДНК-геном с высокой емкостью, что упрощает проведение генно-инженерных модификаций и позволяет в довольно короткие сроки получать рекомбинантные вари-



**Рисунок 3. Динамика увеличения общего титра вируса (включает все антигенные формы) для BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) и BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+) в зависимости от длительности инкубации после заражения культуры клеток CV-1 указанными вирусами**

Figure 3. Dynamics of titer increase for VACV\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) and VACV\_TK(-)\_GM-CSF(+) depending on the duration of incubation after virus infection of the cell culture CV-1



**Рисунок 4. Динамика роста исходного клонированного варианта BOB и его рекомбинантных вариантов на культуре клеток CV-1**

Figure 4. Growth dynamics of the initial clonal variant of VACV and its recombinants on the cell culture CV-1

анты вируса. Наиболее распространенными модификациями генома являются удаление генов, приводящих к преимущественной репликации вируса в делящихся клетках, и встраивание генов, обеспечивающих усиление иммуностимулирующих свойств вируса [14]. Указанный подход был реализован в данной работе. При помощи метода временной доминантной селекции был получен рекомбинантный вариант BOB, в геном которого произведена встройка гена, кодирующего GM-CSF. Данная модификация генома в первую очередь обусловлена тем, что эффективность онколитических вирусов частично определяется активацией иммунной системы против опухолевых клеток, что может быть дополнительно усилено путем встройки иммуностимулирующих молекул, таких как GM-CSF, который является эффективным стимулятором системного противоопухолевого иммунитета [9]. Стратегия введения в состав вирусного генома генов, кодирующих белки-иммуностимуляторы, широко применяется при разработке онколитических препаратов [6, 7]. Полученные нами результаты подтверждают наличие экспрессии GM-CSF созданным рекомбинантным вирусом осповакцины в системе *in vitro*. Подтвердить же терапевтическую эффективность GM-CSF возможно будет на следующих этапах работы на модельных животных с имплантированной опухолью. Следует отметить, что ген, кодирующий GM-CSF, встроен в геном BOB в область вирусного гена, кодирующего тимидинкиназу. Выбор данной области модификации вирусного генома основан на литературных данных, свидетельствующих о снижении виру-

лентности BOB и повышении избирательности репликации вируса в активно делящихся клетках, какими являются клетки опухолей. Репродукция BOB становится зависимой от активного синтеза нуклеотидов клеткой-хозяином, что является преимуществом таких вирусов как потенциальных основ для получения онколитических препаратов [1, 4].

В полученном нами вирусе BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E), помимо встройки гена, кодирующего GM-CSF, при одновременном нарушении вирусного гена, кодирующего тимидинкиназу, произведена замена гена A34R на ген A34R с двумя нуклеотидными заменами. Из опубликованных данных известно, что существует несколько видов инфекционных вирусных частиц BOB, которые отличаются по антигенным свойствам. Внутриклеточный зрелый вирус (IMV – internal mature virus) покрыт липопротеиновой двухслойной мембраной, окружающей плотный кор. Внутриклеточный зрелый вирус (IMV) образуется в вирусной фабрике из незрелого вируса (IV – immature virus). IMV представляет большинство инфекционного потомства и способен двигаться по микротрубочкам, покрываясь двойным слоем внутриклеточных мембран, полученных из ранних эндосом или транс-сети аппарата Гольджи, чтобы сформировать внутриклеточный вирус, покрытый оболочкой (IEV – intracellular enveloped virus). IEV затем передвигается к клеточной поверхности по микротрубочкам. Вирионы, удерживаемые на поверхности клетки, называют связанным с клеткой оболочечным вирусом (CEV – cell-

associated enveloped virus), а освобожденные вирионы — внеклеточным оболочечным вирусом (EEV — external enveloped virus). CEV индуцирует образование актиновых филаментов, которые обуславливают отделение EEV от клетки и имеют важное значение для распространения вируса [16]. Известно, что EEV-форма BOB обладает низкой иммунногенностью и обеспечивает эффективный транспорт вируса в тканях инфицируемого организма. Эффективность формирования EEV различается не только между видами, входящими в состав семейства Poxviridae, но и между разными штаммами вируса одного вида. Показано, что штамм IHD-J BOB производит в 40 раз большее количество EEV-форм вируса, чем штамм WR BOB, что обусловлено различием в 151-ом и 110-ом аминокислотных остатках мембранного гликопротеина A34 этих двух штаммов (белок A34 BOB штамма IHD-J содержит глутаминовую кислоту (151) и глутамин (110), белок A34 штамма WR — лизин (151), аспарагиновую кислоту (110)) [2]. Аминокислотная последовательность белка A34 используемого в работе штамма ЛИВП и штамма WR совпадают. Поэтому при помощи метода временной доминантной селекции в вирусе BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+) была произведена замена гена A34R на ген A34R с двумя нуклеотидными заменами с целью усиления эффективности образования EEV-форм вируса. В результате было показано, что введение указанных замен привело к увеличению количества кометообразных бляшек, образующихся при заражении культуры клеток CV-1 полученным вирусом BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E), что является фенотипическим признаком, характерным для EEV-форм вируса.

Происходит более ранний выход EEV из клеток и повышение уровня образования именно EEV, при этом введенные замены не оказывают влияния на продукцию вируса в целом. Кроме того, показано, что все проведенные модификации вирусного генома не оказывают влияния на ростовые характеристики вируса на культуре клеток CV-1. Данная культура является высокочувствительной для BOB, поэтому сохранение ростовых характеристик вируса на данной культуре позволит в дальнейшем использовать ее для наработки потенциального онколитического препарата.

Стратегия получения BOB\_TK(-)\_GM-CSF(+)\_A34R\_(D110N\_K151E) основана на внесении в выбранный клоновый вариант вируса модификаций, которые уже широко используются при разработке онколитических препаратов, с целью создания основы для дальнейшего усиления онколитического потенциала вируса. Увеличение эффективности образования EEV-форм вируса позволит эффективнее распространяться вирусу по организму, достигая метастазов, и позволит снизить уровень иммунного ответа на вирус; удаление гена, кодирующего тимидинкиназу, — снизить уровень репликации вируса в неделящихся клетках; встраивание гена, кодирующего GM-CSF, — усилить иммуностимулирующие свойства вируса.

Полученные в данной работе результаты в экспериментах *in vitro* свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения созданного кандидного онколитического BOB в экспериментах *in vivo* и о перспективности его использования в качестве основы для создания других вирусов, специфично направленных на лечение конкретных видов рака.

## Список литературы / References

1. Autio K., Knuutila A., Kipar A., Pesonen S., Guse K., Parviainen S., Rajamäki M., Laitinen-Vapaavuori O., Vähä-Koskela M., Kanerva A., Hemminki A. Safety and biodistribution of a double-deleted oncolytic vaccinia virus encoding CD40 ligand in laboratory Beagles. *Mol. Ther. Oncolytics*, 2014, Vol. 1, 14002. doi: 10.1038/mt.2014.2.
2. Blasco R., Sisler J. R., Moss B. Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: effect of a point mutation in the lectin homology domain of the A34R gene. *Virology*, 1993, Vol. 67, no. 6, pp. 3319-3325.
3. Bourke M.G., Salwa S., Harrington K.J., Kucharczyk M.J., Forde P.F., de Kruijf M., Soden D., Tangney M., Collins J.K., O'Sullivan G.C. The emerging role of viruses in the treatment of solid tumours. *Cancer Treat. Rev.*, 2011, Vol. 37, no. 8, pp. 618-632.
4. Buller R.M., Smith G.L., Cremer K., Notkins A.L., Moss B. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature*, 1985, Vol. 317, no. 6040, pp. 813-815.
5. Burnette W.N. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphatepolyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 1981, Vol. 112, no. 2, pp. 195-203.
6. Cush S.S., Reynoso G.V., Kamenyeva O., Bennink J.R., Yewdell J.W., Hickman H.D. Locally produced IL-10 limits cutaneous vaccinia virus spread. *PLoS Pathog.*, 2016, Vol. 12, no. 3, e1005493. doi: 10.1371/journal.ppat.1005493.
7. de Vries C.R., Monken C.E., Lattime E.C. The addition of recombinant vaccinia HER2/neu to oncolytic vaccinia – GM-CSF given into the tumor microenvironment overcomes MDSC-mediated immune escape and systemic anergy. *Cancer Gene Ther.*, 2015, Vol. 22, no. 3, pp. 154-162.

8. di Tucci C., Schiavi M.C., Faiano P., d'Oria O., Prata G., Sciuga V., Giannini A., Palaia I., Muzii L., Benedetti Panici P. Therapeutic vaccines and immune checkpoints inhibition options for gynecological cancers. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2018, Vol. 128, pp. 30-42.
9. Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V., Hamada H., Pardoll D., Mulligan R.C. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, Vol. 90, no. 8, pp. 3539-3543.
10. Falkner F.G., Moss B. Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.*, 1990, Vol. 64, no. 6, pp. 3108-3111.
11. Goncharova E.P., Ruzhenkova J.S., Petrov I.S., Shchelkunov S.N., Zenkova M.A. Oncolytic virus efficiency inhibited growth of tumour cells with multiple drug resistant phenotype *in vivo* and *in vitro*. *J. Transl. Med.*, 2016, Vol. 14, no. 1, 241. doi: 10.1186/s12967-016-1002-x.
12. Gopalakrishnan V., Helmink B.A., Spencer C.N., Reuben A., Wargo J.A. The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy. *Cancer Cell*, 2018, Vol. 33, no. 4, pp. 570-580.
13. Maksyutov R.A., Tregubchak T.V., Denisova N.I., Maksyutov A.Z., Gavrilova E.V. Gene-armed oncolytic poxvirus against cancer. *Acad. J. Cancer Res.*, 2013, Vol. 6, no. 1, pp. 45-49.
14. Russell L., Peng K.W. The emerging role of oncolytic virus therapy against cancer. *Chin. Clin. Oncol.*, 2018, Vol. 7, no. 2, p. 16.
15. Russell S.J., Peng K.W., Bell J.C. Oncolytic virotherapy. *Nat. Biotechnol.*, 2012, Vol. 30, no. 7, pp. 658-670.
16. Smith G.L., Vanderplassen A., Law M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J. Gen. Virol.*, 2002, Vol. 83, no. 12, pp. 2915-2931.
17. Tim Martin N., Cameron Bell J. Oncolytic virus combination therapy: Killing one bird with two stones. *Mol. Ther.*, 2018, Vol. 26, no. 6, pp. 1414-1422.
18. Vaha-Koskela M.J., Heikkilä J.E., Hinkkanen A.E. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Lett.*, 2007, Vol. 254, no. 2, pp. 178-216.

---

**Авторы:**

**Бауэр Т.В.** — стажер-исследователь ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Трегубчак Т.В.** — научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Щелкунов С.Н.** — д.б.н., профессор, заведующий отделом ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Максютов Р.А.** — д.б.н., генеральный директор ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

**Гаврилова Е.В.** — к.б.н., заместитель генерального директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

---

**Authors:**

**Bauer T.V.**, Research Intern, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Tregubchak T.V.**, Research Associate, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Shchelkunov S.N.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head of Department, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Maksyutov R.A.**, PhD, MD (Biology), General Director, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Gavrilova E.V.**, PhD (Biology), Director General Deputy for Research, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

## КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ПЕРВИЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТНОГО СОСТОЯНИЯ: Х-СЦЕПЛЕННАЯ АГАММАГЛОБУЛИНЕМИЯ

Кувшинова Е.В.<sup>1</sup>, Куртасова Л.М.<sup>2</sup>, Борисов А.Г.<sup>1</sup>, Шмидт А.Р.<sup>3</sup>,  
Герасимова Т.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

<sup>3</sup> КГАУЗ «Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД» г. Красноярск, Россия

**Резюме.** Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) — это генетически детерминированные дефекты одного или нескольких звеньев иммунной системы, препятствующие нормальному осуществлению иммунных функций.

Иммунодефициты, при которых значительно нарушено антителообразование, являются наиболее часто встречаемыми и составляют около 50% от общего количества ПИДС.

Описан клинический случай первичного иммунодефицитного состояния (ПИДС): Х-сцепленная агаммаглобулинемия у мальчика 8 лет. Результаты молекулярно-генетического исследования: ген ВТК (ex 1-19) версия генома GRCh38.p5, версия транскрипта ENST00000308731 выявлена однонуклеотидная замена с.1027C > Т в гомозиготном состоянии, приводящая к возникновению преждевременного стоп-кодона p.Gln343Ter (p.Q343\*).

**Ключевые слова:** первичное иммунодефицитное состояние, В-клетки, иммуноглобулины, агаммаглобулинемия

## CLINICAL CASE OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCY: X-LINKED AGAMMAGLOBULINEMIA

Kuvshinova E.V.<sup>a</sup>, Kurtasova L.M.<sup>b</sup>, Borisov A.G.<sup>a</sup>, Schmidt A.R.<sup>c</sup>,  
Gerasimova T.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Krasnoyarsk State V. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Abstract.** A clinical case of primary immunodeficiency state (PIDS) is described: X-linked agammaglobulinemia in the boy of 8 years old. The results of molecular genetic studies: gene btk (ex 1-19) genome version GRCh38.p5, transcript version ENST00000308731 single nucleotide substitution identified c.1027C > T in homozygous state

### Адрес для переписки:

Куртасова Людмила Михайловна  
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ  
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1.  
Тел.: 8 (391) 220-13-95.  
Факс: 8 (391) 221-16-38.  
E-mail: kurtasova.lm@mail.ru

### Address for correspondence:

Kurtasova Ludmila M.  
Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University  
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,  
Partizan Zheleznyak str., 1.  
Phone: 7 (391) 220-13-95.  
Fax: 7 (391) 221-16-38.  
E-mail: kurtasova.lm@mail.ru

### Образец цитирования:

Е.В. Кувшинова, Л.М. Куртасова, А.Г. Борисов, А.Р. Шмидт, Т.А. Герасимова «Клинический случай первичного иммунодефицитного состояния: Х-сцепленная агаммаглобулинемия» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 379-382.  
doi: 10.15789/1563-0625-CCO-1837  
© Кувшинова Е.В. и соавт., 2020

### For citation:

E.V. Kuvshinova, L.M. Kurtasova, A.G. Borisov, A.R. Schmidt, T.A. Gerasimova "Clinical case of primary immunodeficiency: X-linked agammaglobulinemia", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 379-382.  
doi: 10.15789/1563-0625-CCO-1837  
DOI: 10.15789/1563-0625-CCO-1837

leading to premature stop codon p.Gln343Ter (p.Q343\*). The presented clinical case reflects the low alertness of pediatricians for PIDS. At the same time, a delay in diagnosis and prescription of treatment aggravates the prognosis of the disease course and reduces the quality of the patient life.

**Keywords:** primary immune deficiency state, B cells, immunoglobulins, agammaglobulinemia

## Введение

Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) — это генетически детерминированные дефекты одного или нескольких звеньев иммунной системы, препятствующие нормальному осуществлению иммунных функций [1].

Клиническая манифестация при большинстве ПИДС происходит на первом и втором году жизни, но диагностируются они чаще в школьном возрасте. В диагностике многих синдромов ПИДС ведущее место занимают клинические признаки. Однако полиморфизм проявлений и наличие общих признаков при различных заболеваниях затрудняют диагностику ПИДС и часто приводят к врачебным ошибкам не только в отношении диагноза, но и лечения, которое порой оказывается не только малоэффективным, но и способствует ухудшению состояния больного.

Иммунодефициты, при которых значительно нарушено антителообразование, являются наиболее часто встречаемыми и составляют около 50% от общего количества ПИДС [1, 2].

Агаммаглобулинемия может являться следствием дефектов генов, сцепленных с X-хромосомой, или наследоваться по аутосомно-рецессивному признаку [1, 3]. Агаммаглобулинемия, сцепленная с X-хромосомой, впервые была описана Брутоном в 1952 году. Это сцепленное с полом, рецессивное по типу наследования заболевание, которое встречается преимущественно у мальчиков. Генетический дефект локализован на длинном плече X-хромосомы в положении Xq 21.2-22. Моногенный дефект является результатом мутации сигнальной трансдукторной молекулы, кодируемой геном *btk* (*b* — В-лимфоциты и болезнь Брутона, *tk* — тирозинкиназа) [1, 3]. Для большинства пациентов характерны повторные бактериальные инфекции с раннего возраста, чаще отиты, синуситы, пневмонии. Наиболее частой патогенной флорой являются *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*. Заболевание проявляется резким снижением (вплоть до полного отсутствия) в сыворотке крови всех классов иммуноглобулинов и является результатом блокады дифференцировки и созревания пре-В-клеток [1, 2].

### Описание клинического случая

Пациент П., 8 лет. Анамнез жизни: ребенок от V беременности (I — разрешилась родами, II, III — мед. аборт, IV — трубная беременность), протекавшей без особенностей. Роды вторые, самостоятельные в срок 40-41 нед. Масса при рождении 4480 г, длина тела 56 см. BCG вакцинирован в род. доме, рубчик 5 мм. Ранний неонатальный период протекал без особенностей. Естествен-

ное вскармливание получал до трех месяцев, затем переведен на искусственное вскармливание. Прививки по индивидуальному календарю в связи с частыми инфекционными заболеваниями. Травм и операций не было.

Семейный анамнез: со слов мамы гематологическими и иммунологическими заболеваниями неотягощен. Старший ребенок (сестра) в семье здоров.

Анамнез заболевания: в возрасте 1 месяца перенес острое респираторное заболевание (ОРЗ) с гнойным конъюнктивитом, с 5 месяцев отмечаются признаки нарушения противоинфекционной защиты (частые ОРЗ, сопровождавшиеся гноетечением из ушей, энтероколиты, 8 мес. — баланопостит, 1 г. 2 мес. — рожистое воспаление кожи в области лица). С двух лет наблюдаются эпизоды распространенной язвенной формы пиодермии, рецидивирующие бронхиты с длительным кашлем и слизисто-гнойной мокротой, гнойные отиты, синуситы. С декабря 2016 года по март 2017 года три эпизода средне- и нижнедолевой пневмонии справа. Лечился в стационаре по месту жительства. R-логически без положительного эффекта и после очередного ухудшения был госпитализирован в детское отделение легочно-аллергологического центра НИИ медицинских проблем Севера Федерального исследовательского центра КНЦ СО РАН.

Проведено обследование: в клиническом анализе крови отмечалась выраженная лейкопения ( $2,2 \times 10^9/\text{л}$ ) с нейтропенией (2%), промиелоциты (3%), СОЭ 37 мм/час. R-графия органов грудной клетки в двух проекциях: правосторонняя полисегментарная пневмония в средней и нижней долях правого легкого. По сравнению с предыдущей R-граммой без динамики.

МСКТ: в S 4,5 справа определяется участок гиповентиляции легочной ткани с элементами фиброза. В структуре изменений определяются деформированные расширенные бронхи. В S 10, частично S 9 — участок консолидации с тяжистыми контурами, с наличием плохо визуализируемых просветов бронхов. Легочный интерстиций вокруг изменений уплотнен по типу матового стекла. Слева — без очаговых инфильтративных изменений. Трахея не изменена. Лимфоузлы не увеличены. Жидкости в плевральной полости нет. Средостение структурное.

ФБС: диффузный эндобронхит с умеренно выраженной слизисто-гнойной гиперсекрецией.

R-графия придаточных пазух носа: двухсторонний верхнечелюстной синусит.

УЗИ органов брюшной полости: спленомегалия.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИЙ

TABLE 1. MUTATION RESULT

Ген Gene	Версия генома Genome version	Версия транскрипта Transcript version	Результат Result
Ген ВТК Gene BTK (ex 1-19)	GRCh38.p5	ENST00000308731	<b>Выявлена однонуклеотидная замена с.1027С&gt;Т в гемизиготном состоянии, приводящая к возникновению преждевременного стоп-кодона p.Gln343Ter (p.Q343*). Данная замена описана в научной литературе (HGMD-PUB-LIC:CM012740) как патогенная при гипогаммаглобулинемии [4]</b> A single nucleotide substitution c.1027C> T was detected in a hemizygous state, leading to the appearance of premature stop codon p.Gln343Ter (p.Q343*). This replacement is described in the scientific literature (HGMD-PUBLIC: CM012740) as pathogenic in hypogammaglobulinemia

В отделении больной получал антибактериальную терапию цефалоспорином внутривенно. Обращала на себя внимание длительная санация бронхиального дерева. Необходимо отметить гипоплазию миндалин и лимфатических узлов. При выписке 10.03.2017 г. отмечалась положительная динамика. Ребенок не лихорадит, кашель продуктивный, в легких выслушиваются непостоянные влажные хрипы.

Через три дня (13.03.2017) после выписки состояние пациента ухудшается, отмечается стойкая лихорадка, нарастают симптомы интоксикации, одышка. Ребенок госпитализируется в стационар по месту жительства, получает антибактериальную терапию (сумамед и внутривенно цефепим). Состояние продолжает ухудшаться и 16.03.2017 г. пациент санавиацией доставлен в детское отделение НИИ медицинских проблем Севера.

Р-логически определяется инфильтрация слева в нижней доле легкого. Бактериальный посев мокроты: обильный рост *Candida albicans* и *Streptococcus mitis*.

Проведено иммунологическое обследование. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови выявило резкое снижение количества В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>, % – 0,1; CD19<sup>+</sup>, 10<sup>9</sup>/л – 0,0028; норма – 12-22%; 0,3-0,5 соответственно). Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови: IgA – 0,0 мг/мл; IgG – 0,0 мг/мл; IgM – 0,03 мг/мл; IgE – 2,4 мг/мл. Антитела IgG к дифтерийному анатоксину < 0,01 МЕ/л; антитела IgG к столбнячному анатоксину < 0,01 МЕ/л.

Проведена антимикробная терапия: внутривенно меропенем 1,0 г 10 дней; ко-тримоксазол 3 дня в неделю 480 мг. Выписан на 17-е сутки в удовлетворительном состоянии.

#### Обоснование клинического диагноза

Пациент мужского пола, манифестация тяжелых рецидивирующих бактериальных инфекций в первые два года жизни, множественные очаги

инфекции, гипоплазия лимфоидной ткани, «следы» поствакцинальных специфических антител класса G к дифтерийному и столбнячному анатоксинам, экстремально низкое содержание CD19<sup>+</sup> клеток в периферической крови и сывороточных иммуноглобулинов (A, M, G). Все вышеизложенное позволило поставить диагноз «первичное иммунодефицитное состояние: агаммаглобулинемия с дефицитом В-клеток, генетически неуточненная».

Для верификации диагноза и решения вопроса о заместительной терапии пациент госпитализирован в отделение иммунологии Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева Минздрава России, где было проведено молекулярно-генетическое исследование (табл. 1).

Изосерологическое исследование: группа крови: группа В (III), резус-фактор – положительный, Kell: отрицательный, Phenotype: C-c-E-e-K-ctl DiaClon: C(+)E(-)e(+), антиген Cw: отрицательный, антиген К (Челано): положительный. Прямая проба Кумбса: отрицательно.

#### Клинический диагноз

Основной: первичное иммунодефицитное состояние: X-сцепленная агаммаглобулинемия.

Осложнения: бронхоэктатическая болезнь. ДН0.

В настоящее время состояние ребенка стабильное, не лихорадит, очагов инфекции нет. Пациенту проводится регулярная заместительная терапия иммуноглобулином для внутривенного введения, с обязательным ежемесячным контролем предтрансфузионных цифр IgG в сыворотке крови.

#### Заключение

Данный клинический случай демонстрируется с целью обратить внимание прежде всего пе-

диатров и врачей общей практики на первичные иммунодефицитные состояния у детей. Следует признать, что первичные иммунодефициты встречаются чаще, чем принято считать. Учитывая, что агаммаглобулинемия на сегодняшний день является заболеванием с необратимым нарушением функций иммунной системы, с высо-

ким риском развития тяжелых жизнеугрожающих бактериальных инфекций и аутоиммунных процессов, необходимо своевременно диагностировать данное состояние и назначить адекватную заместительную и антимикробную терапию больным детям, улучшая, таким образом, качество их жизни.

## Список литературы / References

1. Кондратенко И.В. Первичные иммунодефициты // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 5-6. С. 467-476. [Kondratenko I.V. Primary Immunodeficiencies. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 5-6, pp. 467-476. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2005-5-6-467-476.
2. Корсунский И.А., Гордукова М.А., Козлов И.Г., Продеус А.П., Корсунский А.А. Клинические и эпидемиологические аспекты первичных иммунодефицитных состояний и их раннего обнаружения // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 505-512. [Korsunskiy I.A., Gordukova M.A., Kozlov I.G., Prodeus A.P., Korsunskiy A.A. Clinical and epidemiological aspects of primary immunodeficiency diseases PID and early diagnosis options. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 505-512. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-505-512.
3. Кузьменко Н.Б., Щербина А.Ю. Классификация первичных иммунодефицитов как отражение современных представлений об их патогенезе и терапевтических подходах // Российский журнал детской гематологии и онкологии, 2017. Т. 4, № 3. С. 51-57. [Kuzmenko N.B., Shcherbina A.Yu. Classification of primary immunodeficiencies as a reflection of modern ideas about their pathogenesis and therapeutic approaches. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 2017, Vol. 4, no. 3, pp. 51-57. (In Russ.)]
4. Wang Y., Kanegane H., Sanal O., Ersoy F., Tezcan I., Futatani T., Tsukada S., Miyawaki T. Bruton tyrosine kinase gene mutations in Turkish patients with presumed X-linked agammaglobulinemia. *Hum. Mutat.*, 2001, Vol. 18, no. 4, p. 356.

### Авторы:

**Кувшинова Е.В.** — врач аллерголог-иммунолог II детского отделения легочно-аллергологического центра ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

**Куртасова Л.М.** — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

**Борисов А.Г.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

**Шмидт А.Р.** — врач-педиатр лечебно-консультативного отделения КГАУЗ «Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД» г. Красноярск, Россия

**Герасимова Т.А.** — заведующая II детским отделением легочно-аллергологического центра ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

### Authors:

**Kuvshinova E.V.**, Allergist-Immunologist, II Children's Department, Pulmonary-Allergological Center, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Kurtasova L.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasensky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Borisov A.G.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Cellular-Molecular Physiology and Pathology Laboratory, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Schmidt A.R.**, Pediatrician, Medical Advisory Department, Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Gerasimova T.A.**, Head, II Children's Department, Pulmonary-Allergological Center, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 25.07.2019

Отправлена на доработку 27.09.2019

Принята к печати 10.01.2020

Received 25.07.2019

Revision received 27.09.2019

Accepted 10.01.2020

## КОМОРБИДНЫЙ ПАЦИЕНТ С ЭОЗИНОФИЛЬНЫМ ГРАНУЛЕМАТОЗОМ С ПОЛИАНГИИТОМ: ВСЕГДА ЛИ ОДНОЗНАЧНА ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

Марченко В.Н., Бручкус Е.А., Лебедева А.А., Давыдов Д.А.,  
Шапорова Н.Л., Дудина О.В., Смутьская О.А., Зинакова М.К.

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

**Резюме.** Эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, ранее именовавшийся как синдром Чарга–Стросс, представляет собой редкий вариант АНЦА-ассоциированного некротизирующего васкулита, протекающего с поражением сосудов небольшого диаметра и характеризующийся типичными изменениями иммунологических параметров, выраженной эозинофилией периферической крови, тяжелым течением бронхиальной астмы, наличием летучих инфильтратов в легких, поражением периферической нервной системы, а также вовлечением в процесс почек, более редким по сравнению с другими некротизирующими васкулопатиями.

Диагностику заболевания часто осложняет наличие сопутствующей патологии, среди которой необходимо отметить хроническую обструктивную болезнь легких у пациентов с длительным стажем курения и профессиональными вредностями.

В статье представлен клинический случай относительно типичного течения эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, развившегося у пациента пожилого возраста на фоне ранее сформировавшейся хронической обструктивной болезни легких, что затрудняло диагностику данного эозинофильного синдрома. Дебют клинической картины был представлен симптомами одышки инспираторного характера при умеренной физической нагрузке и кашля с отхождением слизистой мокроты в небольшом количестве, которые возникли после длительного контакта с хлорсодержащими веществами. С учетом длительного стажа курения, пульмонологом по месту жительства было констатировано наличие хронической обструктивной болезни легких. Однако сохранение жалоб на фоне проводимой терапии, а также наличие разнонаправленной динамики при многократном выполнении компьютерной томографии (КТ) органов грудной клетки в виде мигрирующих легочных инфильтратов заставили интенсифицировать диагностический поиск системных заболеваний. В дальнейшем были выявлены клинические, лабораторные и инструментальные признаки бронхиальной астмы, а также значимая эозинофилия и поражение нервной системы в виде сенсорной полинейропатии, что в сочетании с рентгенологическими данными позволило сформировать мнение о наличии эозинофильного гранулематоза с полиангиитом, несмотря на отсутствие АНЦА.

### Адрес для переписки:

Дудина Ольга Владимировна  
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский  
государственный медицинский университет  
имени академика И.П. Павлова» Министерства  
здравоохранения РФ  
197022, Россия, Санкт-Петербург,  
ул. Льва Толстого, 6-8.  
Тел.: 8 (921) 965-75-12.  
E-mail: o-dudina@mail.ru

### Address for correspondence:

Dudina Olga V.  
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University  
197022, Russian Federation, St. Petersburg,  
L. Tolstoy str., 6-8.  
Phone: 7 (921) 965-75-12.  
E-mail: o-dudina@mail.ru

### Образец цитирования:

В.Н. Марченко, Е.А. Бручкус, А.А. Лебедева,  
Д.А. Давыдов, Н.Л. Шапорова, О.В. Дудина,  
О.А. Смутьская, М.К. Зинакова «Коморбидный пациент  
с эозинофильным гранулематозом с полиангиитом:  
всегда ли однозначна иммунологическая  
диагностика» // Медицинская иммунология, 2020.  
Т. 22, № 2. С. 383–392.  
doi: 10.15789/1563-0625-EGW-1925  
© Марченко В.Н. и соавт., 2020

### For citation:

V.N. Marchenko, E.A. Bruchkus, A.A. Lebedeva,  
D.A. Davydov, N.L. Shapорова, O.V. Dudina,  
O.A. Smulskaya, M.K. Zinakova "Eosinophilic granulomatosis  
with polyangiitis in comorbid patient: is the immunological  
diagnostics always unambiguous", Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2,  
pp. 383–392. doi: 10.15789/1563-0625-EGW-1925

DOI: 10.15789/1563-0625-EGW-1925

Представленный случай показывает, что при всей важности иммунологической диагностики, особенно при отрицательных результатах анализа крови на АНЦА, требуется тщательный анализ клинических данных для выявления взаимно отягощающей коморбидной патологии. Серьезный, во многих случаях неблагоприятный прогноз при эозинофильном гранулематозе с полиангиитом, необходимость длительного лечения с использованием цитостатиков, системных глюкокортикостероидов, а в отдельных случаях ГИБТ (генно-инженерной биологической терапии) заставляют рассматривать диагноз «эозинофильный гранулематоз с полиангиитом» как основной, а коморбидную патологию как фоновое состояние. Благоприятным в данном случае является тот факт, что пациент АНЦА-негативен, у него отсутствует развернутое поражение почек, кожи, что улучшает прогноз.

**Ключевые слова:** эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, синдром Чарга–Стросс, иммунологическая диагностика, АНЦА, АНЦА-ассоциированные васкулиты, коморбидность

## EOSINOPHILIC GRANULOMATOSIS WITH POLYANGIITIS IN COMORBID PATIENT: IS THE IMMUNOLOGICAL DIAGNOSTICS ALWAYS UNAMBIGUOUS

Marchenko V.N., Bruchkus E.A., Lebedeva A.A., Davydov D.A., Shaporova N.L., Dudina O.V., Smulskaya O.A., Zinakova M.K.

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

**Abstract.** Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA), previously called Churg–Strauss syndrome, represents a rare form of ANCA-associated necrotising vasculitis which affects small vessels. This disease is characterized by typical combination of immunological disturbances, hypereosinophilia, severe bronchial asthma, transient pulmonary infiltrates, and kidney injury which is less frequent than in other forms of necrotising vasculitis.

Verification of the diagnosis is often hampered by comorbidities, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in the patients with long-term smoking history and occupational hazards.

In this article, we report a clinical case of EGPA in elderly patient with preceding COPD which caused diagnostic difficulties for this eosinophilic syndrome. Clinical pattern at the beginning of disease was presented by moderate inspiratory dyspnea and cough with small amounts of mucus sputum, which appeared after long-term exposure to chlorine-containing substances. COPD diagnosis in this patient was based on clinical pattern, long smoking experience, and occupational hazards. However, persistence of the symptoms during the ongoing therapy, as well as multidirectional dynamics of transient pulmonary infiltrates found on repeated CT-scans, prompted us to intensify diagnostic search for a systemic disease. Clinical, laboratory and instrumental signs of bronchial asthma were revealed, as well as hypereosinophilia and sensory polyneuropathy, which, if combined with CT-scan data, allowed us to prove the EGPA diagnosis.

This case shows that, despite great value of immune diagnostics, with negative blood tests for ANCA, it is necessary to detect mutually complicating comorbid pathology. EGPA was considered the basic diagnosis, and COPD as accompanying disorder, taking into account such reasons as an unfavorable prognosis for EGPA and the need for long-term chemotherapy with systemic corticosteroids and monoclonal antibodies. ANCA-negative testing in the patient, absence of severe kidney and skin lesions allows to suggest better clinical prognosis in this patient.

**Keywords:** eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, Churg–Strauss syndrome, immunological diagnostics, ANCA, ANCA-associated vasculitides, comorbidities.

## Введение

Аутоиммунные заболевания представляют собой третью ведущую причину хронических заболеваний в развитых странах после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [9].

Эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (ЭГПА), также известный как синдром

Чарга–Стросс, является редким АНЦА-ассоциированным васкулитом с преимущественным поражением мелких сосудов, протекающим в виде сочетания бронхиальной астмы тяжелого течения, эозинофилии периферической крови более 10% от числа лейкоцитов, летучих инфильтратов в легких, моно- и полинейропатии [2, 5].

ЭГПА является редко встречающимся заболеванием в группе АНЦА-ассоциированных васкулитов. Так, распространенность ЭГПА составляет от 7 до 13 случаев на 1 млн населения [3], тогда как гранулематоз с полиангиитом, ранее известный как гранулематоз Вегенера, встречается в популяции до 25-60 случаев на 1 млн населения [10].

Классическая клиническая картина заболевания на первом этапе была представлена симптомами бронхиальной астмы, аллергического риносинусита. В дальнейшем при рентгенологическом исследовании начинают обнаруживаться «летучие» инфильтраты в легких, а в клиническом анализе крови — эозинофилия более 10%. На последнем этапе развития заболевания наблюдается развернутая картина системной некротизирующей васкулопатии [3]. К сожалению, АНЦА-ассоциированные васкулиты редко диагностируются до развития почечных и легочных осложнений, которые приводят к развитию значительной инвалидизации больных [5] и нередко к летальным исходам [7].

Диагностическими критериями ЭГПА являются: положительный АНЦА-тест (который выявляется у 75% больных [6]), эозинофилия периферической крови (более 10% от числа лейкоцитов периферической крови), бронхиальная астма, наличие моно- или полинейропатии, признаки легочных инфильтратов при рентгенологическом исследовании, патология гайморовых пазух, экстравазкулярная эозинофилия по данным патоморфологического исследования [8, 11]. Наличие 4-х и более критериев ЭГПА позволяет верифицировать достоверный ЭГПА с чувствительностью 85% и специфичностью 99%.

Эссенциальный признак ЭГПА — эозинофилия периферической крови — может встречаться при множестве других заболеваний, что затрудняет проведение дифференциальной диагностики. Так, при наличии гиперэозинофилии необходимо исключать наличие семейной (наследственной) эозинофилии, первичной клональной (острый и хронический эозинофильный лейкоз и другие миелоидные неоплазии) и вторичной реактивной эозинофилии (причинами которой могут быть глистные инвазии), болезни атропического марша, аллергические или токсические реакции (в том числе DRESS-синдром — drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (лекарственная реакция с эозинофилией и системными симптомами), хроническую реакцию «трансплантат против хозяина»), Лангерганс-клеточный лимфоцитоз, системный мастоцитоз, солидные опухоли, чесотку, аллергический бронхолегочный аспергиллез. Также необходимо помнить о существовании гиперэозинофилии неясного значения [13], об эозинофил-ассоциированном моноорганном повреждении: эозинофильных эзофагитах, гастроэнтеритах, колитах,

панкреатитах, гепатитах, миокардитах, фасциитах (синдром Шулмана).

В целом, при наличии эозинофилии периферической крови более 10%, бронхиальной астмы, патологии гайморовых пазух носа, летучих инфильтратов по данным рентгенографии легких, нейропатии, диагноз «эозинофильный гранулематоз с полиангиитом» может быть установлен критерияльно.

Важно отметить, что значительные трудности в диагностику ЭГПА может вносить стадийность его течения и невозможность верификации диагноза на ранних этапах заболевания, а также отрицательный результат теста на антинейтрофильные цитоплазматические антитела.

Таким образом, верификация ЭГПА часто бывает осложнена [1, 4] нетипичным течением (отсутствием этапности симптоматики), а также наличием коморбидной патологии. В данной статье представлен клинический случай ЭГПА, диагностика которого была затруднена отсутствием клинически значимого первого этапа заболевания и наличием сопутствующей патологии в виде хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ).

#### **Клиническое наблюдение**

Мужчина пожилого возраста (65 лет) впервые поступил в клинику НИИ ревматологии и аллергологии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова в ноябре 2017 года с жалобами на одышку с затруднением вдоха при минимальных физических нагрузках (ходьба в обычном темпе), постоянный кашель с отхождением слизистой мокроты в небольшом количестве.

Со слов пациента и с учетом данных предоставленной медицинской документации, был болен с весны 2016 года. Заболевание дебютировало после длительного контакта с хлорсодержащими веществами, когда пациента стали беспокоить дистантные хрипы, одышка с затруднением вдоха при умеренной физической нагрузке, кашель с отхождением слизистой мокроты в небольшом количестве. Пульмонологом по месту жительства с учетом вышеуказанных жалоб и длительного стажа курения была диагностирована ХОБЛ.

В связи с сохраняющимися жалобами на постоянный продуктивный кашель, нарастание интенсивности одышки, изменениями на рентгенограммах органов грудной клетки в виде распространенных интерстициальных изменений с участками «матового стекла», возможного увеличения бронхопульмональных лимфоузлов слева, в октябре 2016 года пациент был направлен в противотуберкулезный диспансер, где на основании отрицательных результатов диаскин-теста и микроскопии мокроты была исключена специфическая инфекция.

По данным КТ органов грудной клетки (ОГК) от 03.11.2016: в обоих легких на фоне умеренных



**Рисунок 1. Рентгенограмма органов грудной клетки пациента X. от 11.10.2017 года**

Figure 1. Chest radiograph result, 11 October 2017

интерстициальных изменений были верифицированы множественные очаги с нечеткими контурами до 15 мм в диаметре, часть из которых была расположена субплеврально, увеличения лимфоузлов средостения не наблюдалось.

В декабре 2016 года на фоне сохраняющихся жалоб на одышку с затруднением вдоха и выдоха, кашель с отхождением слизистой мокроты в умеренном количестве пациент был госпитализирован в Городскую больницу № 2 Санкт-Петербурга, где было выявлено повышение СОЭ до 22 мм/ч, лейкоциты до 20-25 в поле зрения и альвеолярные клетки до 10-15 в поле зрения в цитологическом анализе мокроты. Кислотоустойчивые микобактерии (КУМ) и ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) методом ПЦР обнаружены не были. По данным функции внешнего дыхания были диагностированы обструктивные изменения вентиляционной способности легких.

На повторно выполненной КТ ОГК инфильтративных изменений в легочной ткани выявлено не было, по сравнению с КТ от 03.11.2016 отмечалось уменьшение в размерах многочисленных двусторонних очагов со снижением их интенсивности при сохранении (примерно) прежнего их количества и одиночный умеренно увеличенный бифуркационный лимфатический узел размерами до 14 на 7,5 мм. По данным ФБС верифицировали диффузный двусторонний значительно выраженный катаральный эндобронхит со слизистой гиперсекрецией, фиброзную деформацию бронхов. На фоне проводимой инфузионной терапии с использованием метилксантинов, глюкокортикостероидов (ГКС) наблюдали умеренную положительную динамику. Пациент был выписан с диагнозом «хроническая обструктив-

ная болезнь легких», стадия I по GOLD, легкой степени тяжести, клиническая группа А (шкала mMRC 1 балл — симптомы не выражены, САТ-тест 5 баллов — низкий риск обострений, менее 1 обострения за год) с рекомендациями по использованию метилксантинов, ингаляционных глюкокортикостероидов (иГКС).

Зимой 2016-2017 гг. больного продолжали беспокоить продуктивный кашель, инспираторная одышка при умеренных физических нагрузках. В феврале 2017 года на контрольной компьютерной томографии (КТ) ОГК была выявлена КТ-картина очаговой диссеминации легких с 2-х сторон, преимущественно в верхних и средних отделах, уплотнение стенок трахеи и бронхов и КТ-признаки эмфиземы легких, а также единичные увеличенные внутригрудные лимфатические узлы. По сравнению с КТ от октября 2016 года, значимой динамики обнаружено не было. Пациент был повторно осмотрен пульмонологом, который рекомендовал продолжить терапию с использованием метилксантинов, иГКС.

В июне 2017 года при выполнении контрольной КТ ОГК была зарегистрирована отрицательная динамика в виде увеличения размеров и количества очагов легких с 2-х сторон, увеличения в размерах внутригрудных лимфатических узлов. На КТ ОГК от сентября 2017 года была разнонаправленная динамика в виде появления новых очагов, частичного разрешения старых, отрицательная динамика в виде появления полостей распада. С июля 2017 года пациент отмечал увеличение количества отделяемой мокроты, нарастание одышки инспираторного характера с ее возникновением при минимальной физической нагрузке. С учетом снижения сатурации кислорода до 93% пациенту было рекомендовано дообследование в рамках отделения торакальной хирургии.

В октябре 2017 года был госпитализирован в центр интенсивной пульмонологии и торакальной хирургии Городской больницы № 2 Санкт-Петербурга, где было выявлено повышение СОЭ до 41 мм/ч и изменения в общем анализе мокроты в виде повышения уровня лейкоцитов до 100 клеток в п/зр, а также повышение креатинина до 0,068 ммоль/л. На рентгенограммах ОГК определялись множественные мелкие очаги от 2 до 5 мм, участки усиления легочного рисунка за счет интерстиция, единичные линейные дискателектазы (рис. 1).

По данным фибробронхоскопии (ФБС) был верифицирован диффузный, двусторонний, значительно выраженный катаральный эндобронхит со слизистой гиперсекрецией. По данным цитологического исследования мокроты были получены клетки плоскоклеточной метаплазии, отдельные группы клеток, подозрительные на плоскоклеточный рак. Пациенту была вы-

полнена видеоторакоскопия справа с одномоментной биопсией ткани легкого и плевры. При гистологическом исследовании биоптата легкого выявлялись морфологические проявления деструктивно-пролиферативного полиангиита в сочетании с многофокусным, в виде формирующихся гранулем, полиморфноклеточным воспалительным инфильтратом. Результаты цитологического исследования были пересмотрены в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, данных об опухолевом росте получено не было.

В начале ноября 2017 года пациент был осмотрен ревматологом по месту жительства, была рекомендована госпитализация в специализированный ревматологический стационар для дообследования, установления диагноза и подбора терапии.

14 ноября 2017 года пациент был госпитализирован в НИИ ревматологии и аллергологии для дообследования и коррекции терапии.

При поступлении предъявлял жалобы на одышку (2 балла по шкале MMRC) и продуктивный кашель (18 баллов по САТ-тест – выраженные симптомы).

При дополнительном сборе анамнеза было установлено, что пациент являлся курильщиком (индекс курящего человека составил 41,4 пачка/лет), имел неотягощенный аллергологический анамнез и отягощенную наследственность по патологии сердечно-сосудистой системы (гипертоническая болезнь и хроническая сердечная недостаточность у родителей больного, младший сын умер от острого нарушения мозгового кровообращения в возрасте 38 лет), работая техником-электриком, имел профессиональную вредность в виде длительного воздействия излучения сварочной дуги, сварочного аэрозоля, искр и брызг металлов и шлака.

Из сопутствующей патологии обращало на себя внимание нерегулярное повышение уровня АД в течение 5 последних лет с максимальными значениями до 160 и 90 мм рт. ст. Терапевтом по месту жительства в отсутствие признаков вторичной артериальной гипертонии была верифицирована эссенциальная гипертензия 1 стадии без назначения какой-либо антигипертензивной терапии (были даны рекомендации по модификации образа жизни).

Объективный статус при поступлении: общее состояние относительно удовлетворительное. Положение в постели активное. Сознание ясное, в контакт вступает легко, память не снижена. Эмоционально стабилен. Телосложение расценено как нормостеническое. Рост 162 см, вес 63 кг, ИМТ 24,01 кг/м<sup>2</sup>, окружность талии 89 см. Подкожно-жировая клетчатка развита избыточно в области живота. Кожные покровы: чистые, нормальной влажности. Слизистая ротовой полости розовая, нормальной влажности. Полость

рта санирована. Отеков нет. Признаки варикозного расширения вен нижних конечностей, тромбоза как поверхностных, так и глубоких вен, выявлены не были.

Сердечно-сосудистая система: ЧСС 72 удара в минуту. Артериальное давление как на правой, так и на левой руке 135 и 85 мм рт. ст. Пульс 72 удара в минуту, ритмичный, симметричный, удовлетворительного наполнения, не напряжен. Пульсация на *aa. dorsalis pedis* сохранена с обеих сторон. Верхушечный толчок не пальпируется. Тоны сердца ясные, звучные, ритмичные, соотношение тонов не изменено. На верхушке выслушивается тихий (2/6 по шкале Левина) мезосистолический убывающий шум, без проведения в другие точки аускультации. Периферические пульсации сохранены на всех магистральных артериях.

Респираторная система: частота дыхательных движений 17 в минуту. Грудная клетка правильной формы, равномерно участвует в акте дыхания. Симптомы Штернберга и Потенжера отрицательные. Голосовое дрожание не изменено. Бронхофония не изменена. Перкуторный звук коробочный. Подвижность легочного края по *lin. axillaris posterior* слева и справа по 6 см. Дыхание жесткое, проводится равномерно во все отделы, рассеянные сухие свистящие хрипы.

При объективном осмотре органов желудочно-кишечного тракта, мочевыделительной, кровеносной, нервной, опорно-двигательной, эндокринной систем отклонений от нормы выявить не удалось.

При первичном осмотре с учетом наличия типичных изменений в легких при рентгенологическом исследовании (диссеминированный процесс, наличие полостей с распадом), данных биопсии легкого (морфологические проявления деструктивно-пролиферативного полиангиита в сочетании с многофокусным, в виде формирующихся гранулем, полиморфноклеточным воспалительным инфильтратом) было высказано предположение о наличии у пациента гранулематоза с полиангиитом (гранулематоз Вегенера).

В дальнейшем при обследовании были выявлены следующие изменения: абсолютная и относительная эозинофилия крови (табл. 1), резко ускоренная СОЭ, повышение уровня СРБ (табл. 2).

В таблице 3 представлен анализ мокроты пациента, выявивший наличие слизисто-гнойной мокроты, с увеличением количества лейкоцитов и наличием эозинофилии мокроты.

В таблице 4 представлены результаты иммунологического обследования, не выявившие отклонения показателей, характерных для АНЦА-ассоциированных васкулитов.

Общий анализ мочи, проба Реберга (клиренс эндогенного креатинина), анализ суточной мочи

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КРОВИ ОТ 15.11.2017

TABLE 1. BLOOD COUNT TEST, 15 NOVEMBER 2017

Показатель Test	Результат Result	Единицы измерения Unit	Референсный интервал Reference interval
Эритроциты RBC	4,90	$10^{12}/л$ $10^{12}/l$	4,1-5,1
Гемоглобин HGB	143,00	г/л g/l	132-164
Цвет. показатель Colour index	0,88		0,85-1,05
Лейкоциты WBC	11,80	$10^9/л$ $10^9/l$	4,0-8,8
Эозинофилы % Eosinophils, %	13,90	% %	0,0-5,0
Эозинофилы # Eosinophils, #	1,64	$10^9/л$ $10^9/l$	0,0-0,3
Скорость оседания эритроцитов Erythrocyte sedimentation rate (ESR)	40,00	мм/час mm/h	1-10

ТАБЛИЦА 2. БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КРОВИ ОТ 15.11.2017

TABLE 2. BLOOD CHEMISTRY TESTS, 15 NOVEMBER 2017

Показатель Test	Результат Result	Единицы измерения Unit	Референсный интервал Reference interval
Креатинин Creatinine	0,073	ммоль/л mmol/l	0,053-0,115
С-реактивный белок C-reactive protein	15,60	мг/л mg/l	0,10-8,20

на содержание общего белка: в пределах нормальных значений.

При выполнении полного комплекса ФВД с определением диффузионной способности легких были диагностированы как обструктивные, так и рестриктивные изменения вентиляционной способности легких, частично обратимый умеренный бронхоспазм: ОФВ<sub>1</sub> 49,2 % должной (63% должной после бронхолитика), ОФВ<sub>1</sub>/ЖЕЛ 44,53% должной (50,8% должной после бронхолитика), DLco 39,9% должной.

Пациент был осмотрен ЛОР-врачом, в соответствии с заключением которого патологии ЛОР-органов, в том числе в рамках основного заболевания, обнаружено не было.

Пациент был проконсультирован неврологом, по заключению которого выявлены признаки сенсорной полинейропатии в рамках системного васкулита.

Таким образом, у мужчины пожилого возраста (65 лет) с факторами риска по патологии респираторной системы (индекс курильщика 41,4 пачка/лет, профессиональные вредности) ведущим в клинической картине являлся синдром одышки

смешанного характера, неуклонно прогрессирующей с течением времени.

С учетом длительного анамнеза курения, наличия профессиональных вредностей, жалоб на прогрессирующую с течением времени одышку, трудноотделяемую мокроту, данных ФВД (показатель ОФВ<sub>1</sub>/ЖЕЛ менее 70% должной после бронхолитика) можно было диагностировать ХОБЛ, GOLD II (ОФВ<sub>1</sub> после бронхолитика 63% должной величины) с выраженной клинической симптоматикой (MMRc 2 балла, САТ 15 баллов) и низким (менее 1 в год) риском обострений. Однако в изолированное течение ХОБЛ не укладывались резко повышенные СОЭ и СРБ, эозинофилия периферической крови и мокроты, а также поражение периферической нервной системы.

Дифференциальный диагноз проводился с эозинофильным гранулематозом с полиангиитом (ЭГПА).

О наличии ЭГПА свидетельствовали следующие данные: бронхиальная астма, подтвержденная клинически, лабораторно и инструментально, эозинофилия периферической крови более 10%, полинейропатия, подтвержденная при объективном осмотре неврологом, наличие мигрирующих легочных инфильтратов по данным рентге-

ТАБЛИЦА 3. ОБЩИЙ АНАЛИЗ МОКРОТЫ ОТ 15.11.2017

TABLE 3. SPUTUM ANALYSIS, 15 NOVEMBER 2017

Показатель Test	Результат Result
Цвет Colour	желто-зеленый yellow-green
Консистенция Consistency	вязкая viscous
Характер Character	слизисто-гнойная mucopurulent
Запах Smell	не имеет no
Деление на слои Division into layers	не делится no
Эпителий плоский Squamous epithelium	3-5 клеток в поле зрения per high-power field
Макрофаги альвеолярные Alveolar macrophages	16-20 клеток в поле зрения per high-power field
Эпителий мерцательный Ciliate epithelium	не обнаружены not found
Эпителий альвеолярный Alveolar epithelium	не обнаружены not found
Эпителий цилиндрический Columnar epithelium	не обнаружены not found
Лейкоциты Leucocytes	12-15& клеток в поле зрения per high-power field
Эритроциты Erythrocytes	не обнаружены not found
Эозинофилы Eosinophils	не густо покрывают поле зрения not thick coverage
Спиральи Куршмана Curschmann's spirals	+
Кристаллы Шарко-Лейдена Charcot-Leyden crystals	не обнаружены not found
Кристаллы гематоидина Hematoidin crystals	не обнаружены not found
Кристаллы жирных кислот Fatty acid crystals	не обнаружены not found
Эластические волокна Elastic fibers	не обнаружены not found
Бактерии Bacteria	+
Атипические клетки Atypical cells	не обнаружены not found

нографии и КТ ОГК (таким образом, имели место 4 критерия в соответствии с классификационными критериями АНЦА-ассоциированных васкулитов). Также в пользу ЭГПА свидетельствовали данные биопсии легкого (признаки полиангиита с гранулематозным воспалением), выраженная эозинофилия мокроты, признаки частично об-

ратимого бронхоспазма по данным ФВД. Однако обращали на себя внимание отрицательные АНЦА и отсутствие типичной для ЭГПА этапности течения заболевания (отсутствие длительного анамнеза бронхиальной астмы).

Сопутствующая патология была представлена артериальной гипертензией, протекающей

ТАБЛИЦА 4. ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ОТ 15.11.2017

TABLE 4. IMMUNOLOGICAL TESTS, 15 NOVEMBER 2017

Показатель Test	Результат Result
Антитела к цитоплазме нейтрофилов (АНЦА) класса IgG Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), IgG	< 1:40 (антител не обнаружено) not found
Ревматоидный фактор методом агглютинации частиц латекса Rheumatoid factor, latex test	< 20 МЕ/мл IU/ml
Антинуклеарный фактор на клеточной линии HEp-2 (АНФ) методом непрямой иммунофлюоресценции Anti-nuclear antibody, HEp-2, indirect immunofluorescence	< 1:160 (не обнаружено) not found

в рамках гипертонической болезни (в отсутствие данных за ее вторичный генез), без поражения органов-мишеней и без ассоциированных клинических состояний. Модификация образа жизни без добавления какой-либо антигипертензивной терапии позволила добиться нормотензии у данного пациента.

Таким образом, в ходе данной госпитализации у больного был критериально верифицирован эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (наличие 4-х необходимых критериев), АНЦА-негативный, так как антитела к цитоплазме нейтрофилов обнаружены не были, что затруднило своевременную диагностику заболевания и повлияло на прогноз. Для АНЦА-негативного ЭГПА характерно более редкое поражение почек, менее агрессивный характер течения [12].

На момент поступления в стационар имело место тяжелое течение системного васкулита по шкале Бирмингемского индекса активности (BVAS – Birmingham Vasculitis Activity Score) – 12 баллов (одышка/астма – 2 балла, инфильтраты в легких – 4 балла, периферическая нейропатия – 6 баллов). Индекс повреждения (VDI – vasculitis damage index) составлял 1 балл (периферическая полинейропатия – 1 балл).

#### Клинический диагноз

Основной: эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (синдром Чарга–Стросс), АНЦА-негативный, BVAS 12 VDI 1, с поражением легких (множественные очаги с распадом), периферической нервной системы (сенсорная полинейропатия).

Осложнение: дыхательная недостаточность I степени.

Сопутствующий: хроническая обструктивная болезнь легких, средней степени тяжести (GOLD II), выраженные клинические симптомы (MMRc SAT), с редкими обострениями, смешанный фенотип.

Гипертоническая болезнь I стадии. Риск сердечно-сосудистых осложнений 2 (умеренный).

На основании поставленного диагноза была инициирована индукция ремиссии по системе

CYCLOPS: парентеральное введение Циклофосфамида 1000 мг № 6, первые 3 введения каждые 2 недели, последующие 3 введения каждые 3 недели, парентеральное введение Метилпреднизолона 1000 мг № 3 с последующим переходом на пероральный прием Преднизолона 1 мг/кг (60 мг/сут.) с постепенным снижением дозы. Проводилась профилактика возможных осложнений, ассоциированных с терапией (сульфаметоксазол + триметоприм 480 мг/сут., Омепразол 20 мг 2 раза в сутки), а также была продолжена базисная терапия ХОБЛ в виде ингаляций Гликопиррония бромид + Индакатерола («Ультибро Бризхалер») 50 мкг + 110 мкг 1 раз в сутки.

Комбинированную пульс-терапию переносил удовлетворительно. На этом фоне наблюдалось улучшение общего самочувствия в виде исчезновения одышки, отсутствие приступов удушья, свистящих хрипов в легких при аускультации, нормализация уровня эозинофилов периферической крови, постепенное снижение уровней СОЭ и СРБ.

## Заключение

Таким образом, представленный случай показывает, что при всей важности иммунологической диагностики, особенно при отрицательных результатах анализа крови на АНЦА, требуется тщательный анализ клинических данных для выявления взаимно отягощающей коморбидной патологии. Серьезный, во многих случаях неблагоприятный прогноз при ЭГПА, необходимость длительного лечения с использованием цитостатиков, системных ГКС, а в отдельных случаях ГИБТ (генно-инженерной биологической терапии) заставляют рассматривать диагноз «ЭГПА» как основной, а коморбидную патологию как фоновое состояние. Благоприятным в данном случае является тот факт, что пациент АНЦА-негативен, у него отсутствует развернутое поражение почек, кожи, что улучшает прогноз [3].

## Список литературы / References

1. Багишева Н.В., Трухан Д.И., Викторова И.А., Алексеенко В.А., Кононенко А.Ю., Николаева Н.Ю. Сложности в диагностике эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (синдром Черджа–Стросс) // *Consilium Medicum*, 2018. Т. 20, № 11. С. 55-60. [Bagisheva N.V., Trukhan D.I., Viktorova I.A., Alekseenko V.A., Kononenko A.Yu., Nikolaev N.Yu. Difficulties in diagnostics of eosinophil granulomatosis with polyangiitis (Churg–Strauss syndrome). *Consilium Medicum*, 2018, Vol. 20, no. 11, pp. 55-60. (In Russ.)]
2. Бекетова Т.В. Европейские (EULAR/ERA-EDTA) рекомендации по диагностике и лечению АН-ЦА-ассоциированных системных васкулитов – 2016 // Научно-практическая ревматология, 2017. Т. 55, № 1. С. 12-16. [Beketova T.V. The 2016 European (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the diagnosis and management of ANCA-associated systemic vasculitis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2017, Vol. 55, no. 1, pp. 12-16. (In Russ.)]
3. Бекетова Т.В., Волков М.Ю. Международные рекомендации по диагностике и лечению эозинофильного гранулематоза с полиангиитом – 2015 // Научно-практическая ревматология, 2016. Т. 54, № 2. С. 129-137. [Beketova T.V., Volkov M.Yu. The 2015 International guidelines for the diagnosis and treatment of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2016, Vol. 54, no. 2, pp. 129-137. (In Russ.)]
4. Войцеховский В.В., Погребная М.В., Гоборов Н.Д., Фомина О.П., Горячева С.А. Особенности диагностики и лечения синдрома Черджа–Стросс // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2017. № 64. С. 79-87. [Voytsekhovskiy V.V., Pogrebnaya M.V., Goborov N.D., Fomina O.P., Goryacheva S.A. Peculiarities of diagnosis and treatment of Churg–Strauss syndrome. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin of Physiology and Pathology of Respiration*, 2017, Vol. 64, pp. 79-78. (In Russ.)]
5. Лапин С.В., Тотолян А.А. Иммунологическая диагностика поражений почек при васкулитах // Нефрология, 2003. Т. 7, № 1. С. 109-119. [Lapin S.V., Totolyan A.A. Immunological diagnosis of lesions to the kidneys with vasculites. *Nefrologiya = Nephrology (St. Petersburg)*, 2003, Vol. 7, no. 1, pp. 109-119. (In Russ.)]
6. Лапин С.В., Тотолян А.А. Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. СПб.: Человек, 2010. 272 с. [Lapin S.V., Totolian A.A. Immunological laboratory diagnosis of autoimmune diseases]. St. Petersburg: Tchelovek, 2010. 272 p.
7. Мазуров В.И., Долгих С.В., Сысоев К.А., Тотолян Арег А. Роль цитокинов в поддержании иммуновоспалительного процесса при первичных системных некротизирующих васкулитах // Российский иммунологический журнал, 2011. Т. 5 (14), № 3-4. С. 228-232. [Mazurov V.I., Dolgikh S.V., Sysoev K.A., Totolian Areg A. Role of cytokines in maintenance immunoinflammatory process in primary systemic necrotizing vasculitis. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 5 (14), no. 3-4, pp. 228-232. (In Russ.)]
8. Моисеев С.В., Семенкова Е.Н., Новиков П.И. Актуальная номенклатура системных васкулитов – рекомендации Международной консенсусной конференции (Чапел-Хилл, 2012) // Клиническая нефрология, 2013. № 2. С. 41-46. [Moiseev S.V., Semenkova E.N., Novikov P.I. Current classification of systemic vasculitides: recommendations of International consensus conference (Chapel Hill 2012). *Klinicheskaya nefrologiya = Clinical Nephrology*, 2013, no. 2, pp. 41-46. (In Russ.)]
9. Роггенбук Д., Ширак П., Сак У., Лапин С.В., Мазинг А.В., Тотолян Арег А. Новые подходы к стандартизации выявления аутоантител в лабораторной диагностике аутоиммунных ревматических заболеваний // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 3. С. 221-226. [Roggenbuck D., Schierac P., Sack U., Lapin S.V., Mazing A.V., Totolian A.A. Novel methods for autoantibody detection in laboratory diagnostics of autoimmune rheumatic diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 3, pp. 221-226. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-3-221-226.
10. Ходош Э.М., Крутько В.С., Ефремова О.А. Гранулематоз с полиангиитом (Вегенера) и системные васкулиты: многосторонний взгляд на проблему (обзор литературы) // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация, 2017. № 19 (268), С. 40-53. [Khodosh E.M., Krutko V.S., Efremova O.A. Granulematosis with polyangitis (Vegenera) and systemic vasculites: a multilateral view of the problem (review of literature). *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya = Belgorod State University Scientific Bulletin: Medicine Pharmacy*, 2017, no. 19 (268), pp. 40-53. (In Russ.)]
11. Masi A.T., Hunder G.G., Lie J.T., Michel B.A., Bloch D.A., Arend W.P., Calabrese L.H., Edworthy S.M., Fauci A.S., Leavitt R.Y., Lightfoot R.W., McShane D.J., Mills J.A., Stevens M.B., Wallace S.L., Zvaifler N.J. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Churg–Strauss syndrome (allergic granulomatosis and angiitis). *Arth. Rheum.*, 1990, Vol. 33, no. 8, pp. 1094-1100.
12. Sokołowska B.M., Szczeklik W.K., Włodarczyk A.A., Kuczia P.P., Jakiela B.A., Gąsior J.A., Bartyzel S.R., Rewerski P.A., Musiał J. ANCA-positive and ANCA-negative phenotypes of eosinophilic granulomatosis with

polyangiitis (EGPA): outcome and long-term follow-up of 50 patients from a single Polish center. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2014, Vol. 32, no. 3, Suppl. 82, pp. S41-S47.

13. Valent P., Klion A.D., Horny H.P., Roufosse F.R., Gotlib J., Weller P.F., Gleich G.J., Hellmann A., Metzgeroth G., Leiferman K.M., Arock M., Butterfield J.H., Sperr W.R., Sotlar K., Vandenberghe P., Haferlach T., Simon H.U., Reiter A. Contemporary consensus proposal on criteria and classification of eosinophilic disorders and related syndromes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 130, no. 3, pp. 607-612.

---

**Авторы:**

**Марченко В.Н.** — д.м.н., профессор кафедры терапии госпитальной с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Бручкус Е.А.** — заведующая кардиологическим отделением № 2 клиники НИИ ревматологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Лебедева А.А.** — врач приемного отделения № 1 НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Давыдов Д.А.** — клинический ординатор кафедры терапии госпитальной с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Шапорова Н.Л.** — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой общей врачебной практики (семейной медицины) ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Дудина О.В.** — к.м.н., доцент кафедры общей врачебной практики (семейной медицины) ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Смольская О.А.** — к.м.н., доцент кафедры общей врачебной практики (семейной медицины) ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Зинакова М.К.** — к.м.н., ассистент профессора кафедры терапии госпитальной с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В. Черноруцкого ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

---

**Authors:**

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

**Bruchkus E.A.**, Head, Second Cardiology Department, Research Institute of Rheumatology and Allergology of the Scientific and Clinical Research Center, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Lebedeva A.A.**, Physician, Research Institute of Surgery and Emergency Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Davydov D.A.**, Resident, Hospital Therapy Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Shaporova N.L.**, MD, PhD (Medicine), Professor, Head, Department of General Practice (Family Medicine), First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Dudina O.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General Practice (Family Medicine), First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Smulskaya O.A.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General Practice (Family Medicine), First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Zinakova M.K.**, PhD (Medicine), Assistant Professor, Hospital Therapy Department, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

---

Поступила 14.01.2020  
Отправлена на доработку 29.01.2020  
Принята к печати 20.02.2020

---

Received 14.01.2020  
Revision received 29.01.2020  
Accepted 20.02.2020



**РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО  
ИММУНОЛОГОВ С ГЛУБОЧАЙШИМ  
ПОЧТЕНИЕМ И БЛАГОДАРНОСТЬЮ ОТ  
ИМЕНИ ВСЕХ ИММУНОЛОГОВ РОССИИ  
И СТРАН БЫВШЕГО СОВЕТСКОГО СОЮЗА  
ПОЗДРАВЛЯЕТ ОСНОВОПОЛОЖНИКА  
ИММУНОЛОГИИ В НАШИХ СТРАНАХ  
РЭМА ВИКТОРОВИЧА ПЕТРОВА,  
БЕССМЕННОГО ПОЧЕТНОГО ПРЕЗИДЕНТА  
РНОИ, С ЗАМЕЧАТЕЛЬНЫМ 90-ЛЕТНИМ  
ЮБИЛЕЕМ!**

Рэм Викторович является одним из ведущих в мире специалистов по развитию фундаментальных и прикладных проблем неинфекционной иммунологии и иммуногенетики.

Рэм Викторович — автор ряда важных и широко известных результатов по проблемам иммуногенетики, клеточных взаимодействий, регуляции иммунного ответа, влиянии синтетических полимерных соединений на функции иммунокомпетентных клеток; автор открытия эффектов взаимодействия центральных элементов системы кроветворения — кроветворных стволовых клеток с центральными клетками системы иммунитета — лимфоцитами. Изучение механизмов этого феномена привело к выявлению клеточных механизмов иммунной системы, регулирующих кроветворение и к открытию регуляторных пептидов костного мозга — миелопептидов. На основе костномозговых миелопептидов созданы лекарственные препараты — миелопид, бивален, серамил. Разработка влияния синтетических полимерных соединений на функции иммунокомпетентных клеток привела к созданию первого в мире синтетического, биodeградируемого полифункционального адъюванта — иммуномодулятора и технологии конструирования с его использованием вакцин нового поколения с повышенными иммунизирующими свойствами.

Рэмом Викторовичем были разработаны подходы к созданию принципиально нового класса препаратов для специфической иммунотерапии аллергий — аллерготропинов на основе конъюгатов синтетического иммуностимулирующего полиэлектролита — полиоксидония с высокоочищенными аллергенами или аллергоидами, выделенными из пыльцы растений — березы (аллерготропин берпол), тимофеевки (тимпол), полыни (полпол). Результаты показали, что аллерготропины значительно повышают эффективность иммунотерапии.

По инициативе Рэма Викторовича и под его руководством была широко развернута работа по оценке иммунного статуса человека, слежению за динамикой его состояния у больших контингентов взрослого и детского населения различных регионов, по изучению влияния на него экологически неблагоприятных факторов. Созданная методология была внедрена в практическое здравоохранение, была сформирована сеть региональных центров и лабораторий клинической иммунологии, накоплен массив данных по проблеме «Иммунный статус населения», создана иммунологическая карта страны.

Рэм Викторович уделяет большое внимание развитию в стране наноконструирования новых иммуногенов, антител, вакцин, нанодиагностики и нанодетекции, наноконструированию новых лечебных препаратов и других актуальных стратегических проблем бионанотехнологии.

Р.В. Петров является автором 16 монографий, учебника «Иммунология», его имя хорошо известно во всем мире. Более 60 научных трудов, включая 8 монографий, опубликованы в США, Франции, Японии и других странах. Кроме того, Р.В. Петров — автор многих научно-популярных и научно-художественных книг и статей.

О признании таланта ученого и научных заслуг Рэма Викторовича свидетельствуют: избрание его академиком РАН, членство в ряде редколлегий известных международных научных журналов и обществ. Его научная деятельность была высоко оценена в Советской Союзе: он — Герой Социалистического Труда, награжден орденом Октябрьской революции и многими другими наградами.

Его вклад в развитие иммунологической науки высоко оценивается и сегодня как в России, так и в мировом научном сообществе, это подтверждается такими наградами, как «Орден за заслуги перед Отечеством III степени», Степень HONORIS CAUSA доктора Российского государственного медицинского университета, Государственная премия Российской Федерации в области науки и технологий — за работу «Конъюгированные полимер-субъединичные иммуногены и вакцины», Золотая медаль Международного общества трансплантологов, Государственная премия Российской Федерации года в области науки и технологий и многое другое.

Рэм Викторович воспитал целую плеяду высококлассных специалистов, ставших известными учеными, среди которых доктора наук, профессоры, члены-корреспонденты, академики. Рэм Викторович и его ученики являются руководителями многих проектов в сфере иммунологии.

Все члены иммунологического сообщества высоко ценят человеческую мудрость Рэма Викторовича, доброжелательность в отношениях с людьми, неиссякаемую энергию и оптимизм.

Желаем Вам, дорогой Рэм Викторович, доброго здоровья, новых научных достижений и много новых талантливых учеников!

# 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 апреля 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-1β 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-1β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

### Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

### Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

## Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

### Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

### Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

**Таблицы.** Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (\*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (\*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

**Рисунки (графики и фотографии).** В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т.е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

### Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

### Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
  - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
    - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
    - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы <a href="http://www.e-library.ru">www.e-library.ru</a>

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

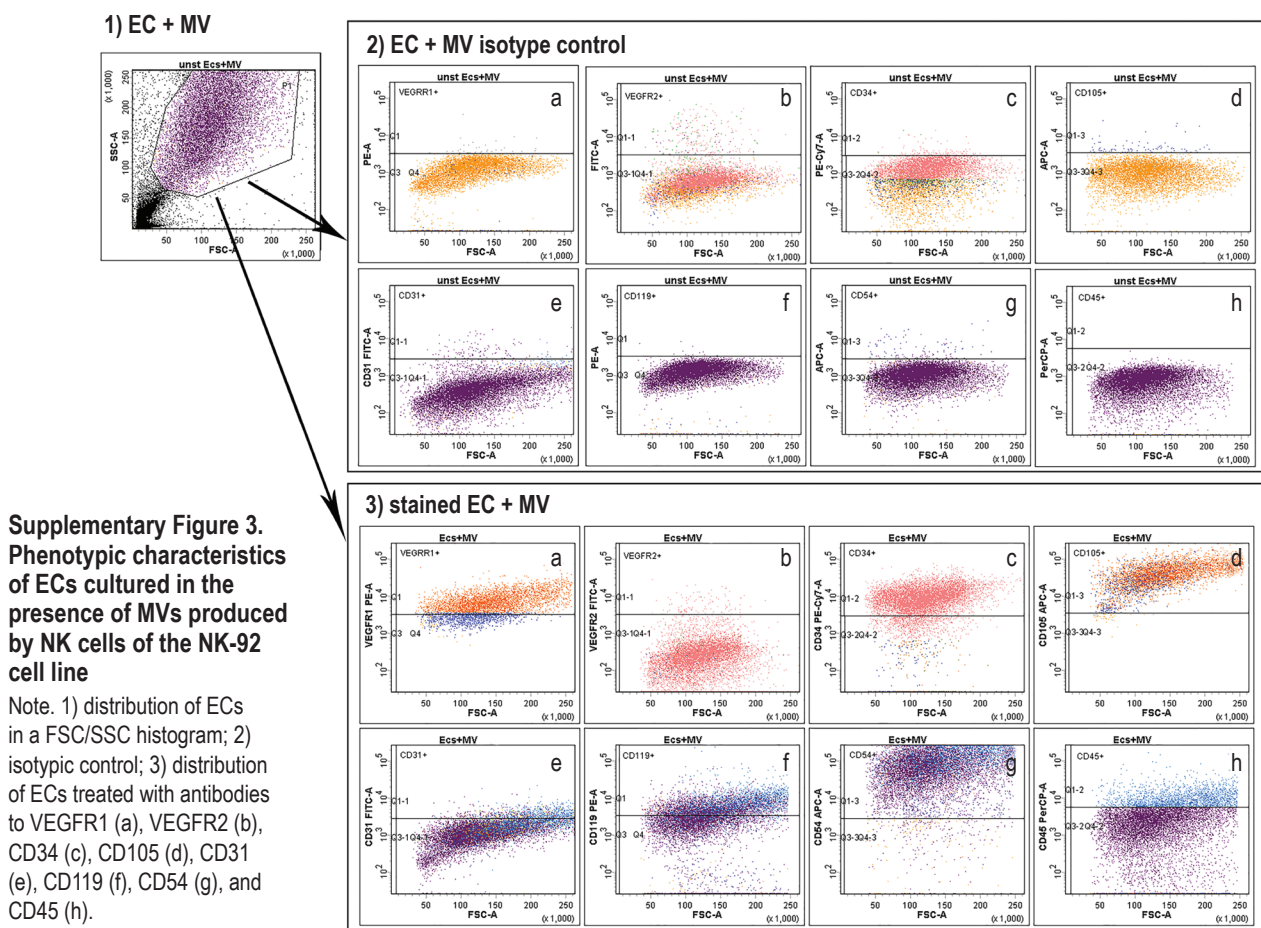
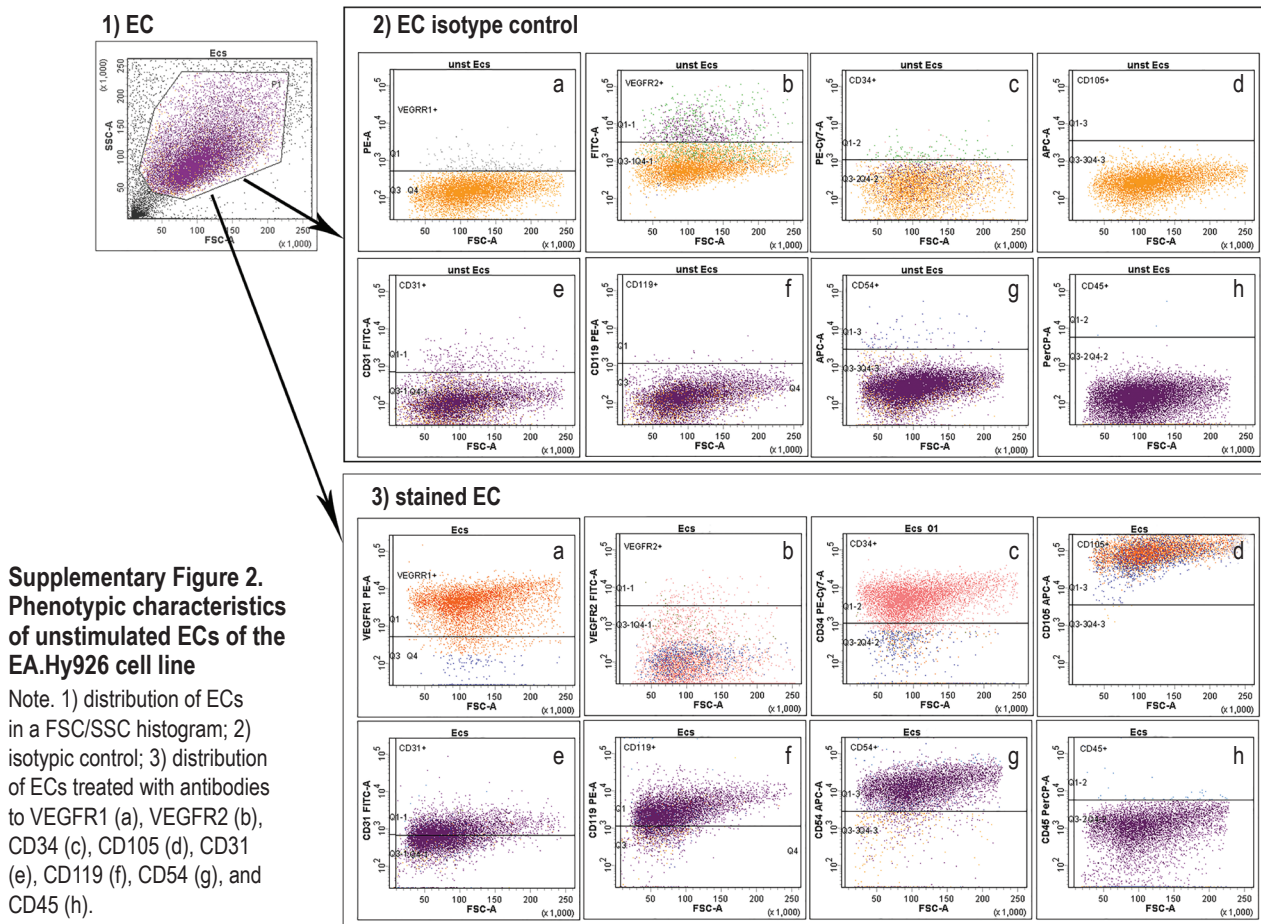
**Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**

# АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Александрова Е.П. ....	249	Калиновская Н.Ю. ....	327	Марченко В.Н. ....	383	Степанова Л.А. ....	357
Антюфьева Д.А. ....	319	Карасева А.Б. ....	335	Маснавиева Л.Б. ....	311	Суворов А.Н. ....	335
Арсентьева Н.А. ....	291	Ковалева А.А. ....	357	Милютина Ю.П. ....	249	Тихонова М.А. ....	269
Балабас О.А. ....	249	Козырева А.Р. ....	231	Михайлова В.А. ....	249	Тотоян Арег А. ....	291
Балацкая Н.В. ....	301	Кондратенко Ю.Д. ....	335	Мошев А.В. ....	347	Трегубчик Т.В. ....	371
Бауэр Т.В. ....	371	Кореневский А.В. ....	249	Нероев В.В. ....	301	Тыринова Т.В. ....	269
Бацунов О.К. ....	291	Королевская Л.Б. ....	281	Олейник В.М. ....	207	Филатова К.Ю. ....	327
Борисов А.Г. ....	347, 379	Коротков А.В. ....	357	Олейник Е.К. ....	207	Цапиева А.Н. ....	335
Бручкус Е.А. ....	383	Котылева М.П. ....	335	Останин А.А. ....	269	Цыбалова Л.М. ....	357
Винник Ю.С. ....	319	Кувшинова Е.В. ....	379	Полозова Э.И. ....	221	Черных Е.Р. ....	269
Гаврилова Е.В. ....	371	Кудаева И.В. ....	311	Пузанова Е.В. ....	221	Шалджян А.А. ....	357
Герасимова Т.А. ....	379	Кудрявцев И.В. ....	335, 347	Родыгина В.В. ....	249	Шапорова Н.Л. ....	383
Давыдов Д.А. ....	383	Кузнецова Ю.А. ....	311	Савченко А.А. ....	347	Шибяев М.И. ....	207
Дудина О.В. ....	383	Куртасова Л.М. ....	379	Сайдакова Е.В. ....	281	Ширинский В.С. ....	327
Дунаевская С.С. ....	319	Лазутова А.А. ....	301	Сахно Л.В. ....	269	Ширинский И.В. ....	327
Елецкая Е.И. ....	357	Лебедева А.А. ....	383	Сельков С.А. ....	231, 249	Шмагель К.В. ....	281
Ермоленко Е.И. ....	335	Леплина О.Ю. ....	269	Семенов А.В. ....	291	Шмагель Н.Г. ....	281
Жулай Г.А. ....	207	Львова Т.Ю. ....	231	Серебрякова М.К. ....	335	Шмидт А.Р. ....	379
Зайцева М.В. ....	357	Любимова Н.Е. ....	291	Сеськина А.А. ....	221	Шуклина М.А. ....	357
Зайцева О.В. ....	301	Максимова А.А. ....	269	Симбирцев А.С. ....	231	Шумихина И.А. ....	335
Зинакова М.К. ....	383	Максютов Р.А. ....	371	Смольская О.А. ....	383	Щелкунов С.Н. ....	371
Игнатъев К.С. ....	207	Марков А.С. ....	249	Соколов Д.И. ....	231, 249	Эсауленко Е.В. ....	291
Ищенко А.М. ....	231	Маркова К.Л. ....	231, 249	Соловьева О.И. ....	335		

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

агаммаглобулинемия .....	379	иммунотерапия .....	371	респираторный взрыв.....	348
альтернативные моноциты .....	270	инсулинорезистентность .....	222	рубеоз радужки .....	301
ангиогенез.....	232	интерферон альфа.....	270	сахарный диабет.....	301, 311
антиретровирусная терапия.....	282	ишемия .....	320	сердечно-сосудистая система .....	311
АНЦА-ассоциированные васкулиты ..	384	каспазы .....	249	сердце .....	311
АНЦА.....	384	кишечный микробиоценоз.....	335	синдром Чарга—Стросс .....	384
артериальная гипертензия .....	222	классические моноциты .....	270	СРБ.....	327
атеросклероз.....	320	коморбидность.....	384	стекловидное тело.....	301
аутоантитела .....	311	лимфоциты .....	320	супрессия .....	208
вибрационная болезнь .....	311	липиды .....	327	сыворотка крови .....	301
вирус гриппа.....	358	макрофаги.....	232	тракционная отслойка сетчатки.....	301
вирус осповакцины.....	371	метаболические нарушения.....	222	фенотип .....	348
ВИЧ-инфекция.....	282	метаболический синдром .....	222, 327	фиброз печени.....	292
внеклеточные оболочечные формы		метагеномный анализ.....	335	хемилюминесцентная активность .....	348
вируса .....	371	миграция .....	249	хемокины .....	292
вялотекущее воспаление .....	327	микровезикулы .....	249	хронический гепатит В.....	292
гемагглютинин .....	358	микроокружение опухоли.....	208	цитокины .....	232, 292, 301, 327
гемостатические расстройства .....	222	микрочастицы .....	320	экзосомы.....	208
гемофтальм .....	301	моноциты.....	232, 348	эктодомен белка М2 .....	358
гетерогенность.....	208	наивные Т-клетки.....	282	эндотелиальная дисфункция.....	222
гранзим В .....	249	неспецифическое воспаление .....	222	эндотелиальные клетки.....	232
гранулоцитарно-макрофагальный		онколитический вирус .....	371	эндотелий .....	249
колониестимулирующий фактор.....	371	опухоли .....	208	эозинофильный гранулематоз	
дексаметазон .....	270	остеоартрит.....	327	с полиангиитом .....	384
дендритные клетки .....	270	патогенез.....	301, 320	В-клетки .....	379
диабетическая ретинопатия.....	301	первичное иммунодефицитное		НА2.....	358
дискордантный ответ .....	282	состояние .....	379	НК-клетки.....	249
дисфункция эндотелия .....	320	пролиферация .....	249	Т-клетки центральной памяти .....	282
иммунная система .....	327	проточная цитометрия субпопуляции		Т-клетки эффекторной памяти.....	282
иммунные нарушения.....	222	Т-лимфоцитов.....	335	Т-лимфоциты.....	208
иммунный ответ.....	358	рак.....	371	VEGF.....	232
иммунный профиль.....	208	рак почки .....	348	β1-адренорецептор .....	311
иммуноглобулины .....	379	регуляторные Т-лимфоциты .....	282, 348		
иммунологическая диагностика .....	384	рекомбинантная вакцина .....	358		



**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:**  
РОСПЕЧАТЬ – 83030  
ПРЕССА РОССИИ – 42311

